

Hochschule Rhein-Waal

Fakultät: Life Sciences

Studiengang: Lebensmittelwissenschaften

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades des
Master of Science (M.Sc.)

**Untersuchungen zum Einfluss
mikrobiologischer und technischer
Parameter auf die hygienische Qualität
von Kaffee aus Kaffeevollautomaten**

vorgelegt von **Jan Schages**

am 03.02.2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation der Verbraucherzentrale Nordrhein-Westfalen und der Fakultät Life Sciences der Hochschule Rhein-Waal Kleve angefertigt.

Erstprüfer: Prof. Dr. Dirk Bockmühl

Zweitprüfer: Dipl. Biol. Philip Heldt

Danksagung

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Dirk Bockmühl für seine vielseitige Unterstützung, seine konstruktive Kritik und die Übernahme der Betreuung dieser Masterarbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Philip Heldt von der Verbraucherzentrale NRW für die sehr persönliche Betreuung und den Austausch vieler fachbezogener Informationen.

Danken möchte ich auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft „Hygiene und Mikrobiologie“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dirk Bockmühl für die Unterstützung und die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und meiner Freundin Laura für ihre Motivation und den Rückhalt während der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XII
1. Einleitung	1
1.1 Kaffee	1
1.1.1 Kaffeekonsum	2
1.1.2 Mikrobiologie von Kaffee	3
1.2 Kaffeefullautomaten	6
1.2.1 Unterschied zwischen Kaffeefullautomaten und Filterkaffeemaschinen	7
1.2.2 Mikrobiologische Risiken bei Kaffeefullautomaten	8
1.3 Ziele dieser Arbeit	12
2. Materialien	14
2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien	14
2.2 Verwendete Geräte und Hilfsmittel	14
2.3 Verwendete Nährmedien	15
2.4 Verwendete Mikroorganismen	15
3. Methoden	16
3.1 Probennahme	16
3.1.1 Getränkeproben aus gewerblichen Vollautomaten und Haushaltskaffeefullautomaten	16
3.1.2 Probennahme aus Mehrwegbechern, Wassertanks und Ausläufen	16

3.2 Aufarbeiten der Proben	17
3.2.1 Kultivierung von Flüssigproben	17
3.2.2 Abstriche aus Wassertanks und Ausläufen	17
3.2.3 Abstriche aus Mehrwegbechern	18
3.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	18
3.3.1 Prinzip	18
3.3.2 Auswahl der Proben	19
3.3.3 Identifikation der Erreger	19
3.4 Biofilm-Färbung	20
3.4.1 Biofilmbildung in Schläuchen von Kaffeefullautomaten	20
3.4.2 Auswahl der Proben	21
3.5 Sporenfärbung nach Schaeffer-Fulton	22
3.5.1 Prinzip	22
3.5.2 Identifikation von Sporen	23
3.5.2 Alternative Identifikation von Sporen	23
3.6 Einfluss der Wassertemperatur auf die Keimbelastung eines Mehrwegbechers	23
3.6.1 Hintergrund	23
3.6.2 Durchführung	24
3.7 Simulationen zur keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeefullautomaten	25
3.8 „Total Organic Carbon“-Überprüfung	27
3.8.1 Prinzip	27
3.8.2 Analyse des TOC- Gehaltes in der Spülflüssigkeit eines Kaffeefullautomaten	27
4. Ergebnisse	28
4.1 Gesamtkeimzahl der analysierten Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben	28
4.1.1 Proben aus dem gewerblichen Bereich	28
4.1.2 Proben aus privaten Haushalten	31

4.2 Identifikation von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie	31
4.3 Analyse der Biofilmanfärbung	34
4.4 Ergebnisse der Versuchsreihe mit Mehrwegbechern	35
4.4.1 Mikrobielle Belastung von Mehrwegbechern	35
4.4.2 Simulation zum Einfluss der Wassertemperatur auf die Keimbelastung in Mehrwegbechern	36
4.5 Simulation zur keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeevollautomaten	42
4.6 Überprüfung der Spülflüssigkeit eines Kaffeevollautomaten	45
5. Diskussion	46
5.1 Proben aus dem gewerblichen Bereich	46
5.2 Proben aus dem Haushaltsbereich	49
5.3 Mehrwegbecherproben	55
5.4 Biofilmbildung und TOC-Gehalt	60
5.5 Simulation zur Keimreduktion durch einen Kaffeevollautomaten	63
6. Schlussfolgerung und Ausblick	67
7. Literaturverzeichnis	69
8. Anhang	74
Eidesstattliche Erklärung	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schema eines Kaffee-/Espressovollautomaten. _____	6
Abbildung 2 Schläuche aus dem genutzten Jura-Kaffee-Vollautomaten. _	21
Abbildung 3 Ergebnisse der gewerblichen Kaffeevollautomaten. _____	28
Abbildung 4 Darstellung der GKZ gegen die gruppierten Temperaturen der Kaffeeproben aus dem gewerblichen Bereich. n=50. _____	29
Abbildung 5 Darstellung der GKZ gegen die gruppierten Temperaturen der Cappuccino-Proben aus dem gewerblichen Bereich. n=50. _____	30
Abbildung 6 Übersicht der GKZ in KbE/mL der Proben aus Kaffeehaushaltsvollautomaten. Die Kaffeeproben hatten im Durchschnitt eine Temperatur von 61,32 °C (Standardabweichung: 3,44). n=10. _____	31
Abbildung 7 GKZ in KbE/Mehrwegbecher der Mehrwegbecherproben. __	35
Abbildung 8 Einfluss der Wassertemperatur auf den LR, Einwirkzeit von fünf Minuten. n=15. _____	37
Abbildung 9 Einfluss der Wassertemperatur auf den LR. _____	38
Abbildung 10 Einfluss der Wassertemperatur auf den LR, Einwirkzeit von einer Minute. n=15. _____	39
Abbildung 11 Einfluss der Wassertemperatur auf den logarithmischen Reduktionsfaktor. _____	40
Abbildung 12 Darstellung der durchschnittlichen logarithmischen Reduktionsfaktoren zu den jeweiligen Temperaturstufen. _____	42
Abbildung 13 Darstellung der Gesamtkeimzahlen der jeweiligen Tassen (Tasse 1, Tasse 2, Tasse 3). Tasse 4 lag oberhalb des Maximums. _____	43
Abbildung 14 Korrelation zwischen der Kontamination eines Wassertanks und der Kontamination des Kaffees des gleichen Haushaltsvollautomaten. n=2. _____	50
Abbildung 15 Vergleich der durchschnittlichen Gesamtkeimzahl und Ausgabetemperatur von privaten (Haushalts-) und gewerblichen Kaffeevollautomaten. _____	53
Abbildung 16 Übersichtsdarstellung der Kaffee -Getränkeproben mit minimaler bzw. maximaler Ausgabetemperatur in °C kombiniert mit der zugehörigen Gesamtkeimzahl in KbE/mL. _____	53

Abbildung 17 LR bei verschiedenen Wassertemperaturen und einer Einwirkzeit von fünf Minuten. _____	57
Abbildung 18 LR bei verschiedenen Wassertemperaturen und einer Einwirkzeit von einer Minute. _____	58
Abbildung 19 Prozentuale Reduktion der Tassenreihenfolge kombiniert mit der Temperatureinstellung. _____	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Richt- und Warnwerte für Instantprodukte, 2013: Entwurf einer Empfehlung (nach (DGHM, 2012)). _____	5
Tabelle 2 Teile eines Kaffeevollautomaten. _____	7
Tabelle 3 Übersicht der Schläuche und ihrer Anbringungsorte/Funktionen aus Abbildung 2. _____	22
Tabelle 4 Verwendete Keime für die Mischkeimsuspension mit vorher bestimmter Ausgangskeimzahl (KbE/mL) für die Simulation bei Mehrwegbechern. _____	24
Tabelle 5 Kaffeeausgabetemperatur des Vollautomaten Philips HD 8844. _____	25
Tabelle 6 Verwendete Keime für die Mischkeimsuspension mit vorher bestimmter Ausgangskeimzahl (KbE/mL) für die Simulation zur keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeevollautomaten. _____	26
Tabelle 7 Temperaturgruppierungen der Kaffee- und Cappuccino-Proben aus gewerblichen Maschinen. Es wird ebenfalls die jeweils zugehörige Probenanzahl (n) aufgeführt. _____	29
Tabelle 8 Auswahl der mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Mikroorganismen aus Haushaltskaffeevollautomaten (Kaffee, Wassertank, Auslauf) und Mehrwegbechern auf MacConkey-Agar (=M), TSA (=T) und MEA (=Me). A= Auslauf, HK= Haushaltskaffeevollautomat, W= Wassertank, GK= gewerblicher Kaffeevollautomat, MB= Mehrwegbecher. Einordnung des Score Values: 0,00-1,69= keine Identifikation möglich; 1,70-1,99= geringe bis mittlere Sicherheit; 2,00-3,00= hohe Sicherheit. _____	32
Tabelle 9 Ergebnisse der Anfärbung von Biofilmen in Schlauchstücken eines Kaffeevollautomaten (dargestellt als OD ₅₅₀). _____	34
Tabelle 10 Ampelsystem zur Einordnung der Ergebnisse der Biofilmfärbung. _____	34
Tabelle 11 Darstellung der durchschnittlichen GKZ in KbE/mL und der logarithmischen Reduktionsfaktoren (LR) bei einer Einwirkzeit von fünf Minuten. Die Ausgangskeimzahl betrug annähernd 1,00E+08 KbE/mL. ____	36

Tabelle 12 Darstellung der durchschnittlichen GKZ und der LR für die untersuchten Temperaturen bei einer Einwirkzeit von fünf Minuten. Die Ausgangskeimzahl betrug etwa 1,00E+08 KbE/mL. _____	38
Tabelle 13 Darstellung der mittleren GKZ in KbE/mL und der LR bei einer Einwirkzeit von einer Minute. Die Ausgangskeimzahl betrug ungefähr 1,00E+08 KbE/mL. _____	39
Tabelle 14 Darstellung der durchschnittlichen GKZ und der LR für die untersuchten Temperaturen bei einer Einwirkzeit von einer Minute. Die Ausgangskeimzahl betrug etwa 1,00E+08 KbE/mL. _____	40
Tabelle 15 Durchschnittliche Ausgangskeimzahl der jeweiligen Temperatureinstellungen. _____	43
Tabelle 16 Übersichtsdarstellung der Parameter der jeweiligen Temperatureinstellungen und Tassen. _____	44
Tabelle 17 TOC-Gehalt der Spülflüssigkeiten (Volumen = 100 µL). Simulation bezeichnet die Versuche an dem Haushaltskaffeevollautomaten Philips HD 8844. _____	45
Tabelle 18 Identifizierte Mikroorganismen der Studie Vilanova et al. (2015). Die mit * gekennzeichneten Gattungen wurden in dieser Arbeit ebenfalls identifiziert. _____	51
Tabelle 19 Durchschnittliche GKZ der jeweiligen Getränkeproben. _____	54
Tabelle 20 Keimzahlen zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl. _____	74
Tabelle 21 Detaillierte Auflistung aller MALDI-TOF-MS Ergebnisse. _____	74
Tabelle 22 Detaillierte Auflistung aller gewerblichen Kaffeevollautomaten mit Nummerierung (vgl. MALDI-TOF-MS Ergebnisse) und Ausgabemperaturen. _____	75
Tabelle 23 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der gewerblichen Kaffeeproben. _____	77
Tabelle 24 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der gewerblichen Cappuccino-Proben. _____	78
Tabelle 25 Detaillierte Auflistung aller (privaten) Haushaltskaffeevollautomaten mit Nummerierung (bzgl. MALDI-TOF-MS Ergebnissen) und Kaffeeausgabemperaturen. _____	80
Tabelle 26 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der Kaffee-Getränkeproben aus Haushaltskaffeevollautomaten. _____	80

Tabelle 27 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der Wassertanks der Haushaltskaffeevollautomaten. _____	81
Tabelle 28 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der Ausläufe der Haushaltskaffeevollautomaten. _____	81
Tabelle 29 Übersichtsdarstellung der Keimzahlen und der GKZ in KbE/mL der Temperatureinstellungen Minimum, Medium und Maximum. _____	82
Tabelle 30 Koloniezahlen der Verdünnungsstufen und Gesamtkeimzahlen der Mehrwegbecherproben. _____	82
Tabelle 31 Auflistung aller gemessenen Temperaturen bei der Simulation mit dem Haushaltskaffeevollautomaten. _____	83
Tabelle 32 Darstellung aller Keime pro Platte der jeweiligen Wiederholung (WDH.) bei den Versuchen an dem Haushaltskaffeevollautomat Philips HD8844. _____	84

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DSMZ/DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DUH	Deutsche Umwelthilfe
<i>et al.</i>	(lat.) und andere
EU	Europäische Union
GIT	Gastrointestinaltrakt
GKZ	Gesamtkeimzahl
KbE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMÜ	Lebensmittelüberwachung
LR	Logarithmische Reduktion(-sfaktor)
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser Desorption & Ionization Time-of-flight - Mass Spectrometry
MEA	Malzextrakt-Agar
mg	Milligramm
mL	Milliliter
nm	Nanometer
rpm	(eng.) revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
TOC	(eng.) total organic carbon = gesamter organischer Kohlenstoff
TrinkwV	Trinkwasserverordnung

TSA

UBA

UV-Strahlung

Trypton-Soja-Agar

Umweltbundesamt

Ultraviolett-Strahlung

Zusammenfassung

Der Konsum von Kaffee und seinen Zubereitungsarten hat in den letzten Jahren enorm zugenommen. Die sog. „Kaffee to go“-Getränke gewinnen hierbei immer mehr an Bedeutung und mit den Verpackungen dieser geht eine große Abfallproblematik einher. Der Großteil der Mitnahmegetränke wird in Vollautomaten hergestellt, welche auch im Haushaltsbereich immer mehr zum Einsatz kommen. Diese Vollautomaten müssen regelmäßig gereinigt und gepflegt werden, da sie sonst als Quelle für Lebensmittel-Kontaminationen fungieren können. Durch eine feuchte Umgebung in den Wassertanks und wasserführenden Systemen sowie eine ausreichende Nährstoffzufuhr durch Kaffee und Kaffeerückstände bieten Vollautomaten ein geeignetes Milieu für mikrobielles Wachstum.

Um den Einfluss technischer und mikrobiologischer Parameter auf die hygienische Qualität von Kaffee überprüfen zu können, wurden Geräte aus dem Haushalts- und dem gewerblichen Bereich untersucht. Die isolierten Mikroorganismen wurden mittels MALDI-TOF-MS identifiziert und als artifizielle Kontaminationen für weitere Versuche verwendet. Sie dienten als Grundlage für empirische Versuchsreihen und Simulationen an einem Kaffeevollautomaten zum Einfluss der Parameter Temperatur und Zeit auf die mikrobiologische Qualität. Die Wirkung dieser Parameter wurde auch in artifiziell kontaminierten Mehrwegbechern simuliert.

Die Ergebnisse zeigen, dass 40 % aller gewerblichen Geräte und 25 % aller Haushaltsgeräte mikrobiologisch belastet waren, die Wassertanks der Haushaltsgeräte waren zu 100 % kontaminiert. Besonders häufig wurden Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas* und *Staphylococcus* identifiziert. Die Ausgabemperaturen der Vollautomaten sowie die Einwirkdauer der Temperaturen sind als zu gering für eine mikrobiologische Unbedenklichkeit der Lebensmittel einzuordnen. Die Temperaturen der untersuchten Kaffeeproben lagen zwischen 63,59 °C im gewerblichen Bereich und 61,32 °C im Haushaltsbereich. Für kontaminierte Mehrwegbecher konnte eine optimale Kaffeeausgabetemperatur von 68 °C ermittelt werden. Bei adäquater Verwendung geht von Mehrwegbechern kein hygienisches Risiko aus, jedoch von Kaffeevollautomaten bei unzureichender Reinigung.

1. Einleitung

1.1 Kaffee

Die Kaffeebohne (*Coffea arabica* und *Coffea robusta/canephora*) ist der Samen des Kaffeebaums. Dieser gehört zur Familie der Rötengewächse (*Rubiaceae*). Zur Gattung *Coffea* gehören etwa 6000 Arten, von denen 100 kultiviert werden. Der Kaffeebaum stammt ursprünglich aus Äthiopien, heute sind Brasilien, Kolumbien, Indonesien und Mexiko die Haupterzeugerländer (Kunz, 2015). Nur die bereits genannten Gattungen *Coffea arabica* und *Coffea robusta/canephora* sind von wirtschaftlicher Bedeutung (Rimbach *et al.*, 2015). Die Kaffeebohne ist im natürlichen Zustand grün und jeweils zwei Samen liegen mit den flachen Seiten zueinander im Fruchtfleisch der Steinfrucht (Krämer, 2011). Zur Herstellung der bekannten Kaffeebohne muss diese von ihrem Fruchtfleisch und ihrer Fruchtschale befreit werden und wird anschließend roh (Rohkaffee) oder geröstet durch Erhitzen auf 220 °C (Röstkaffee) weiterverarbeitet (LGL Bayern, 2012, Rimbach *et al.*, 2015).

Die Entfernung des Fruchtfleisches kann durch das trockene oder das nasse Verfahren erfolgen.

Bei dem trockenen Verfahren findet die Fermentation in der Sonne statt. Die Früchte des Kaffeebaums werden für 10-20 Tage in der Sonne liegend getrocknet (Kunz, 2015). Anschließend werden die Samen maschinell aus den getrockneten Früchten entfernt (Krämer, 2011).

Im nassen Verfahren werden die Bohnen nach maschinellm Exzidieren des Fruchtfleisches zwei Tage in einem Wasserbecken mit Hilfe von pflanzeigenen Enzymen und durch pflanzeigene und technisch bedingte Mikroorganismen (u.a. *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*) fermentiert (Krämer, 2011, Rimbach *et al.*, 2015). Durch diese Auflockerung des Fruchtfleisches können die Samen von der Hülle durch leichtes Abspülen getrennt werden.

1.1.1 Kaffeekonsum

2013 wurden global 2,5 Milliarden Tassen Kaffee am Tag getrunken (brandeins.de, 2013). In Europa tranken 2013 im Durchschnitt die Niederländer mit einem täglichen Pro-Kopf-Verbrauch von ca. 2,41 Tassen am meisten und die in Aserbaidschan lebenden Menschen mit ca. 0,01 Tassen am wenigsten Kaffee. Der tägliche pro Kopf Verbrauch in Deutschland lag bei ungefähr 1,23 Tassen. Damit lag Deutschland 2013 auf dem fünften Platz beim weltweiten Pro-Kopf-Kaffeekonsum. Nur die Niederländer und die skandinavischen Länder Finnland (2. Platz), Schweden (3. Platz) und Dänemark (4. Platz) tranken durchschnittlich mehr Kaffee als die deutsche Bevölkerung (statista.com, 2013). Diese Rangordnung dürfte einerseits mit der tendenziell höheren Kaufkraft in den skandinavischen Ländern zu tun haben, aber ebenso mit dem Klima und der damit verbundenen längeren Dunkelheit im Winter (statista.com, 2013).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist der sog. „Kaffee to go“-Konsum. Dabei handelt es sich um die Mitnahme von Kaffeezubereitungsarten zum Verzehr in Einweg- oder Mehrwegbechern. Nach Angaben der Deutschen Umwelthilfe (DUH) werden in Deutschland 320.000 „to go“-Becher pro Stunde verwendet (Deutsche Umwelthilfe, 2016). Die Hamburger Verbraucherzentrale spricht von einem jährlichen Verbrauch an „Kaffee to go“-Bechern von 80 Bechern pro Kopf, was einen Gesamtkonsum von 6,4 Mrd. Bechern in Deutschland ergibt (Verbraucherzentrale Hamburg, 2016). Laut Bundesumweltamt (UBA) verdreifachte sich die Menge der Getränkebecher seit der Jahrtausendwende (Umweltbundesamt, 2015).

Einige Betriebe bieten bereits den Ausschank von Kaffee in mitgebrachte Mehrwegbecher an, jedoch scheuen sich andere davor, da gewisse Hygienrisiken damit einhergehen. Außerdem können Probleme mit der Lebensmittelüberwachung (LMÜ) entstehen, da es keine konkrete Regelung zu geltenden Verordnungen gibt und einige Kontrolleure diese relativ frei auslegen (Philip Heldt, persönliche Kommunikation). Einige Experten fordern einen einheitlichen Standpunkt der LMÜ zum Thema Abfüllung in mitgebrachte Becher (Philip Heldt, persönliche Kommunikation).

Die Gesetzesgrundlage schließt den Ausschank in Mehrwegbecher nicht aus und verbietet diesen auch nicht (EG 178/2002, 2002, EG 852/2004, 2004, EG 1935/2004, 2004, Lebensmittelhygiene-Verordnung, 2016).

Die Kaffeezubereitungsarten reichen von Kaffee aus Vollautomaten über Filterkaffee zu Cappuccino, Latte macchiato, Espresso und vielen mehr. Filterkaffee wird von 94 % der Kaffeetrinker bevorzugt gefolgt von Cappuccino (38,1 %) und Latte macchiato (24,3 %) (brandeins.de, 2013). Die Tendenz bei der Kaffeezubereitung bewegt sich in den letzten Jahren zu Kaffee aus Kaffeevollautomaten; 2014 war in 12 % aller privaten Haushalte in Deutschland ein Kaffeevollautomat vorhanden (Statistisches Bundesamt, 2015).

1.1.2 Mikrobiologie von Kaffee

Der Kaffee ist während seines Verarbeitungs- und Herstellungsprozesses vielen mikrobiellen Risiken ausgesetzt. Bei der Ernte, der Lagerung, der Fermentation und dem Transport kann das Produkt durch mangelnde Hygiene verunreinigt bzw. mikrobiell belastet werden. Ebenso trägt dies zur eventuellen Verringerung der sensorischen Qualität des Kaffees bei (Krämer, 2011, Waters *et al.*, 2016).

Der Kaffeebaum (heute mittels Zucht als Kaffeestrauch) gedeiht im feuchtwarmen, tropischen Klima (Ebermann und Elmadfa, 2011). Diese klimatischen Voraussetzungen stellen ein optimales Milieu für das Wachstum von Feldpilzen (Primärflora/natürliche Flora) dar. Bei der Primärflora der Kaffeefrucht treten Pilzgattungen auf, welche in der Lage sind, Mykotoxine zu bilden (*Alternaria* und *Fusarium*) (Ebermann und Elmadfa, 2011, Matissek und Baltes, 2015). Mykotoxine sind sekundäre, für Mensch und Tier toxische Stoffwechselprodukte von Pilzen. Sie werden auf nährstoffreichen Substraten gebildet und treten auch ohne sichtbaren Schimmelbefall eines Produktes auf. Sie können auf dem Rohprodukt vorhanden sein oder während Arbeits- und Herstellungsprozessen eingetragen werden. Daher ist es möglich, dass Mykotoxine in jedem Lebens- und Futtermittel auftreten (Muecke und Lemmen, 2004).

Durch Kontaminationen bei der Verarbeitung und Lagerung kann eine Sekundärflora hinzukommen. Während der Lagerung verändert sich die Mikroflora des Kaffees: die ursprünglichen Keime der Primärflora nehmen ab und es vermehren sich die Keime der Sekundärflora, die an die Bedingungen der Lagerhaltung angepasst sind (Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft *et al.*, 2005). Es wird von einer Primärkontamination gesprochen, wenn die Kaffeefrucht vor der Ernte mikrobiologisch belastet ist/war und von einer Sekundärkontamination, wenn sie zum Beispiel während der Lagerung von Schimmelpilzen befallen wird. Die dritte Kontaminationsart, der „Carry over“-Effekt tritt bei Kaffee nicht auf (Rimbach *et al.*, 2015, Hamatschek, 2016).

Kaffee kann besonders von Schimmelpilzen befallen sein, welche das Mykotoxin Ochratoxin A bilden (Weber, 2010, Krämer, 2011). Mykotoxine werden auch von so genannten Lagerpilzen der Gattungen *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus*) und *Penicillium* (*Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*) synthetisiert (Kluwer Academic, 2005, Ebermann und Elmadfa, 2011).

Das Mykotoxin Ochratoxin A wird auf Lebensmitteln, Futtermitteln und Rohwaren gebildet (Baumgart *et al.*, 2014). Es ist nephrotoxisch, mutagen, kanzerogen und teratogen (Dirheimer und Creppy, 1991, Fink-Gremmels *et al.*, 1995, Muecke und Lemmen, 2004). Kontaminationsquellen sind u.a. Getreideerzeugnisse, Trockenobst, Wein und Kaffee (Krämer, 2011).

Innerhalb der EU gibt es seit 2002 Grenzwerte für Ochratoxin A. Diese Grenzwerte liegen für geröstete Kaffeebohnen sowie gemahlene, gerösteten Kaffee bei 5 µg/kg Körpergewicht und für löslichen Kaffee bei 10 µg/kg Körpergewicht (EG 1881/2006, 2006, Weber, 2010) Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) forderte schon 1997 Grenzwerte für dieses Toxin in Lebensmitteln (Bundesinstitut für Risikobewertung 15/1997, 1997).

Neben der Kontamination mit Schimmelpilzen geht auch eine Gefahr von Bakterien aus. Diese können ebenfalls über den Herstellungs- und Verarbeitungsprozess oder den Transport eingetragen werden. Auf der Kaffeefrucht befinden sich einige Bakterien der Gattungen *Enterococcus*, *Erwinia* und *Streptococcus* (Holzapfel, 2007, Wallhaeußer, 2013).

Da die Kaffeefrucht größtenteils per Hand geerntet wird, finden sich zum Beispiel Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* (gehören zur natürlichen Darmflora und werden u. a. durch mangelnde Händehygiene übertragen) auf der Kaffeefrucht wieder (Holzapfel, 2007, Krämer, 2011). Viele dieser Mikroorganismen sind direkt an den Fermentationsprozessen bei der Verarbeitung des Kaffees beteiligt, u.a. sind Bakterien der Gattung *Erwinia* (*Erwinia dissolvens*, heute: *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*) der wichtigste Produzent pektinolytischer Enzyme (Baltes, 2013, Kunz, 2015). Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) gibt Richt- und Warnwerte für mikrobiologisch kritische Lebensmittel und Lebensmittelgruppen heraus. Für Kaffee gelten die in Tabelle 1 aufgeführten Werte für Instantprodukte.

Tabelle 1 Richt- und Warnwerte für Instantprodukte, 2013: Entwurf einer Empfehlung (nach (DGHM, 2012)).

	Richtwert (KbE**/g)	Warnwert (KbE**/g)
Aerobe mesophile Koloniezahl	1*10 ⁴	---
<i>Enterobacteriaceae</i>	1*10 ²	1*10 ³
<i>Escherichia coli</i>	1*10 ¹	1*10 ²
Schimmelpilze	1*10 ²	---
Koagulase-positive Staphylokokken	1*10 ¹	1*10 ²
Präsumtive <i>Bacillus cereus</i>	1*10 ²	1*10 ³
Salmonellen	---	n. n.*** in 25 g

** KbE: Koloniebildende Einheit

*** n. n.: nicht nachweisbar

Als Instantprodukte, die heiß aufgegossen werden, gelten u. a. Grießbrei, Pudding, Kaffee- und Teemischgetränke.

1.2 Kaffeefullautomaten

Ein Kaffeefullautomat ist ein technisches Gerät, welches vollautomatisch diverse Kaffeevarianten produzieren kann (Kaffee-Vollautomaten-Vergleich, 2016). In Deutschland steigt der Anteil an Kaffeefullautomaten in privaten Haushalten: 2014 gab es in 12 % aller Privathaushalte in Deutschland einen Kaffeefullautomaten (Statistisches Bundesamt, 2015).

Im Folgenden wird der Aufbau eines Kaffeefullautomaten schematisch und tabellarisch dargestellt:

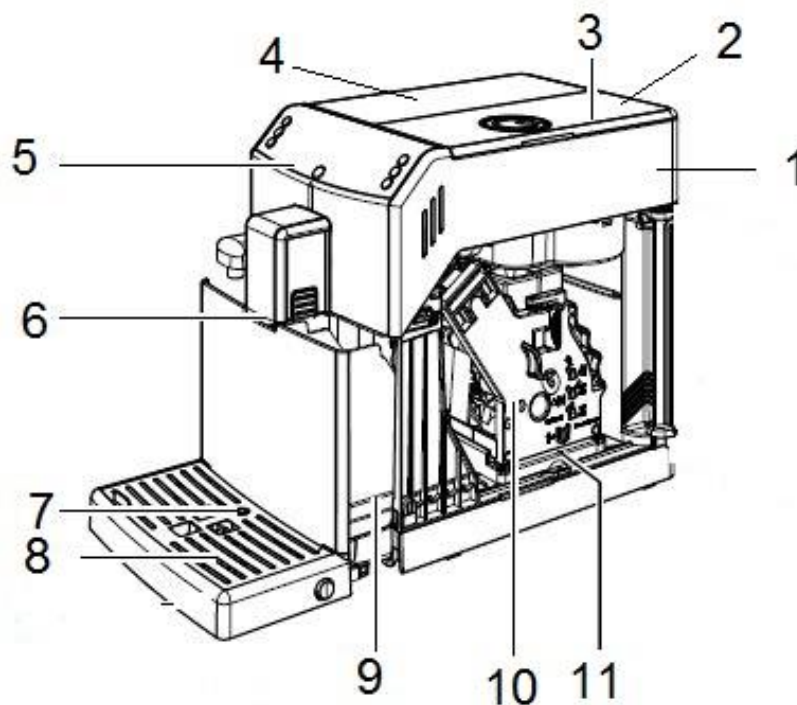


Abbildung 1 Schema eines Kaffee-/Espressovollautomaten.

1: Gehäuse, 2: Mahlwerk, 3: Bohnen-/Pulver-Vorratsbehälter, 4: Wassertank, 5: Bedienfeld, 6: Kaffeeauslass, 7: Abtropfschale, 8: Abtropfgitter, 9: Kaffeesatzbehälter, 10/11: Brüheinheit/Thermogruppe. (nach: (Bedienungsanleitung Philips HD8844, 2016)).

Tabelle 2 Teile eines Kaffeevollautomaten.

Nummer	Funktion
1	Gehäuse
2	Mahlwerk
3	Bohnen-/Pulver-Vorratsbehälter
4	Wassertank
5	Bedienfeld
6	Kaffeeauslass
7	Abtropfschale
8	Abtropfgitter
9	Kaffeersatzbehälter
10/11	Brüheinheit/Thermogruppe

1.2.1 Unterschied zwischen Kaffeevollautomaten und Filterkaffeemaschinen

Kaffee aus Filterkaffeemaschinen wird hauptsächlich durch heißes Wasser, Kaffeepulver und einen geeigneten Filter hergestellt. Im Gegensatz dazu besteht ein Kaffeevollautomat aus mehreren Komponenten, die zur Qualität eines Kaffees oder einer Kaffeeariate beitragen. Unter anderem besitzt ein Vollautomat ein Mahlwerk, eine Pumpe, einen Durchlauferhitzer, eine Brühgruppe und viele weiteren Komponenten. Mittels dieser Elemente lassen sich sowohl die Kaffeestärke und die Fassengröße als auch die Wasserhärte und Brühtemperatur/Ausgabetemperatur einstellen.

Ein wichtiger Unterschied zwischen Kaffee aus einer herkömmlichen Maschine für Filterkaffee und einem Vollautomat ist das Aroma, das sich am besten durch einen Druck von 7,5 bis 9 bar entfalten kann. Diese Spanne ist in einem Vollautomaten möglich, bei der Filterkaffeemaschine kann jedoch kein Druck erzeugt werden. Zusätzlich gelangen durch den längeren Kontakt mit dem Kaffeepulver im Filterverfahren mehr Bitterstoffe und Gerbstoffe in den Kaffee. Ein Vollautomat erfüllt die vorher genannten Kriterien, so dass die Dauer des Brühvorgangs bei max. 30 Sekunden liegt. So werden mehr Aromen und ätherische Öle und weniger Koffein, Gerbsäuren und Bitterstoffe freigesetzt (Baltes, 2013, Rimbach *et al.*, 2015).

1.2.2 Mikrobiologische Risiken bei Kaffeefullautomaten

Aktuell gibt es einige Studien über potentielle Gesundheits- oder Hygienerisiken für den Verbraucher, die durch mikrobiologische Probleme bei Kaffeefullautomaten verursacht werden.

In einer US-Studie wurden einige Teile, z.B. der Tank und der Kaffeeauslauf von 28 Kapselmaschinen untersucht (CBS Pittsburgh, 2015). Kapselmaschinen unterscheiden sich von Kaffeefullautomaten; sie besitzen zum Beispiel keinen Satzbehälter, sondern nur einen Müllbehälter für die benutzten Kapseln. Außerdem haben sie nur eine Brühmethode und es ist fraglich, ob Drücke und Temperaturen wie in einem Kaffeefullautomaten erreicht werden können. Die Studie von CBS Pittsburgh (2015) besagt, dass mehr als die Hälfte der untersuchten Maschinen erhöhte Keimzahlen (eine mit einer Keimbelastung von 10^6) aufwies und unter anderem *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*) identifiziert werden konnten. Genaue Zahlen über die Höhe der Keimbelastung sowie die Methodik werden jedoch nicht genannt.

In einer anderen Studie wurden in mehr als 80 % der überprüften Fullautomaten Hefen und Schimmelpilze gefunden, jedoch wird hier ebenfalls keine Auskunft über die Geräte, Probenorte oder Höhe der mikrobiologischen Belastung gegeben (Focus.de, 2016).

In einer Studie von Vilanova *et al.* (2015) wurden von zehn unterschiedlichen Nespresso Maschinen (gewerblich und Haushaltsgeräte) die Auffangschalen der Kaffeereste untersucht. Es stellte sich heraus, dass sich dort periodisch für Kaffee charakteristische Bakteriome bilden. Hier wurden in zeitlichen Abschnitten immer identische Mikroorganismen identifiziert, wie zum Beispiel die Gattungen *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Enterococcus* und *Pseudomonas*. Diese Studie kann aufgrund der wissenschaftlichen Glaubwürdigkeit als Grundlage bzw. Orientierung für diese Arbeit verwendet werden.

Das Gesundheitsrisiko für den Verbraucher ist gering (eine Ausnahme bilden Risikogruppen wie Menschen mit geschwächtem Immunsystem oder Kleinkinder), wenn Reinigungsvorschriften eingehalten werden ([Lüppo Ellerbroek] (BfR) in (stern.de, 2013)), jedoch geht ein Hygienerisiko von Kaffeevollautomaten aus, falls Reinigungsvorschriften nicht genau eingehalten werden. Dieses Risiko wird durch Mikroorganismen wie Pseudomonaden, Pilze und Salmonellen hervorgerufen (stern.de, 2013). Genauere Angaben zu diesen Mikroorganismen oder der Höhe der mikrobiellen Belastung werden in diesem Betrag ebenfalls nicht gemacht.

Insgesamt müssen diese Studien (mit Ausnahme von Vilanova *et al.* (2015)) alle kritisch betrachtet werden, da es keine nachvollziehbaren Ergebnisse gibt und ebenso die Quellen bzw. Herkunft der präsentierten Ergebnisse anzuzweifeln ist. Die Probenanzahl sowie die Identifikation der Mikroorganismen erscheinen stichprobenartig und ohne jeglichen wissenschaftlichen Hintergrund. Für Aussagen zum Gesundheitsrisiko für den Verbraucher bzw. zum Hygienerisiko, ausgehend von den unterschiedlichen Maschinentypen, müssen fundierte wissenschaftliche Studien mit adäquater Probenanzahl zur Vergleichbarkeit durchgeführt werden. Ebenso muss eine exakte Identifikation der Mikroorganismen stattfinden und diese nach Fundorten eingeteilt werden.

Im nachfolgenden Teil werden die Bauteile und Faktoren eines Vollautomaten betrachtet, durch welche denkbare mikrobiologische Probleme entstehen können.

Wasser

In Deutschland existiert eine Trinkwasserverordnung (TrinkwV) mit Gesetzescharakter in welcher Vorgaben zur Qualität von Trinkwasser gemacht werden. Darin werden Grenzwerte für Mikroorganismen und weitere Parameter festgelegt (TrinkwV, 2012).

Durch kontaminierte Trinkwassersysteme, durch zu geringen Wasserwechsel im Wassertank einer Maschine, durch unzureichende Erhitzung des Wassers und aufgrund mangelnder Reinigung und Hygiene können dennoch mikrobiologische Risiken entstehen.

Von besonderer Bedeutung sind hierbei coliforme *Enterobacteriaceae*, Hefen und Schimmelpilze (Ashbolt, 2015). *Enterobacteriaceae* können Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (GIT) und Lebensmittelintoxikationen hervorrufen. Hefen und Schimmelpilze wurden ebenfalls in Trinkwassersystemen detektiert, wobei Schimmelpilze besonders kritisch im Hinblick auf die Bildung von Mykotoxinen (Ochratoxin A) in Lebensmitteln anzusehen sind (Dogen *et al.*, 2013, Ostry *et al.*, 2013). Somit kann der Wassertank als besonders kritischer Punkt angesehen werden.

Wassertank und wasserführende Systeme (Schläuche)

Einige Maschinenhersteller (Philips, DeLonghi, Jura) raten in ihren Bedienungsanleitungen zu einem täglichen Wasserwechsel im Wassertank. Es konnte mittels stichprobenartiger Überprüfung festgestellt werden, dass einige Verbraucher dies jedoch nicht nach Herstellerangaben durchführen. So kann der Wassertank als Reservoir für Mikroorganismen dienen und zu einer möglichen Kontamination der Schläuche innerhalb eines Kaffeevollautomaten führen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass es im Inneren der Schläuche zur Bildung von Biofilmen kommen kann, welche sich gegebenenfalls bei Reinigungs- oder Entkalkungsvorgängen ablösen und in das Getränk gelangen können. Biofilme stellen die wichtigste Lebensform mikrobieller Gemeinschaften dar (Szewzyk und Szewzyk, 2003) und ca. 99 % aller Mikroorganismen bilden Biofilme, somit kann von einer ubiquitären Verbreitung gesprochen werden (Costerton *et al.*, 1994). Sowohl Kaffeevollautomaten als auch andere Haushaltsgeräte mit einem Wasseranschluss bieten einen geeigneten Lebensraum für Mikroorganismen und die Bildung von Biofilmen durch diese Mikroorganismen. Zum Beispiel wurden Biofilme in Waschmaschinen (Gattlen *et al.*, 2010, Nix *et al.*, 2015) nachgewiesen. In Waschmaschinen herrschen zuträgliche Lebensbedingungen für Mikroorganismen, wie ein warm-feuchtes Milieu und eine hohe Nährstoffzufuhr. Auch hier wurde die mikrobielle Verunreinigung teilweise mit dem Trinkwassersystem assoziiert (Gattlen *et al.*, 2010).

Biofilme sind mikrobielle Gemeinschaften, welche durch Zellen irreversibel an Oberflächen haften. Die Zellen produzieren extrazelluläre, polymere Substanzen (EPS), wodurch die Zellen im Biofilm geschützt sind und sich vermehren können (Donlan und Costerton, 2002, Flemming *et al.*, 2007) Diese EPS schützen die Mikroorganismen vor äußeren Einflüssen.

Biofilme bilden sich in fünf Phasen:

1. Anlagerung einzelner Zellen an eine Oberfläche
2. irreversible Anlagerung der Zellen
3. mittels intrazellulärer Kommunikation wird die EPS gebildet und die Mikroorganismen vermehren sich
4. verstärktes Bakterienwachstum und EPS-Produktion
5. singuläre Freisetzung des Biofilms (Monroe, 2007)

Durch die Unvermeidbarkeit von Biofilmen kann von einem Einfluss dieser auf die Hygiene von Kaffeefullautomaten und eventuell auf die Sensorik des Getränkes ausgegangen werden.

Ebenfalls können durch die Biofilmbildung Schläuche und Pumpen verstopfen und somit die Leistung und Lebensdauer eines Vollautomaten beeinträchtigt werden.

Brüheinheit/Thermoblock

An die wasserführenden Systeme vom Wassertank ausgehend ist die Brüheinheit angeschlossen. Hier wird das Wasser auf entsprechende Temperaturen (je nach Hersteller zwischen 90 °C und 140 °C) erhitzt. Durch diese Temperaturen werden alle vegetativen Zellen von Bakterien und Pilzen abgetötet (Fuchs, 2007). Jedoch beeinflussen die Dauer des Temperatureinflusses und die Temperaturhöhe die Inaktivierung der Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch zu niedrige Temperaturen oder zu kurzes Erhitzen keine adäquate Inaktivierung stattfindet und so Mikroorganismen im Kaffee verbleiben.

Unabhängig von den vegetativen Zellen können Sporen oder Mykotoxine von Bakterien und Schimmelpilzen aufgrund ihrer Thermostabilität die Passage der Brüheinheit überstehen und so in das Getränk gelangen (Muecke und Lemmen, 2004, Suerbaum *et al.*, 2012, Adam *et al.*, 2013).

Kaffeeauslauf

Am Kaffeeauslauf kann es zu einer Sekundärkontamination des Kaffees durch Umweltkeime, Luftkeime und ubiquitäre Mikroorganismen kommen (Heeschen und Zschaler, 2015). Dementsprechend besteht am Auslauf eines Kaffeevollautomaten ein Hygiene- und Gesundheitsrisiko für den Konsumenten. Die Reinigung dieses Bauelementes ist von besonderer Relevanz (Dirk Bockmühl, persönliche Kommunikation).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss technischer und mikrobiologischer Parameter auf die Kaffeequalität aus privaten und gewerblichen Kaffeevollautomaten zu untersuchen. So sollen Mindestanforderungen für verschiedene Parameter festgelegt werden, um zur Verbrauchersicherheit und Lebensmittelsicherheit beitragen zu können.

Der bisherige Stand der Forschung zur mikrobiologischen Unbedenklichkeit von Kaffee aus Kaffeevollautomaten ist lückenhaft und die wissenschaftliche Verlässlichkeit einiger vorher genannter Studien ist insgesamt kritisch zu betrachten. Auch gibt es keine fundierten Daten zum Einfluss technischer und mikrobiologischer Parameter auf die Kaffeequalität. Daher lässt sich das tatsächliche Risiko, das von Kaffeevollautomaten ausgeht, nicht verlässlich abschätzen.

Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Dauer der Temperatureinwirkung und der Temperaturhöhe auf die Inaktivierung relevanter Mikroorganismen überprüft werden. Dazu sollte über eine empirische Versuchsreihe zum Einfluss der Temperatur-/Zeitkombination eine für die Verbrauchersicherheit optimale Kaffeeausgabetemperatur ermittelt werden.

Hierzu sollten zunächst die in Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben aus Kaffeevollautomaten (gewerblich/privat) auftretenden Mikroorganismen quantifiziert und mittels MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted Laser Desorption & Ionization Time-of-flight - Mass Spectrometry*) identifiziert werden. Außerdem sollten natürlich verunreinigte Mehrwegbecher untersucht werden, um den Einfluss dieser auf die mikrobiologische Qualität des Kaffees abschätzen zu können und gegebenenfalls eine Aussage über die Vor- und Nachteile von Mehrwegbechern im sog. „Kaffee to go“ Bereich treffen zu können.

Durch diese Arbeit sollen Mindestanforderungen an die Kaffeeherstellung in Vollautomaten bezogen auf die Dauer des Temperatureinflusses und auf die Temperaturhöhe ermittelt werden, um ein mikrobiologisch sicheres Lebensmittel zu erhalten und somit zur Lebensmittelsicherheit beizutragen. Auch soll das Bewusstsein für die bei der Verwendung von Kaffeevollautomaten möglicherweise entstehenden hygienischen Probleme bei Verbrauchern und Herstellern geweckt werden.

2. Materialien

2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chloramphenicol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 96% vergällt mit ca. 1% MEK	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kristallviolett	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Malachitgrün-Lösung	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Safranin-Lösung (Reagenz 5)	Merck KGaA, Darmstadt

2.2 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Abstrichbesteck (Watteträger steril)	Copan Diagnostics, Brescia, IT
Abstrichbesteck Medi Swab steril	Heinz Herenz, Hamburg
Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH, Wettenberg
Bio Photometer plus	Eppendorf, Hamburg
Drigalskispatel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Infrarot-Thermometer Testo 805	Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch
Inkubations-Orbitalschüttler MaxQ* 8000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Inkubator HettCube 200R	Hettich, Tuttlingen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Philips Kaffee-Vollautomat HD8844	Philips GmbH, Hamburg
Pipetten Eppendorf research plus	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (Tube) 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Wesel
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
TOC/N-Messung (multi N/C 2100 S)	Analytik jena, Jena
Vortexer Lab dancer S40	VWR, Darmstadt
Waage XA 3002S	Mettler Toledo, Gießen
Zeiss Mikroskop Primo Star	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zentrifuge: Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

2.3 Verwendete Nährmedien

MacConkey-Agar	Oxoid Deutschland GmbH (Thermo Fisher Scientific), Wesel
Malzextrakt-Agar	Oxoid Deutschland GmbH (Thermo Fisher Scientific), Wesel
Nutrient Broth	Oxoid Deutschland GmbH (Thermo Fisher Scientific), Wesel
Tryptic Soy Broth	Oxoid Deutschland GmbH (Thermo Fisher Scientific), Wesel
Trypton-Soja-Agar (CASO)	Oxoid Deutschland GmbH (Thermo Fisher Scientific), Wesel

2.4 Verwendete Mikroorganismen

<i>Acinetobacter baumannii</i>	DSM 30007
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 2146
<i>Escherichia coli</i>	DSM 682
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 939
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 1798

3. Methoden

3.1 Probennahme

3.1.1 Getränkeproben aus gewerblichen Vollautomaten und Haushaltskaffeevollautomaten

Es wurden jeweils 50 Kaffee- und Cappuccino-Proben (Getränkeproben) an unterschiedlichen gewerblichen Standorten und zehn Kaffeeproben an privaten Orten genommen. Mit einem Infrarot-Thermometer der Firma Testo erfolgte die Temperaturmessung direkt nach Ausgabe des Getränkes.

3.1.2 Probennahme aus Mehrwegbechern, Wassertanks und Ausläufen

Probennahme mittels Abstrichbesteck aus Mehrwegbechern

Für die Untersuchung der mikrobiologischen Belastung von Mehrwegbechern wurden stichprobenartig Abstriche aus zehn Bechern genommen, die im täglichen Gebrauch sind (Becherboden). Hierbei konnten keine Rückschlüsse auf Gebrauch, Nutzungsdauer, Alter, Reinigung oder Art der Befüllung gezogen werden. Diese wurden nach DIN 10113-1 (1997) im Labor bearbeitet. Die Entnahme der Abstriche erfolgte mit Hilfe eines Abstrichbestecks aus Kunststoff mit einem sterilen Watteträger.

Probennahme mittels Abstrichbesteck aus Wassertanks und Ausläufen

Zur Untersuchung von Wassertanks und Ausläufen der Kaffeevollautomaten auf eine mögliche mikrobiologische Verunreinigung wurden ebenfalls Abstriche genommen. Dies geschah bei zehn Haushaltskaffeevollautomaten. Die Probennahme an diesen Stellen fand mit einem Abstrichbesteck ohne Medium der Firma Copan und im Falle eines längeren Zeitraums zwischen Entnahme und Aufarbeitung, mit einem Abstrichbesteck mit Amies-Medium der Firma Heinz Herenz statt.

Hierzu wurde mehrfach mit dem sterilen Wattetupfer über die Innenseite des Wassertanks beziehungsweise am Auslauf entlang gestrichen, um

ausreichend Material zu erhalten. Die anschließende Bearbeitung im Labor fand ebenfalls nach DIN 10113-1 (1997) statt.

3.2 Aufarbeiten der Proben

3.2.1 Kultivierung von Flüssigproben

Von den genommenen Getränkeproben von Kaffee und Cappuccino wurden dezimale Verdünnungsreihen in 0,9 % Natriumchloridlösung hergestellt und mittels Oberflächenverfahren auf Selektivmedien untersucht. Als Selektivmedien fungierte unter anderem MacConkey-Agar für *Enterobacteriaceae*, welcher bei 37 °C inkubiert wurde.

Des Weiteren fand eine Inkubation bei 30 °C für TSA (Trypton-Soja-Agar) und MEA (Malzextrakt-Agar) statt (Bast, 2001). Der MEA wurde vor dem Gießen mit dem Antibiotikum Chloramphenicol versetzt (100 mg/L), um Bakterien zu hemmen und ausschließlich das Wachstum von (Schimmel-) Pilzen und Hefen zu fördern (Mühlhardt, 2013).

Im Falle eines Wachstums von Mikroorganismen auf den jeweiligen Nährböden wurden diese quantitativ ausgewertet und anschließend mit Hilfe des Drei-Ösen-Ausstrichs subkultiviert, um so Einzelkolonien gewinnen zu können. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei entweder 30 °C oder 37 °C. Nach der Vereinzlung wurden die Mikroorganismen zur Identifikation mit Hilfe der MALDI-TOF-MS vom Institut für medizinische Labordiagnostik GmbH (IML) der Ruhruniversität Bochum analysiert.

3.2.2 Abstriche aus Wassertanks und Ausläufen

Im Labor wurden die Abstriche nach der Norm DIN 10113-1 (1997) behandelt. In dieser wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich beschrieben (DIN 10113-1, 1997). Die Extraktion der Keime aus den Wattetupfern erfolgte in 0,9 % NaCl-Lösung für zehn Minuten bei 1400 rpm und 15 °C.

Die einzelnen Verdünnungsstufen einer dezimalen Verdünnungsreihe (DIN Abschnitt 3.2-3.4) wurden auf Selektivmedien ausplattiert (je 100 µL) und für 24-48 Stunden bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert (DIN Abschnitt 5.2).

Positive Keimnachweise wurden in diesem Fall ebenfalls per MALDI-TOF-MS identifiziert.

Es ist anzumerken, dass nur aus privaten und nicht aus gewerblichen Kaffeefullautomaten Abstriche aus den Wassertanks und den Ausläufen genommen werden konnten.

3.2.3 Abstriche aus Mehrwegbechern

Diese wurden, wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben genommen und ausgewertet.

Auch bei den Proben aus den Mehrwegbechern erfolgte die Identifizierung kultivierter Mikroorganismen am IML in Bochum mittels MALDI-TOF-MS.

3.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

3.3.1 Prinzip

Bei der *Matrix-assisted Laser Desorption & Ionization Time-of-flight - Mass Spectrometry*, kurz MALDI-TOF-MS, handelt es sich um ein Verfahren der mikrobiologischen Diagnostik. Es wird eine geringe Menge einer Kolonie auf eine Probenplatte (Target) aufgetragen und anschließend mit einer α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure Matrix (CHCA) überdeckt (Schubert und Wieser, 2010, Hosseini und Martinez-Chapa, 2016). Das Absorptionsmaximum der verwendeten Matrix-Lösung sollte im Bereich der Emissionswellenlänge des Lasers liegen, da diese die Qualität des Massenspektrums beeinflusst. Die Matrix kristallisiert mit der Probe im Target, welches sich im Hochvakuum befindet und absorbiert die auftreffende Energie des Hochleistungslasers. Das entstandene Gemisch verdampft. Dies führt zur Ionisierung der Proteine der Probe und die entstandenen Molekül-Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt (Schiller, 2004). Die Molekülmasse und die Ladung der Probe beeinflussen die Flugzeit.

Das Resultat ist ein Gesamtspektrum, welches abhängig von den positiv geladenen ribosomalen Proteinen des Mikroorganismus ist. Da die erhaltenen Spektren charakteristisch für die jeweiligen Spezies sind, können sie mit Referenzdatenbanken verglichen werden (Schubert und Wieser, 2010).

3.3.2 Auswahl der Proben

Für die MALDI-TOF-Analyse wurden die Proben herangezogen, bei denen eine Kultivierung von Erregern auf Selektivmedien und die anschließende Vereinzelung erfolgreich war.

3.3.3 Identifikation der Erreger

Die Identifikation und Auswertung fand am Institut für medizinische Labordiagnostik GmbH der Ruhruniversität Bochum statt. Auch die Berechnung des Score Values fand in Bochum statt, der mathematische Hintergrund ist somit ungeklärt. Hierfür wurde der MALDI Biotyper der Firma Bruker verwendet.

3.4 Biofilm-Färbung

3.4.1 Biofilmbildung in Schläuchen von Kaffeefullautomaten

Für die Überprüfung auf Biofilme innerhalb der Schläuche eines Kaffeefullautomaten wurde die Methode der Färbung mittels Kristallviolett ausgewählt. Diese dient zur Messung der Dichte von Biofilmen (Bladel *et al.*, 2013). Dazu wurden die einzelnen Schlauchstücke zweimal mit sterilem, destilliertem Wasser gespült und anschließend an einem Ende mit Parafilm abgedichtet. Es wurde 1 mL Kristallviolett-Lösung (0,5 %) hinzugegeben, für 20 min bei 30 C inkubiert und ein zweites Mal mit sterilem, destilliertem Wasser gespült. Es erfolgte ein erneutes Abdichten mit Parafilm, die Zugabe von 1 mL Ethanol (96 %) und eine weitere Inkubation für 20 Minuten. Durch das Ethanol wird das von den Bakterienzellen gebundene Kristallviolett herausgelöst (Marti *et al.*, 2011).

Die zurückgebliebene Flüssigkeit aus jedem Schlauchstück wurde in eine Küvette überführt und anschließend die Absorption bei 550 nm gemessen.

Die gemessenen Werte dienen als Indiz für die Präsenz eines Biofilms und seiner Dichte. Je höher die Werte sind, desto mehr Biofilm war in den einzelnen Schlauchabschnitten vorhanden.

3.4.2 Auswahl der Proben

Die untersuchten Schläuche stammten aus einer genutzten Maschine (Jura Impressa S70).

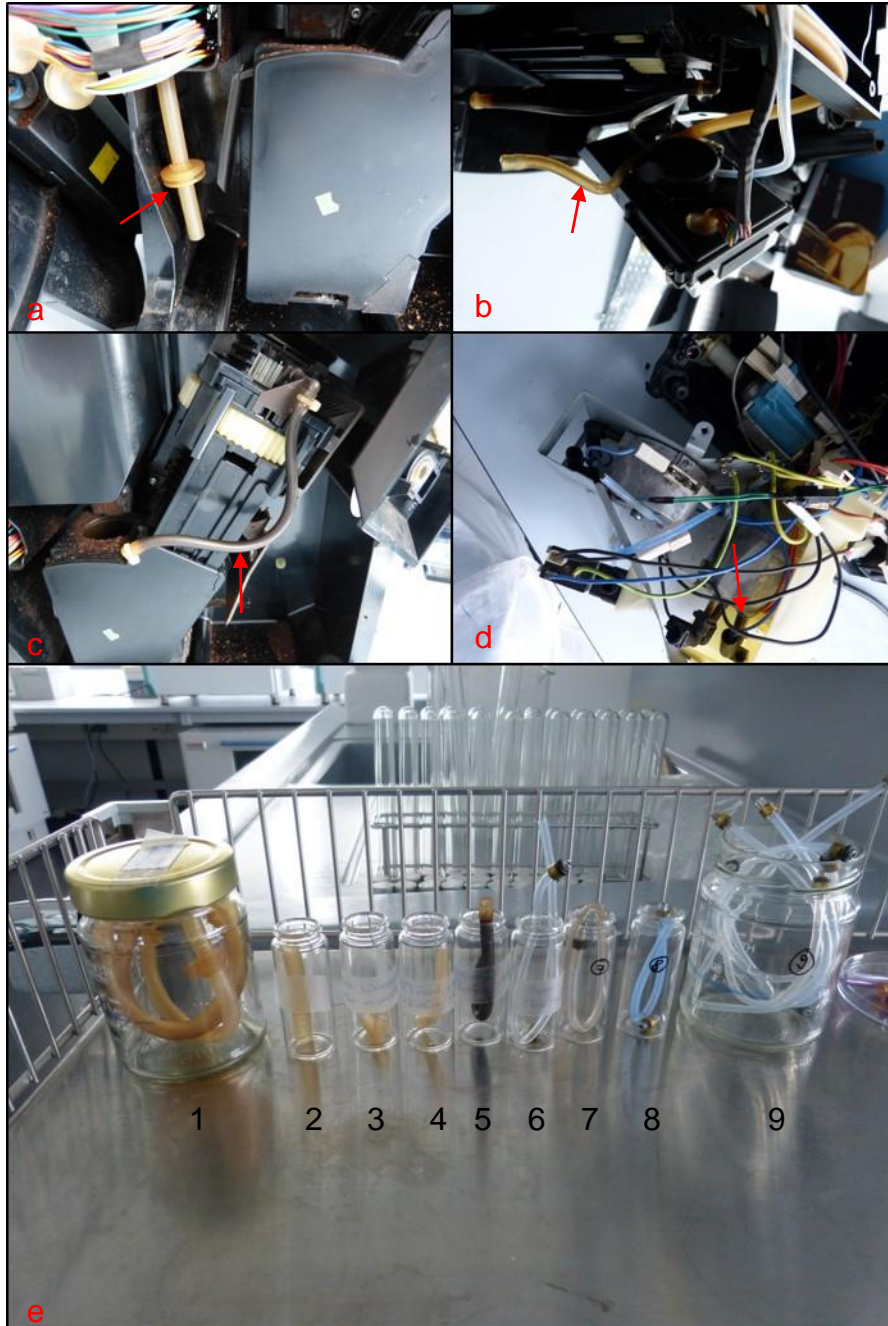


Abbildung 2 Schläuche aus dem genutzten Jura-Kaffee-Vollautomaten.

a) Schlauch von kleiner Frontpumpe zur Wasserschale b) Pumpenschlauch c) Schlauch von der Brüheinheit zum Kaffeeauslass d) Schlauch von der Brüheinheit zu Verteiler (-pumpen) e) Schlauchstücke von links nach rechts 1-9 (1: Schlauch von kleiner Frontpumpe zur Wasserschale, 2: Pumpenschlauch, 3: Schlauch vom Wassertank zur ersten Pumpe, 4: Schlauch von kleiner Frontpumpe zum Kaffeeauslass, 5: Schlauch von der Brüheinheit zum Kaffeeauslass, 6: Schlauch zum Milchaufschäumer, 7/8: Schläuche von der Brüheinheit zu Verteiler (-pumpen), 9: Schlauch innerhalb des Milchaufschäumers)

Tabelle 3 Übersicht der Schläuche und ihrer Anbringungsorte/Funktionen aus Abbildung 2.

Schlauchnummer	Anbringungsort/Funktion
1	von kleiner Frontpumpe zur Wasserschale
2	Pumpenschlauch
3	vom Wassertank zu ersten Pumpe
4	von kleiner Frontpumpe zum Kaffeeauslass
5	von Brüheinheit zum Kaffeeauslass
6	zum Milchaufschäumer
7/8	von Brüheinheit zu Verteiler (-pumpen)
9	innerhalb des Milchaufschäumers

3.5 Sporenfärbung nach Schaeffer-Fulton

3.5.1 Prinzip

Endosporen werden von wenigen Arten grampositiver Bakterien (u.a. *Bacillus* und *Clostridium*) gebildet. Sie sind Zellformen mit stark herabgesetztem Stoffwechsel und sehr widerstandsfähig gegen Austrocknung, Hitze (z.B. langes Erhitzen) und Chemikalien. Sporen entwickeln sich aus der vegetativen Form einer bakteriellen Zelle. Im Gegensatz zu dieser sind Endosporen als Dauer- und Überlebensformen der Bakterienzellen anzusehen (Suerbaum *et al.*, 2012).

Bedingt durch den unterschiedlichen Aufbau von Sporen und vegetativen Zellen ist es möglich, die Sporen anzufärben, jedoch muss dafür eine spezielle Färbemethode angewendet werden. Dies geschieht mit der Malachit-Safranin-Sporenfärbung nach Schaeffer-Fulton.

Hierzu wurde eine Kolonie von der Vereinzellung mit einer Malachitgrün-Lösung hitzefixiert und überschichtet. Im Anschluss daran wurde das Präparat mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit Ethanol überschichtet, um die restliche Farbe herauszulösen. Danach fand ein erneutes Spülen mit destilliertem Wasser statt.

Anschließend folgte die Gegenfärbung mit einer Safranin-Lösung und nach einer kurzen Zeit wurde das Präparat mikroskopiert. Unter dem Mikroskop erscheinen die vorhandenen Sporen grün und die übrigen vegetativen Bakterienzellen rot (Pichhardt, 2013).

3.5.2 Identifikation von Sporen

Es wurde eine Kolonie von den mittels Drei-Ösen-Ausstrich hergestellten Vereinzelungen auf einen Objektträger überführt, auf welchem sich 10 µL 0.9 % NaCl befand und vermischt. Nach einer Hitzefixierung wurde 100 µL Malachitgrün-Lösung hinzugegeben und das Präparat erneut erhitzt. Danach wurde das Präparat mit 5 mL Wasser gespült und mit 100 µL Safranin-Lösung gefärbt. Nach einer kurzen Einwirkzeit bei 37 °C fand eine erneute Spülung der Probe statt und es wurde mikroskopiert.

3.5.2 Alternative Identifikation von Sporen

Die Kaffeeproben aus den gewerblichen Kaffeefullautomaten wurden im Labor nochmal auf 100 °C erhitzt, um die vegetativen Bakterienzellen zu zerstören. Anschließend wurden die Proben zur semiquantitativen Überprüfung auf MEA, TSA und MacConkey–Agar ausgestrichen und inkubiert.

3.6 Einfluss der Wassertemperatur auf die Keimbelastung eines Mehrwegbechers

3.6.1 Hintergrund

Um den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Keimbelastung eines Mehrwegbechers überprüfen zu können, wurden, wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben, Proben aus Mehrwegbechern genommen. Die Identifikation der Keime fand mit Hilfe der MALDI-TOF-MS statt. Nach der Bestimmung der vorhandenen Mikroorganismen wurden die Versuche ins Labor übertragen.

3.6.2 Durchführung

Die identifizierten Keime wurden in Kombination mit einer Auswahl von Keimen der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als standardisierte Keimsuspension in Bechergläser gegeben und für 24 Stunden trocknen gelassen. Für jeden Mikroorganismus wurde zuvor die Ausgangskeimzahl bestimmt. Diese wurde hergestellt, indem eine Flüssigkultur bestehend aus TSB und dem jeweiligen Mikroorganismus inkubiert und anschließend das Nährmedium zentrifugiert wurde. Danach wurde das Pellet in 1 mL NaCl-Lösung resuspendiert und 100 µL jeweils auf die Bechergläser verteilt. In jedem Becherglas befanden sich 500 µL Mischkeimsuspension mit einer Keimzahl von ungefähr 10^8 KbE/mL.

Tabelle 4 Verwendete Keime für die Mischkeimsuspension mit vorher bestimmter Ausgangskeimzahl (KbE/mL) für die Simulation bei Mehrwegbechern.

Mikroorganismen	Ausgangskeimzahl (KbE/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>	$1,4 \cdot 10^9$
<i>Escherichia coli</i>	$6,7 \cdot 10^9$
<i>Enterococcus faecium</i>	$1,5 \cdot 10^9$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$2,7 \cdot 10^9$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	$7,5 \cdot 10^9$

Es wurden diese Keime für die Analysen ausgewählt, da mittels MALDI-TOF-MS Keime dieser Gattungen in Mehrwegbechern und Kaffeefullautomaten gefunden wurden. Für die Überprüfungen ist teilweise nur die Art verändert worden (*Bacillus licheniformis* zu *Bacillus subtilis* und *Acinetobacter johnsonii* zu *Acinetobacter baumannii*). *Enterococcus faecium* wurde aufgrund seiner Temperaturreistenz ausgewählt (Kagemann *et al.*, 2008) und da er in diversen Normen als Test-Mikroorganismus empfohlen wird, u.a. zur Prüfung gewerblicher Geschirrspüler (DIN 10510).

Die verwendeten Gläser sollten in diesem Fall die innere Umgebung der Mehrwegbecher simulieren. Anschließend sind die eingetrockneten Keime mit unterschiedlich temperiertem Wasser (50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C)

übergossen und für eine bzw. fünf Minuten stehen gelassen worden. Die danach eventuell im Wasser enthaltenen Keime (KbE/mL) wurden mittels dezimaler Verdünnungsreihe bestimmt und die temperaturabhängigen, logarithmischen Reduktionsfaktoren (LR) errechnet (DGHM, 2001).

3.7 Simulationen zur keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeevollautomaten

Für die Untersuchung der keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeevollautomaten wurde das Modell Philips HD 8844 verwendet.

Es kann von einer keimreduzierenden Wirkung der Maschine durch den Parameter Temperatur ausgegangen werden, denn vegetative Zellen von Mikroorganismen sterben bei einem Temperatureinfluss von ungefähr 60 °C für ca. fünf Minuten (Fuchs, 2007). Die Temperatur des Wassers erreicht in dieser Maschine bis zu 140 °C an der Brüheinheit und die Kaffeeausgabetemperatur ist variierbar. Es gibt drei Stufen: Minimum, Medium und Maximum, welche jeweils einmal mit einem Infrarotthermometer gemessen wurden.

Tabelle 5 Kaffeeausgabetemperatur des Vollautomaten Philips HD 8844.

Temperatureinstellung	Temperatur
Minimum	62,4 °C
Medium	65,1 °C
Maximum	68,2 °C

Die Maschine wurde über acht Wochen lang täglich bedient, um einen alltäglichen Gebrauch zu simulieren.

Basierend auf diesen Grundlagen und in Kombination mit den identifizierten Keimen aus gewerblichen Kaffeevollautomaten wurde die Maschine mit einer standardisierten Keimsuspension versetzt. Diese wurde zum Wasser (je 1 L plus 1 mL Keimsuspension) in den Wassertank gegeben und die Maschine gestartet. Jede Temperatureinstellung wurde dreifach überprüft.

Da vier Tassen (200 mL/Tasse) pro ein Liter Wasser hergestellt werden können, wurde aus jeder dieser Tassen eine Probe genommen und analysiert. Zwischen den einzelnen Temperatureinstellungen wurde die Maschine wie in der Bedienungsanleitung beschrieben komplett gereinigt. Anschließend fand die Überprüfung der ausgegebenen Flüssigkeit wie unter 3.2.1 beschrieben statt.

Tabelle 6 Verwendete Keime für die Mischkeimsuspension mit vorher bestimmter Ausgangskeimzahl (KbE/mL) für die Simulation zur keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeevollautomaten.

Mikroorganismen	Ausgangskeimzahl (KbE/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7,5*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis</i>	1,4*10 ⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	1,5*10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	6,7*10 ⁹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2*10 ⁹
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,7*10 ⁹

Pseudomonas aeruginosa wurde hier zusätzlich verwendet, da dieser häufig bei der Analyse der Wassertanks und Ausläufen der Haushaltskaffeevollautomaten auftrat.

3.8 „Total Organic Carbon“-Überprüfung

3.8.1 Prinzip

Der Begriff „total organic carbon“ (TOC) beschreibt die gesamte Menge an Kohlenstoff gebunden in/an ein anderes Medium, zum Beispiel Wasser. Jedoch ist durch ihn nicht differenzierbar, um welchen Kohlenstoff (anorganisch/organisch) bzw. welche organischen Verbindungen es sich handelt (Hoell, 2011). Die organischen Wasserinhaltsstoffe werden oxidiert und können anschließend durch unterschiedliche Methoden gemessen werden. Die Oxidation kann durch chemische Oxidation, Verbrennung oder mittels UV-Bestrahlung erfolgen. Mit Hilfe eines Trägergases wird das gebildete Kohlenstoffdioxid in ein Messsystem überführt und nach einer Reduktion zu Methan zum Beispiel mittels Infrarot-Spektrometrie seine Masse bestimmt (Quentin, 2013). Wichtig ist jedoch, dass der anorganisch gebundene Kohlenstoff im Wasser vorher entfernt wird.

3.8.2 Analyse des TOC- Gehaltes in der Spülflüssigkeit eines Kaffeevollautomaten

Vor jeder neuen Verwendung findet bei dem Kaffeevollautomaten HD 8844 der Marke Philips ein so genanntes „Durchspülen“ statt. Dies bedeutet, dass das restliche Wasser inklusive Kaffeeresten und anderen Substanzen aus den Schläuchen gepumpt wird.

Diese Spülflüssigkeit wurde aufgefangen und mit dem Gerät multi N/C 2100 S der Firma analytikjena analysiert. Hierzu wurden jeweils 4 mL der Probe mit 50 µL 2 molarer Salzsäure versetzt. Anschließend fand eine Kalibrierung des Gerätes mit genormten Flüssigkeiten kombiniert mit bestimmten Kohlenstoffgehalten statt.

Als Proben fungierten die Flüssigkeiten nach einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs und sieben Wochen sowie die Spülflüssigkeit nach der Simulation mit der Keimsuspension an der Testmaschine (zwischen Woche sechs und sieben). So sollte mit Hilfe der Messung ein eventueller Anstieg der organischen Kohlenstoffmenge innerhalb der Maschine überprüft werden.

4. Ergebnisse

4.1 Gesamtkeimzahl der analysierten Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben

4.1.1 Proben aus dem gewerblichen Bereich

Es wurden jeweils 50 Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben aus gewerblich genutzten Kaffeefullautomaten entnommen. Die mikrobiologische Belastung sowie die Ausgabetemperatur variierten hierbei sehr stark. In der folgenden Tabelle werden die mittleren Gesamtkeimzahlen und die mittleren Ausgabetemperaturen dargestellt.

Sowohl Maschinen, die nur für den gewerblichen Bereich produziert werden, als auch für den Haushaltsbereich bestimmte Automaten fanden sich bei der Probennahme im gewerblichen Bereich wieder.

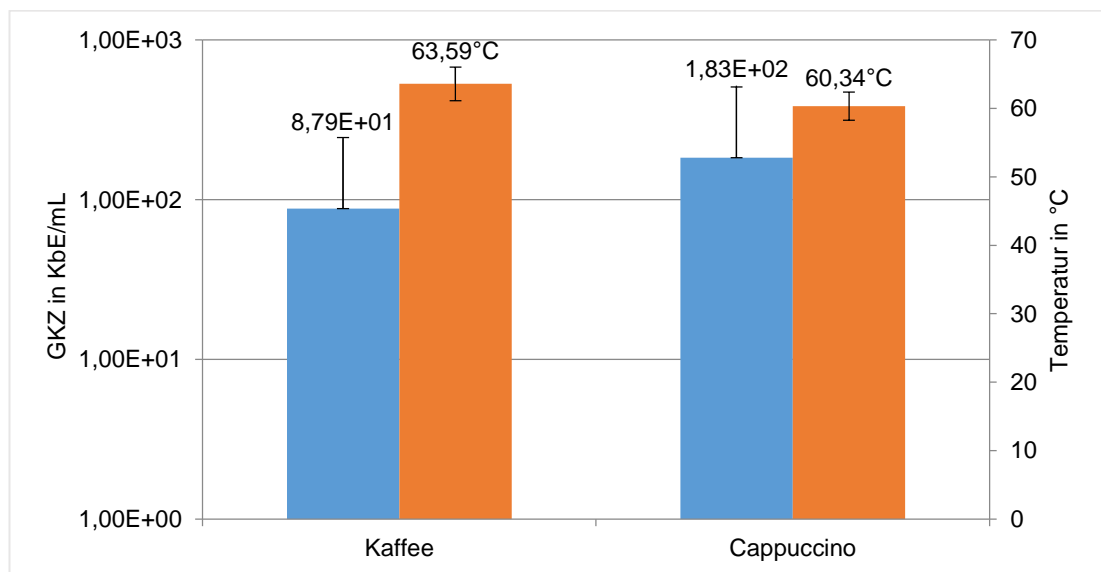


Abbildung 3 Ergebnisse der gewerblichen Kaffeefullautomaten.

(Standardabweichung: Kaffee: GKZ ($1,57E+02$ KbE/mL), Temperatur (2,45); Cappuccino: GKZ ($3,26E+02$ KbE/mL), Temperatur (2,07)).

Durch die starke Variation an Ausgabetemperaturen sowohl bei Kaffee- als auch Cappuccino-Getränkeproben wurden die Temperaturen gruppiert. In Tabelle 7 werden die Gruppierungen beider Kaffe Zubereitungsarten skizziert.

Tabelle 7 Temperaturgruppierungen der Kaffee- und Cappuccino-Proben aus gewerblichen Maschinen. Es wird ebenfalls die jeweils zugehörige Probenanzahl (n) aufgeführt.

Kaffee	Probenanzahl	Cappuccino	Probenanzahl
X °C - 62 °C	12	X °C - 60 °C	19
62 °C - 64 °C	15	60 °C - 62 °C	19
64 °C - 66 °C	14	62 °C - 64 °C	12
66 °C - X °C	9		

Von den jeweiligen Gruppen wurde die durchschnittliche GKZ (auf TSA ausgestrichen) errechnet und auf ihre Abhängigkeit zueinander überprüft.

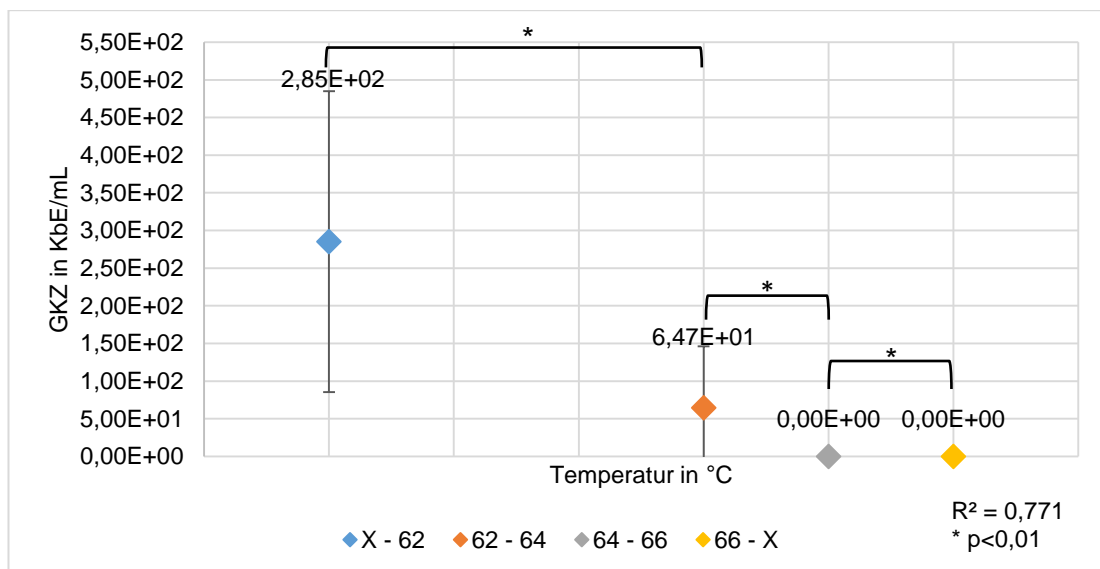


Abbildung 4 Darstellung der GKZ gegen die gruppierten Temperaturen der Kaffeeproben aus dem gewerblichen Bereich. n=50.

Abbildung 4 stellt dar, dass mit steigender Kaffeeausgabetemperatur die mikrobiologische Belastung abnahm. In einem Temperaturbereich zwischen X °C und 62 °C lag die durchschnittliche Gesamtkeimzahl bei 2,85E+02 KbE/mL, wohingegen die GKZ in dem Temperaturbereich zwischen 62 °C und 64 °C bei 6,47E+01 KbE/mL. Bei Temperaturen über 64 °C konnten keine Mikroorganismen nachgewiesen werden.

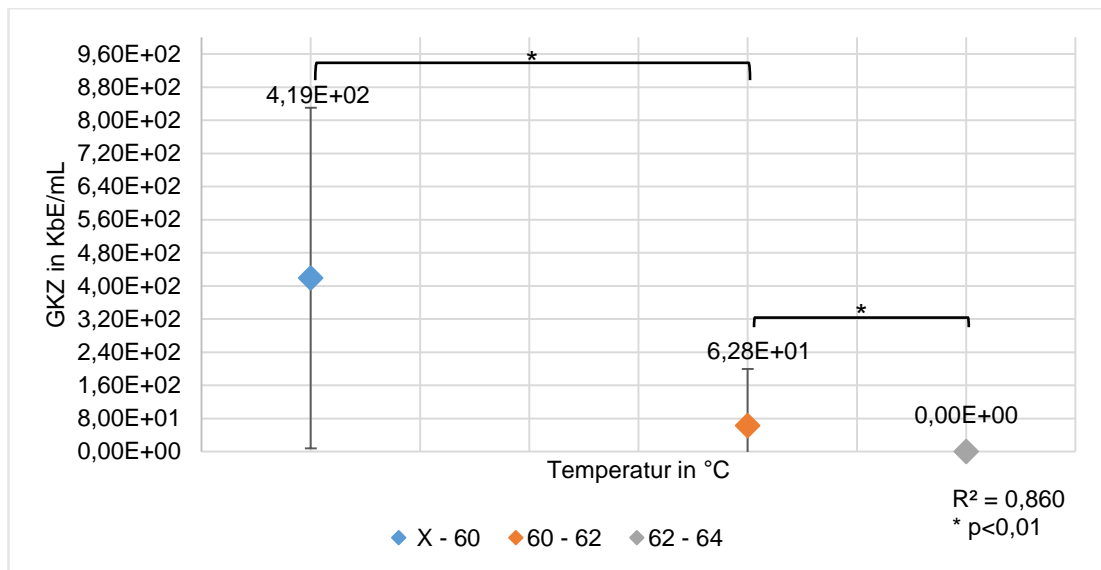


Abbildung 5 Darstellung der GKZ gegen die gruppierten Temperaturen der Cappuccino-Proben aus dem gewerblichen Bereich. n=50.

Die gemessenen Werte sowohl bei Kaffee als auch Cappuccino sind alle zueinander signifikant innerhalb eines Signifikanzniveaus von $p < 0,01$.

4.1.2 Proben aus privaten Haushalten

Im Haushaltsbereich wurden zehn Kaffee- sowie zehn Wassertank- und Auslaufproben genommen. Bei den Wassertank- und Auslaufproben handelte es sich um Abstriche, beim Kaffee um Flüssigproben.

In der folgenden Abbildung sind die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen (GKZ) des Kaffees sowie die gemittelten Gesamtkeimzahlen aus den Wassertanks und den Ausläufen visualisiert.

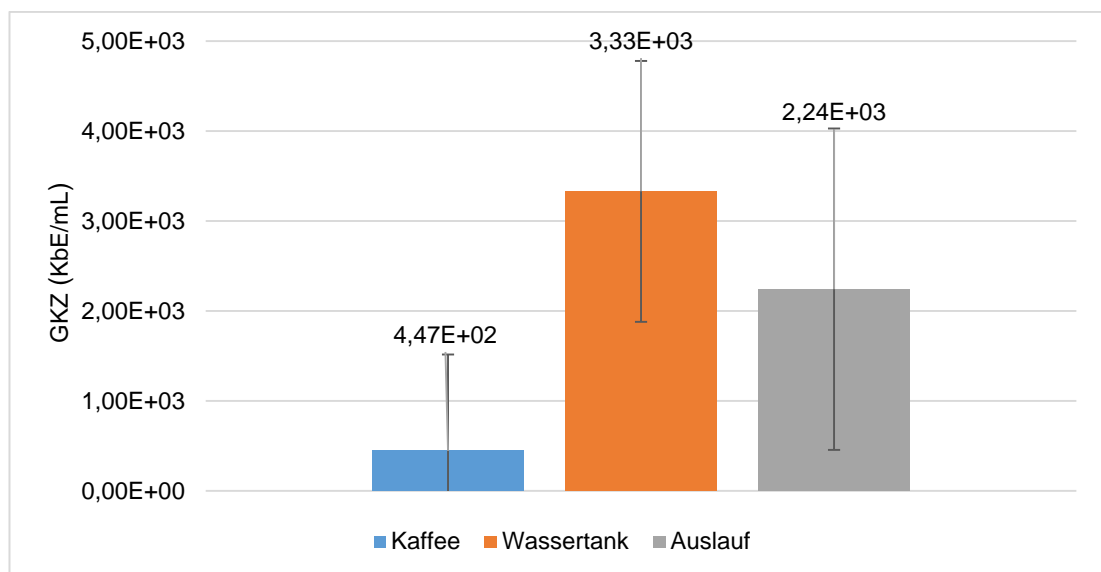


Abbildung 6 Übersicht der GKZ in KbE/mL der Proben aus Kaffeehaushaltsvollautomaten. Die Kaffeeproben hatten im Durchschnitt eine Temperatur von 61,32 °C (Standardabweichung: 3,44). n=10.

Die individuellen Keimzahlen und Temperaturen der einzelnen Geräte (privat und gewerblich) sind im Anhang aufgeführt.

4.2 Identifikation von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Mittels MALDI-TOF-MS wurden alle Proben, bei denen Mikroorganismen nachgewiesen wurden, analysiert. Die unterschiedlichen Kolonien wurden vereinzelt und der Nachweis erfolgte mit Reinkulturen. Häufig konnten keine Mikroorganismen exakt identifiziert werden, da der Score Value zu gering war und so keine genauen Aussagen getroffen werden konnten. Es ließen sich jedoch die Gattungen identifizieren.

In Tabelle 8 ist eine Auswahl der identifizierten Organismen aufgeführt. Es werden nur die Proben von den am häufigsten auftretenden Keimen mit einem Score Value oberhalb von 2,00 dargestellt.

In der ersten Spalte ist die Probennummer aufgeführt. Diese Probennummer bezieht sich auf die Nummerierung für private Geräte (1-10). Dies gilt ebenfalls für die Nummerierung der Mehrwegbecher (1-10).

In der fünften Spalte steht der Score Value. Dieser gibt Auskunft über die Sicherheit des Ergebnisses, d.h. wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass der richtige Organismus identifiziert wurde.

Tabelle 8 Auswahl der mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Mikroorganismen aus Haushaltskaffeefüllautomaten (Kaffee, Wassertank, Auslauf) und Mehrwegbechern auf MacConkey-Agar (=M), TSA (=T) und MEA (=Me). A= Auslauf, HK= Haushaltskaffeefüllautomat, W= Wassertank, GK= gewerblicher Kaffeefüllautomat, MB= Mehrwegbecher. Einordnung des Score Values: 0,00-1,69= keine Identifikation möglich; 1,70-1,99= geringe bis mittlere Sicherheit; 2,00-3,00= hohe Sicherheit.

Nummer	Probenart	Agar	Organismus	Score Value
1.1	A	M	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,01
1.2	A	Me	<i>Candida pararugosa</i>	2,04
3.1	HK	M	<i>Bacillus cereus</i>	2,11
3.2	HK	M	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,21
5	HK	T	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,09
6	HK	T	<i>Escherichia coli</i>	2,20
7	HK	T	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,04
2	MB	T	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,17
1	W	M	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,29
4	W	T	<i>Microbacterium oxydans</i>	2,10
5	W	T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,12
12	GK	T	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,13
15	GK	M	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,24
23	GK	T	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,09
32	GK	M	<i>Bacillus cereus</i>	2,24
38	GK	M	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,15
39	GK	T	<i>Microbacterium oxydans</i>	2,02
46	GK	M	<i>Bacillus cereus</i>	2,18

Es konnten auch Hefen der Gattungen *Candida*, *Rhodotorula* und *Meyerozyma* nachgewiesen werden.

Eine detaillierte Aufzählung aller identifizierten Keime befindet sich im Anhang.

4.3 Analyse der Biofilmanfärbung

Für die Überprüfung auf Biofilme innerhalb der Schläuche eines Kaffeevollautomaten wurde die Methode der Färbung mittels Kristallviolett ausgewählt. Diese dient zur Messung der Dichte von Biofilmen (Bladel *et al.*, 2013). Die gemessenen Schlauchteile stammen von einer defekten Maschine der Marke Jura. Unter Punkt 3.4.2 werden die verwendeten Schlauchstücke nummeriert dargestellt. Diese Nummerierung ist identisch zu der in der folgenden Tabelle verwendeten Nummerierung.

Tabelle 9 Ergebnisse der Anfärbung von Biofilmen in Schlauchstücken eines Kaffeevollautomaten (dargestellt als OD₅₅₀).

Probe	Ergebnis
1	0,228
2	4,625
3	5,674
4*	2,389
	2,282
5	12,61
6	1,514
7	0,738
8	3,774
9	0,514

* Anzahl >2

Tabelle 10 Ampelsystem zur Einordnung der Ergebnisse der Biofilmfärbung.

0,00 – 1,00	gering
1,00 – 3,00	mittel
3,00 – 5,00	hoch
5,00 – 15,00	sehr hoch

Prinzipiell lässt sich bei dieser Färbemethode eine Aussage über die Menge des vorhandenen Biofilms treffen; je höher der gemessene Wert ist, desto mehr Biofilm ist vorhanden.

Es ist anhand der Ergebnisse zu erkennen, dass das Ausmaß der Biofilmbildung innerhalb der Schläuche eines Kaffeevollautomaten stark variiert (von gering bis sehr hoch).

4.4 Ergebnisse der Versuchsreihe mit Mehrwegbechern

4.4.1 Mikrobielle Belastung von Mehrwegbechern

Insgesamt wurden stichprobenartig zehn Proben von natürlich kontaminierten Mehrwegbechern genommen, d.h. es konnten keine Rückschlüsse auf Gebrauch, Nutzungsdauer, Alter, Reinigung oder Art der Befüllung gezogen werden. Die Keimlast wurde jeweils über Verdünnungsreihen auf Selektivmedien bestimmt.

Die folgende Abbildung zeigt die Keimbelastung der Mehrwegbecher auf den Selektivmedien TSA und MacConkey.

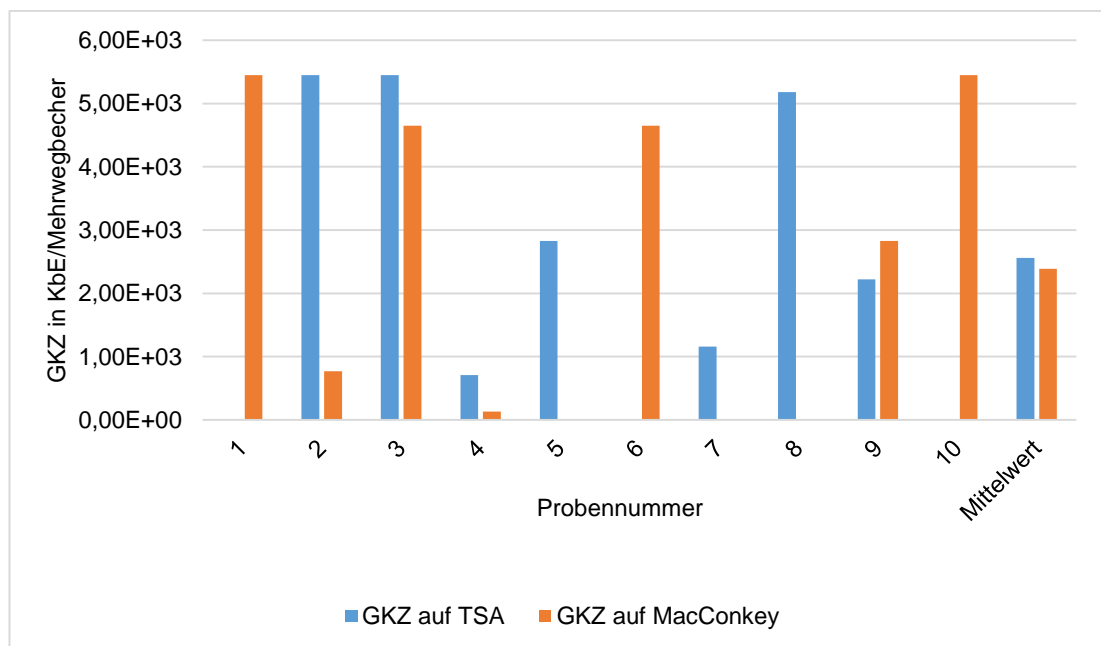


Abbildung 7 GKZ in KbE/Mehrwegbecher der Mehrwegbecherproben.

Die Skalierung der y-Achse ist wegen den Ergebnissen auf diese Weise dargestellt.

Anhand Abbildung 7 ist zu erkennen, dass bis auf wenige Ausnahmen die Mehrwegbecher eine hohe mikrobielle Belastung aufwiesen. Lediglich bei den Proben 1, 6 und 10 (TSA) und den Proben 5,7 und 8 (MacConkey) konnten keine Keimzahlen ermittelt werden.

Die durchschnittliche mikrobielle Belastung bei der stichprobenartigen Überprüfung von Mehrwegbechern lag bei $2,56E+03$ KbE/Mehrwegbecher auf TSA und $2,39E+03$ KbE/Mehrwegbecher auf MacConkey-Agar.

4.4.2 Simulation zum Einfluss der Wassertemperatur auf die Keimbelastung in Mehrwegbechern

Die Temperatur besitzt eine große keimreduzierende Wirkung und aufgrund der starken mikrobiologischen Belastung von Mehrwegbechern und den gemessenen Temperaturen bei der Probennahme im privaten und gewerblichen Bereich wurde eine Versuchsreihe angelegt. Diese sollte den Einfluss unterschiedlicher Temperaturen für bestimmte Zeitabschnitte (eine und fünf Minuten) auf die Keimreduzierung untersuchen. Es wurden wie unter 3.6 die Temperaturstufen 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C jeweils in dreifacher Wiederholung überprüft.

Fünf Minuten Einwirkzeit

Es werden in der anschließenden Tabelle die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen und die logarithmischen Reduktionsfaktoren der jeweiligen Temperatur aufgeführt.

Tabelle 11 Darstellung der durchschnittlichen GKZ in KbE/mL und der logarithmischen Reduktionsfaktoren (LR) bei einer Einwirkzeit von fünf Minuten. Die Ausgangskeimzahl betrug annähernd $1,00E+08$ KbE/mL.

Temperatur	GKZ	LR
50 °C	4,20E+06	1,38
60 °C	3,12E+06	1,51
70 C	0,00E+00	>8,00
80 °C	0,00E+00	>8,00
90 °C	0,00E+00	>8,00

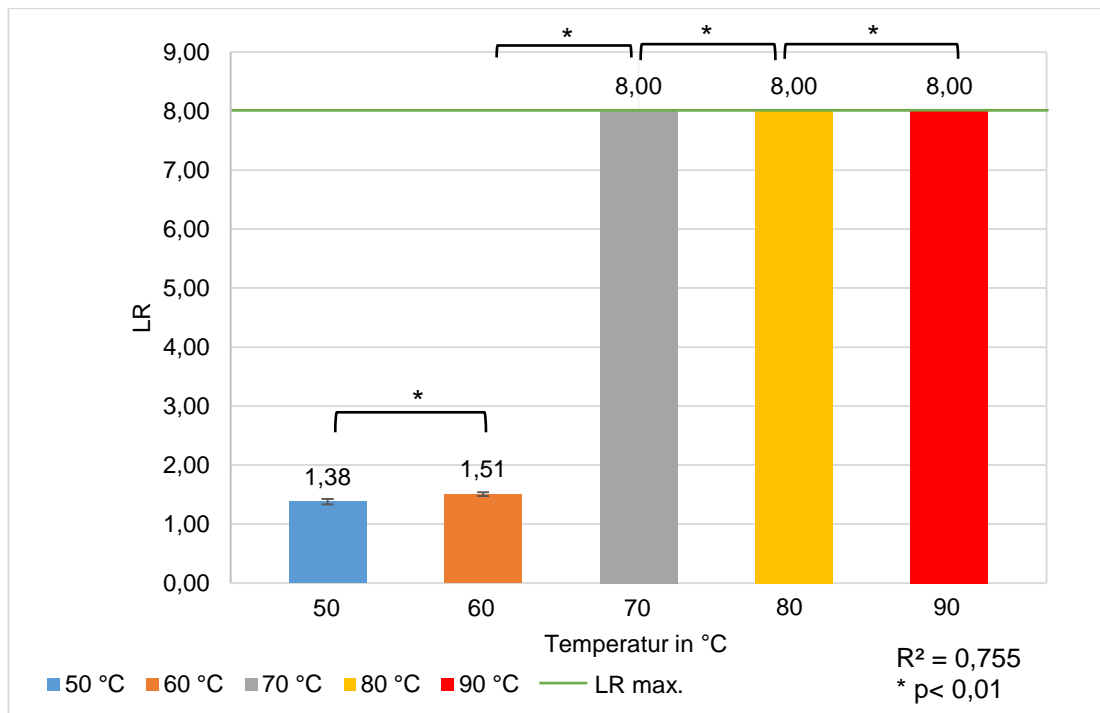


Abbildung 8 Einfluss der Wassertemperatur auf den LR, Einwirkzeit von fünf Minuten. n=15.

Die logarithmischen Reduktionsfaktoren der Einwirkzeit von fünf Minuten des temperierten Wassers bei den Temperaturen von 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C sind zueinander signifikant. Sie liegen in einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

Anhand Tabelle 11 und Abbildung 8 wird deutlich, dass die höchste Reduktion im Temperaturbereich zwischen 60 °C und 70 °C stattfindet. Dies ist daran zu erkennen, dass bei 60 °C eine GKZ von $3,12E+06$ KbE/mL (LR von 1,51) ermittelt wurde und bei 70 °C eine Reduktion oberhalb der Nachweisgrenze erreicht wurde (LR von $>8,00$).

Auf Grundlage dessen wurde dieser Temperaturbereich genauer betrachtet, indem die Temperaturen 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C und 68 °C überprüft wurden.

Tabelle 12 Darstellung der durchschnittlichen GKZ und der LR für die untersuchten Temperaturen bei einer Einwirkzeit von fünf Minuten. Die Ausgangskeimzahl betrug etwa 1,00E+08 KbE/mL.

Temperatur	GKZ	LR
60 °C	3,56E+05	2,45
62 °C	2,16E+05	2,67
64 °C	3,02E+04	3,52
66 °C	3,70E+03	4,44
68 °C	0,00E+00	>8,00

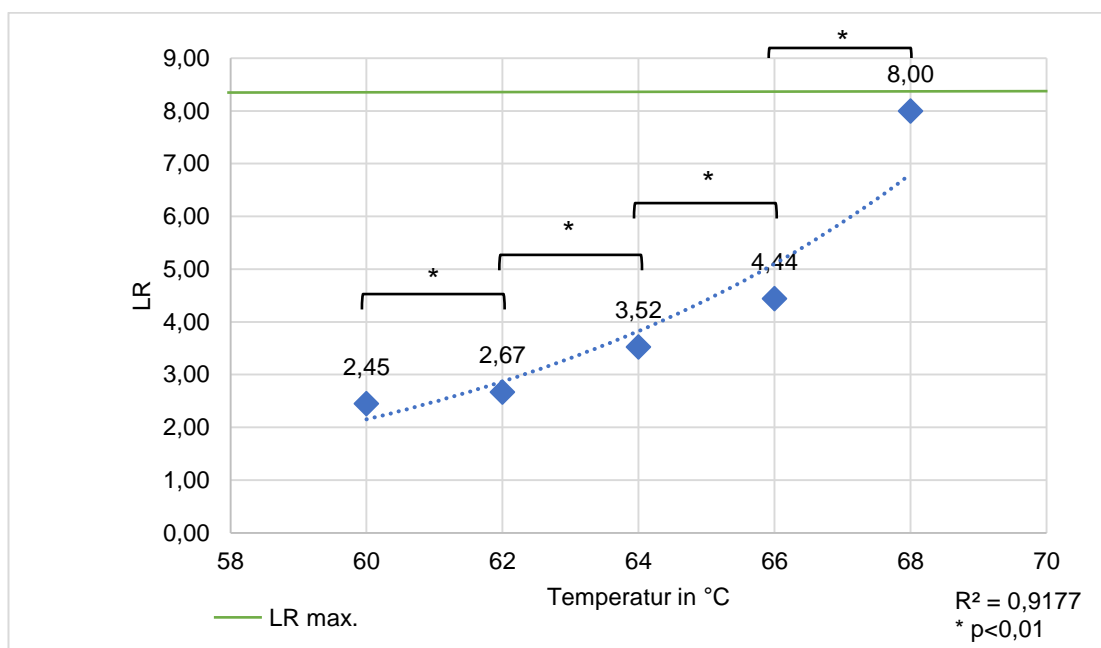


Abbildung 9 Einfluss der Wassertemperatur auf den LR.

Einwirkzeit von fünf Minuten. Standardabweichung: LR 2,45 (0,03), LR 2,67 (0,07), LR 3,52 (0,06), LR 4,44 (0,08); wird nicht abgebildet, da sie sehr gering ist. n=15.

Die logarithmischen Reduktionsfaktoren der Einwirkzeit von fünf Minuten des temperierten Wassers bei den Temperaturen von 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C und 68 °C sind zueinander signifikant innerhalb eines Signifikanzniveaus von $p < 0,01$.

Durch die Tabelle 12 und Abbildung 9 ist erkenntlich, dass die Wassertemperatur (damit verbunden die Kaffeeausgabetemperatur) mindestens über 66 °C (GKZ von 3,70E+03 KbE/mL und LR von 4,44) in Bezug auf eine mikrobiologische Unbedenklichkeit liegen sollte.

Eine Minute Einwirkzeit

Im folgenden Abschnitt werden ebenfalls die mittleren Gesamtkeimzahlen und die LR der jeweiligen Temperaturen skizziert.

Tabelle 13 Darstellung der mittleren GKZ in KbE/mL und der LR bei einer Einwirkzeit von einer Minute. Die Ausgangskeimzahl betrug ungefähr $1,00E+08$ KbE/mL.

Temperatur	GKZ	LR
50 °C	9,05E+06	1,09
60 °C	1,85E+06	1,74
70 °C	0,00E+00	>8,00
80 °C	0,00E+00	>8,00
90 °C	0,00E+00	>8,00

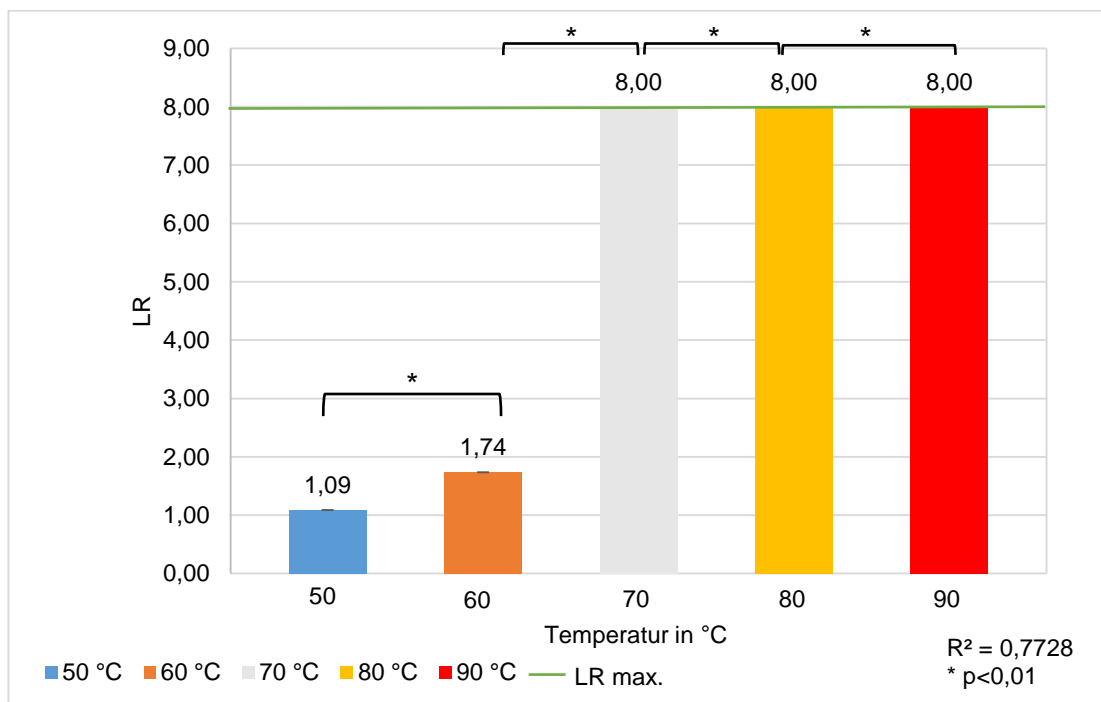


Abbildung 10 Einfluss der Wassertemperatur auf den LR, Einwirkzeit von einer Minute. n=15.

Die logarithmischen Reduktionsfaktoren der Einwirkzeit von einer Minute des temperierten Wassers bei den Temperaturen von 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C sind zueinander signifikant innerhalb eines Niveaus von $p < 0,01$.

Anhand Tabelle 13 und Abbildung 10 wird bei einer Einwirkzeit von einer Minute deutlich, dass die höchste Reduktion im Temperaturbereich zwischen 60 °C und 70 °C stattfindet. Dies ist in diesem Falle daran zu erkennen, dass bei 60 °C eine GKZ von 1,85E+06 KbE/mL (LR von 1,74) ermittelt wurde und bei 70 °C eine Reduktion oberhalb der Nachweisgrenze erreicht wurde (LR von >8,00).

Auf Grundlage dessen wurde wiederholt dieser Temperaturbereich genauer betrachtet, indem die Temperaturen 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C und 68 °C überprüft wurden.

Tabelle 14 Darstellung der durchschnittlichen GKZ und der LR für die untersuchten Temperaturen bei einer Einwirkzeit von einer Minute. Die Ausgangskeimzahl betrug etwa 1,00E+08 KbE/mL.

Temperatur	GKZ	LR
60 °C	1,71E+06	1,77
62 °C	1,75E+06	1,77
64 °C	1,62E+04	3,79
66 °C	7,11E+03	4,03
68 °C	0,00E+00	>8,00

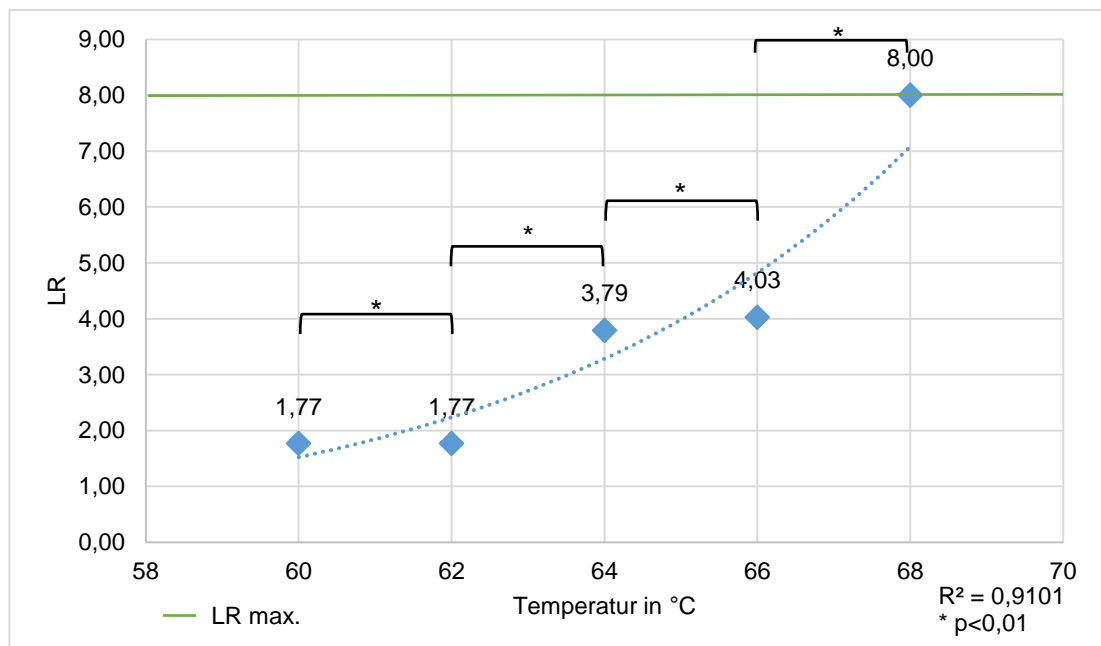


Abbildung 11 Einfluss der Wassertemperatur auf den logarithmischen Reduktionsfaktor.

Einwirkzeit von einer Minute. Standardabweichung: LR 1,77 (0,03), LR 1,77 (0,10), LR 3,79 (0,06), LR 4,03 (0,06) wird nicht abgebildet, da sie sehr gering ist. n=15.

Die logarithmischen Reduktionsfaktoren der Einwirkzeit von einer Minute des temperierten Wassers bei den Temperaturen von 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C und 68 °C sind zueinander signifikant innerhalb eines Niveaus von $p < 0,01$.

Anhand Tabelle 14 und Abbildung 11 ist festzustellen, dass die Wassertemperatur (damit verbunden die Kaffeeausgabetemperatur) mindestens über 66 °C (GKZ von $7,11 \cdot 10^3$ KbE/mL und LR von 4,03) in Bezug auf eine mikrobiologische Unbedenklichkeit liegen sollte.

4.5 Simulation zur keimreduzierenden Wirkung eines Kaffeevollautomaten

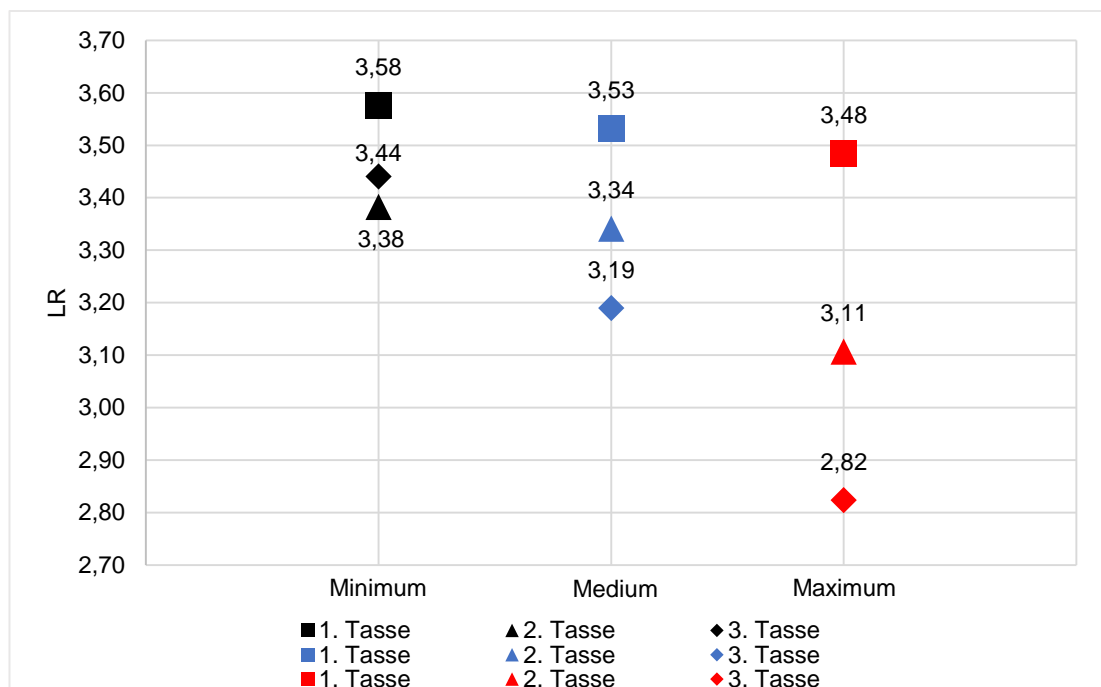


Abbildung 12 Darstellung der durchschnittlichen logarithmischen Reduktionsfaktoren zu den jeweiligen Temperatureinstufen.

(Minimum (61,9 °C–64,2 °C), Medium (66,1 °C–68,9 °C), Maximum (68,3 °C–70,1 °C)). Standardabweichung: *Minimum*: LR 3,58 (0,45), LR 3,38 (0,48), LR 3,44 (0,43), *Medium*: LR 3,53 (0,34), LR 3,34 (0,40), LR 3,19 (0,38), *Maximum*: LR 3,48 (0,45), LR 3,11 (0,41), LR 2,82 (0,37). Diese werden im Diagramm nicht angezeigt, da sie sich überschneiden.

In der Abbildung 12 sind die logarithmischen Reduktionsfaktoren der jeweiligen Tassen und zugehörigen Temperatureinstellungen dargestellt. Die LR schwanken zwischen maximal 3,58 (1. Tasse Medium) und minimal 2,82 (3. Tasse Maximum). Mit Ausnahme der Temperatureinstufe Minimum sinkt mit steigender Tassenanzahl die LR. Es ist anzumerken, dass die LR von verschiedenen Ausgangskeimzahlen errechnet wurden. Da diese unterschiedlich waren wurde zusätzlich zur LR die prozentuale Reduktion errechnet. So wird die jeweilige Reduktion auf die zugehörige Ausgangskeimzahl der Versuchsreihe bezogen und die Schwankungen innerhalb der Ausgangskeimzahlen werden dadurch ausgeglichen (vgl. Tabelle 16).

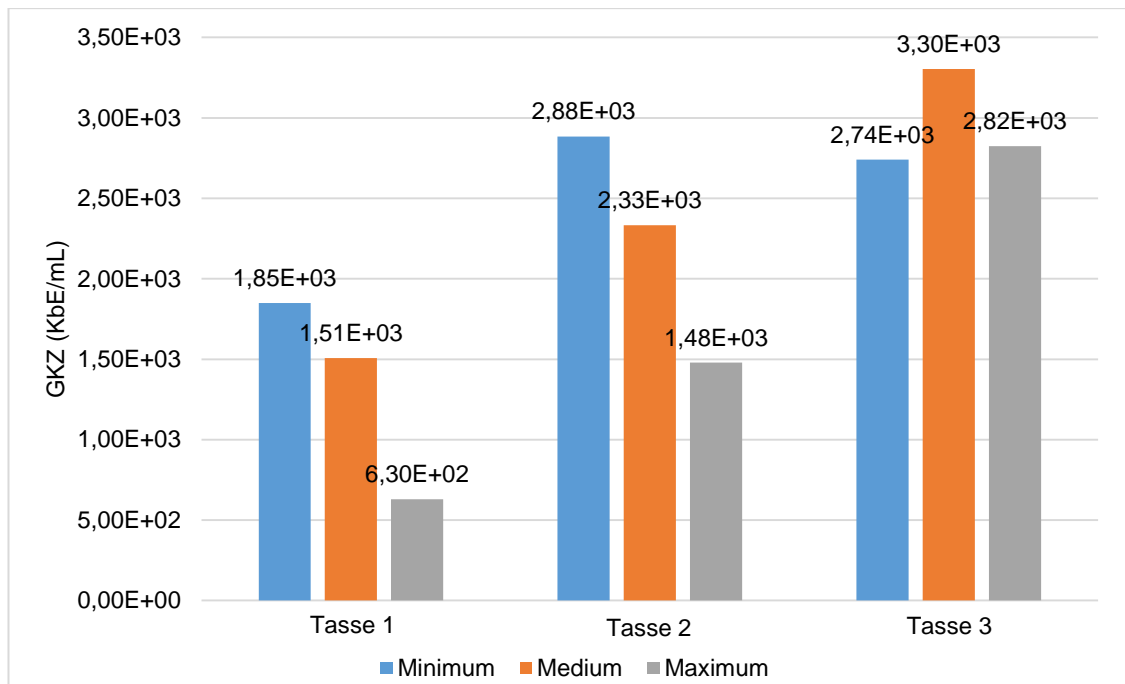


Abbildung 13 Darstellung der Gesamtkeimzahlen der jeweiligen Tassen (Tasse 1, Tasse 2, Tasse 3). Tasse 4 lag oberhalb des Maximums.

In Abbildung 13 sind die Gesamtkeimzahlen der jeweiligen Tassen gruppiert. Hier ist zu erkennen, dass bei jeder Temperatureinstellung mit steigender Tassenanzahl die mikrobiologische Belastung zunimmt. Die Ausnahme stellen Tasse 2 und Tasse 3 der Temperatureinstellung Minimum dar.

Tabelle 15 Durchschnittliche Ausgangskeimzahl der jeweiligen Temperatureinstellungen.

	Minimum	Medium	Maximum
GKZ (KbE/mL)	1,21E+07	7,40E+06	2,49E+06

Tabelle 16 Übersichtsdarstellung der Parameter der jeweiligen Temperatureinstellungen und Tassen.

	Parameter	Minimum	Medium	Maximum
1. Tasse	KbE/mL	1,85E+03	1,51E+03	6,30+02
	LR	3,58	3,53	3,48
	Temperatur in °C	63,93	67,00	68,77
	%-Reduktion	50,49	51,41	54,49
2. Tasse	KbE/mL	2,88E+03	2,33E+03	1,48E+03
	LR	3,38	3,34	3,11
	Temperatur in °C	62,27	68,33	69,40
	%-Reduktion	47,77	48,64	48,58
3. Tasse	KbE/mL	2,74E+03	3,30E+03	2,82E+03
	LR	3,44	3,19	2,82
	Temperatur in °C	63,33	66,60	68,90
	%-Reduktion	48,58	46,44	44,15
4. Tasse	KbE/mL	/	/	/
	LR	/	/	/
	Temperatur in °C	63,60	67,00	69,70
	%-Reduktion	/	/	/

Anhand Tabelle 16 ist deutlich zu erkennen, dass die Keimzahl mit steigender Tassenanzahl unabhängig von der Temperatureinstellung steigt (z.B. 1. Tasse Medium: 1,51E+03 KbE/mL und 3. Tasse Medium: 3,30E+03 KbE/mL). Eine Folge daraus ist, dass der logarithmische Reduktionsfaktor dementsprechend mit steigender Tassenanzahl sinkt. Eine Ausnahme bildet hier die 2. und 3. Tasse der Temperatureinstellung Minimum. Es ist anzumerken, dass bei jeder 4. Tasse keine Keimzahlen ermittelt werden konnten, weil diese über dem Maximum von 300 KbE/pro Platte lagen.

Im Anhang befinden sich hierzu alle detaillierten Temperaturen, Keimzahlen und logarithmischen Reduktionsfaktoren.

4.6 Überprüfung der Spülflüssigkeit eines Kaffeefullautomaten

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur TOC-Überprüfung dargestellt. Die Überprüfung fand zweifach statt, da bei der ersten Überprüfung die Kohlenstoffgehalte über der Nachweisgrenze lagen.

Tabelle 17 TOC-Gehalt der Spülflüssigkeiten (Volumen = 100 µL). Simulation bezeichnet die Versuche an dem Haushaltskaffeefullautomaten Philips HD 8844.

Bezeichnung	Gehalt
Woche 1	3,8 g/L
Woche 2	3,8 g/L
Woche 3	5,0 g/L
Woche 4	4,0 g/L
Woche 5	9,0 g/L
Woche 6	44,4 g/L
Simulation	42,6 g/L
Woche 7	33,9 g/L

Der TOC-Gehalt nimmt innerhalb des gemessenen Zeitraums von der ersten Woche mit einem Gehalt von 3,8 g/L bis zu seinem Maximum in Woche sechs mit einem Gehalt von 44,4 g/L zu. Zwischen Woche sechs und sieben fand die Simulation mit dem verwendeten Kaffeefullautomaten statt. Hier liegt der TOC-Gehalt bei einem Wert von 42,6 g/L. Diese Werte wurden aus den verdünnten Proben errechnet.

5. Diskussion

Für die Quantifizierung und Identifizierung der in Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben vorkommenden Mikroorganismen wurden jeweils 50 Kaffee- und Cappuccino-Proben von unterschiedlichen Kaffeevollautomaten aus dem gewerblichen Bereich untersucht. Zudem wurden von zehn Geräten aus privaten Haushalten Kaffee-Getränkeproben sowie Abstriche aus Wassertanks und Kaffeelaufleitungen überprüft. Es wurden keine Angaben über das Alter, die Nutzungsdauer, die Nutzungshäufigkeit, die Anzahl der Getränkeausgaben oder das Reinigungsverhalten erhoben. Lediglich der Maschinentyp (gewerbliches Gerät oder Haushaltsgerät) wurde festgehalten. Außerdem wurde bei allen Proben die Ausgabetemperatur des jeweiligen Getränks unmittelbar nach der Ausgabe gemessen.

Zusätzlich wurden stichprobenartig zehn natürlich kontaminierte Mehrwegbecher stichprobenartig untersucht, um den Einfluss dieser auf die mikrobiologische Qualität des Kaffees abschätzen zu können und gegebenenfalls eine Aussage über die hygienischen Vor- und Nachteile von Mehrwegbechern im sog. „Kaffee to go“ Bereich treffen zu können.

5.1 Proben aus dem gewerblichen Bereich

Bei der Betrachtung der Gesamtkeimzahlen und der Ausgabemperaturen der Kaffee- und Cappuccino-Proben in Abbildung 3 wird deutlich, dass die Cappuccino-Getränkeproben im Mittel eine höhere GKZ ($1,83E+02$ KbE/mL) aufwiesen als die Kaffee-Proben ($8,79E+01$ KbE/mL). Folgerichtig war die durchschnittliche Ausgabetemperatur der Kaffees mit $63,59$ °C deutlich höher als die der Cappuccino-Proben mit $60,34$ °C. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Temperatur des Milchschaums ca. 40 °C- 60 °C beträgt und somit die Kombination aus heißem Espresso und temperiertem Milchschaum geringere Temperaturen hervorruft als bei reinem Kaffee (Anaya, 2007). Die erhöhte Keimzahl von Cappuccino-Proben lässt sich mit diesem Temperatureffekt erklären.

In Deutschland existieren diverse Verordnungen und Normen zu Milch und Milcherzeugnissen (LMHV, LMHV Tier, EU VO 852/2004, EU VO 853/2004,

EU VO 2073/2005), die bei Einhaltung der Vorgaben eine adäquate Milchqualität und Verbrauchersicherheit gewährleisten. Sollte der Keimgehalt in der Anlieferungsmilch über 100.000 KbE/ccm oder die Anzahl der somatischen Zellen über 400.000 KbE/ccm liegen, muss dies unverzüglich dem Milcherzeuger mitgeteilt werden (Bruckmaier, 2007, Milch-Güteverordnung, 2010, Baumgart *et al.*, 2014, Lebensmittelhygiene-Verordnung, 2016). Demzufolge kann anhand der Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass nicht die verwendete Milch ein mikrobiologisches Problem darstellt, sondern eine ungenügende Reinigung der Milchtanks und der Milchleitungen der Kaffeevollautomaten die erhöhte mikrobiologische Verunreinigung bei Cappuccino beeinflusst. Durch Milchrückstände in den Leitungen und am Auslauf kann es beispielsweise durch Milchsäuregärer zu mikrobiellem Verderb kommen.

Kaffee ist ein fermentiertes, pflanzliches Lebensmittel, bei dessen Herstellung, Verarbeitung und Lagerung mikrobiologische Kontaminationen unvermeidbar sind. Deshalb wird auch das fertige Produkt, die Kaffeezubereitungsarten, direkt von der mikrobiologischen Qualität der Kaffeebohnen beeinflusst. Beispielsweise wurde in einer Untersuchung vom LGL Bayern (2014) in über der Hälfte aller getesteten Kaffeeproben Ochratoxin A identifiziert, bei allen Proben lag die nachgewiesene Menge jedoch unter dem gesetzlichen Grenzwert. Sowohl die Primär- als auch die Sekundärkontamination (Rimbach *et al.*, 2015) spielt daher für die mikrobiologische Qualität des Endproduktes eine Rolle.

Auch die Reinigung des gesamten Vollautomaten hat einen Einfluss auf die mikrobiologische Qualität des Kaffees. Wie sich anhand stichprobenartiger Überprüfung der Reinigung eines Kaffeevollautomaten im Haushaltsbereich feststellen ließ, findet diese nicht sachgemäß statt. Es ist zwar davon auszugehen, dass die Reinigung im gewerblichen Sektor aufgrund von strikten Hygienevorschriften gründlicher durchgeführt wird, jedoch kann auch hier keine mikrobiologische Unbedenklichkeit garantiert werden, da es keine gesetzlichen Reinigungsvorschriften gibt.

Kaffeevollautomaten im gewerblichen Sektor sind häufig direkt an das Trinkwassersystem angeschlossen und beziehen somit ihr Wasser direkt über wasserführende Systeme. Eine Studie von Gattlen *et al.* (2010) beweist die

Einbringung von Bakterien über das Trinkwassersystem bei Haushaltswaschmaschinen. Häufig kommt es innerhalb dieser Trinkwasser-assoziierten Leitungen zur Bildung von Biofilmen, welche die Umweltstabilität der Mikroorganismen begünstigen und somit ihre Überlebens- und Vermehrungschancen verbessern (Gattlen *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2016). Abbildungen 4 und 5 zeigen, dass mit zunehmender Ausgabetemperatur sowohl bei Kaffee als auch bei Cappuccino der Kontaminationsgrad der Getränkeproben abnimmt. Die meisten Bakterien werden oberhalb von 40 °C abgetötet. Dort können nur thermophile oder thermotolerante Bakteriengattungen wie die Sporenbildner *Bacillus* oder *Clostridium* überleben (Krämer, 2011).

Identifikation der vorhandenen Mikroorganismen

In den Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben aus dem gewerblichen Bereich konnten mittels MALDI-TOF-MS unter anderem *Acinetobacter johnsonii*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus cereus* und *Staphylococcus epidermidis* identifiziert werden. *B. cereus* ist ein temperaturresistenter, toxinbildender Sporenbildner und wird mit Lebensmittelintoxikationen in Verbindung gebracht. Die Sporen sind thermoresistent bis zu 100 °C und könnten somit zum Beispiel die Pasteurisation der Milch überleben und anschließend auskeimen (Krämer, 2011). Auch in Röstkaffeebohnen wurde *B. cereus* nachgewiesen (Chaves *et al.*, 2012); demnach ist auch die Anwesenheit von *B. cereus* in den Getränkeproben als Ergebnis dieser Untersuchungen schlüssig.

S. epidermidis wurde sowohl im gewerblichen Bereich als auch im Haushaltsbereich in Kaffeevollautomaten nachgewiesen. *S. epidermidis* ist Teil der residenten Hautflora des Menschen (Sterry, 2013) und kann bei Hautkontakt übertragen werden. Die Identifikation sowohl bei gewerblichen Maschinen als auch Haushaltskaffeevollautomaten ist wahrscheinlich auf den Kontakt des Personals oder Konsumenten bei der Reinigung des Auslaufs, beim Wasserwechsel im Tank oder der Befüllung mit Kaffeebohnen zurückzuführen. Diese Aussage lässt sich durch den Fund von *S. epidermidis* am Auslauf eines privaten Kaffeevollautomaten bekräftigen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass auch pathogene oder opportunistische

Erreger vom Personal oder Verbraucher durch den Auslauf auf den Kaffee übertragen werden könnten und dieser so ein potentielles Infektionsrisiko darstellt.

5.2 Proben aus dem Haushaltsbereich

Aus Privathaushalten wurden zehn Kaffee-Getränkeproben sowie zehn Abstriche aus Wassertanks und Ausläufen untersucht. Die Proben stammten jeweils von den gleichen Maschinen.

Der Kaffee aus den Haushaltskaffeefullautomaten wies mit $4,47E+02$ KbE/mL eine höhere Gesamtkeimzahl als die Kaffee-Proben aus dem gewerblichen Sektor auf ($8,79E+01$ KbE/mL). Die Ausgabetemperaturen der Kaffee-Getränkeproben waren mit durchschnittlich $61,32$ °C deutlich geringer als im gewerblichen Sektor ($63,59$ °C). Die höhere GKZ bei Kaffee-Getränkeproben aus dem Haushaltsbereich könnte sowohl mit einer höheren mikrobiologischen Belastung der Privatgeräte als auch mit der niedrigeren Ausgabetemperatur zusammenhängen.

Bei der Probenaufbereitung traten bei den Haushaltsgeräten Keimzahlen oberhalb der Nachweisgrenze (>300 KbE/Platte) auf, was bei den beprobten gewerblichen Geräten nicht der Fall war. Ähnlich wie bei Kaffeefullautomaten aus dem gewerblichen Sektor wurde auch im Haushaltsbereich stichprobenartig die Reinigung der Maschine überprüft. Hier erfolgte diese ebenfalls nicht gemäß der Herstellerangaben, welches die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen.

Die Wassertanks waren stark mikrobiologisch verunreinigt. Sie wiesen eine durchschnittliche Gesamtkeimzahl von $3,33E+03$ KbE/mL auf und fünf von zehn Proben lagen über der Bestimmungsobergrenze von $1,00E+08$ KbE/mL. Die hohe Gesamtkeimzahl der Kaffeeproben aus den Haushaltsmaschinen könnte mit einer Verunreinigung der Wassertanks assoziiert werden. Es konnten nur in zwei von zehn Proben Korrelationen zwischen einem stark kontaminierten Wassertank und einem mikrobiologisch belasteten Kaffee des gleichen Kaffeefullautomaten gefunden werden.

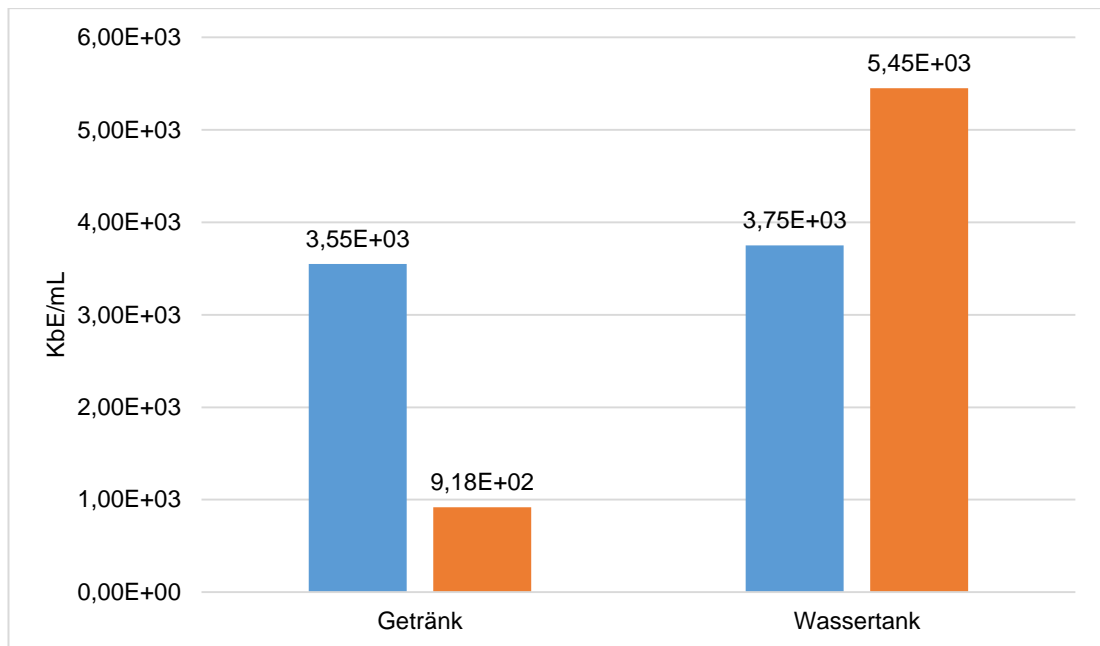


Abbildung 14 Korrelation zwischen der Kontamination eines Wassertanks und der Kontamination des Kaffees des gleichen Haushaltsvollautomaten. n=2.

Identifikation der vorhandenen Mikroorganismen

Die Wassertanks können bei unzureichender Reinigung und ungenügendem Wasserwechsel (zum Teil befindet sich ständig etwas Wasser im Tank, zum Teil sind sie völlig trocken) als Reservoir für diverse Mikroorganismen dienen, welche in der Lage sind, in diesem feuchten Milieu Biofilme zu bilden. Es ist davon auszugehen, dass diese auch in den wasserführenden Systemen von Kaffeevollautomaten entstehen. Mittels MALDI-TOF-MS konnten die Spezies *Bacillus thuringiensis*, *Sphingobium cloacae*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Microbacterium oxydans* und auch *Pseudomonas aeruginosa* in den Wassertanks identifiziert werden. In den Kaffee-Proben wurden *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Klebsiella oxytoca* *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* identifiziert. Einige dieser Gattungen wiesen Vilanova *et al.* (2015) ebenfalls in der Abtropfschale von Kapselmaschinen nach und bezeichneten diese als charakteristisches Kaffee-Bakteriom:

Tabelle 18 Identifizierte Mikroorganismen der Studie Vilanova et al. (2015). Die mit * gekennzeichneten Gattungen wurden in dieser Arbeit ebenfalls identifiziert.

Identifikationen von Vilanova et al. (2015)

Clostridium

Rhizobium

Sphingobium *

Pseudomonas *

Klebsiella *

Brevundimonas

Agrobacterium

Acinetobacter *

Enterococcus *

Bacillus *

Staphylococcus, *Escherichia*, *Lysinibacillus* und *Microbacterium* konnten in der Studie von Vilanova et al. (2015) nicht identifiziert werden.

Das Verhalten von *P. aeruginosa* und *S. epidermidis* bei der Bildung von Biofilmen wurde schon in diversen Studien untersucht (Liduma et al., 2012, Kannan und Gautam, 2015). *Pseudomonas* zeichnet sich durch eine hohe Umweltstabilität aus und haftet an vielen Oberflächen. Einige Arten sind humanmedizinisch von besonderer Bedeutung, da sie nosokomiale Infektionen verursachen können (Krämer, 2011). *P. aeruginosa* konnte auch in anderen Geräten mit einem Wasseranschluss im Haushaltsbereich identifiziert werden. Durch Gattlen et al. (2010) und Nix et al. (2015) erfolgte jeweils der Nachweis von *P. aeruginosa* in Haushaltswaschmaschinen. In diesen Studien wird eine mikrobielle Verunreinigung und Biofilmbildung unter anderem mit dem Trinkwassersystem in Verbindung gebracht. Diese Annahme lässt sich durch die Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa* in Haushaltskaffeevollautomaten unterstützen. Auch *Bacillus*- und *Escherichia*-Arten sind bekannte Biofilmbildner und treten unter anderem häufig im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen auf (Kuroki et al., 2009, Khan et al., 2013).

Die Anwesenheit von Biofilmen in den Schläuchen der Geräte kann nicht ausgeschlossen werden, demnach stellen Biofilme eine permanente Kontaminationsquelle für das Wasser und letztendlich für den Kaffee dar. Neben den zuvor genannten Biofilmbildnern können andere Mikroorganismen ebenfalls von dieser Matrix profitieren. Durch die extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) können sich weitere Arten anlagern und werden so vor äußeren Einflüssen geschützt. Durch dieses Verhalten wird zusätzlich die Vermehrung der Bakterienzellen gefördert (Donlan und Costerton, 2002, Flemming *et al.*, 2007).

Bei *Bacillus thuringiensis* handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes, gram-positives Bodenbakterium, welches bereits auf Kaffeeplantagen nachgewiesen wurde (Arrieta *et al.*, 2004, Steinbuechel *et al.*, 2012). Es könnte zur Übertragung vom Boden auf die Kaffeebohnen bei der Ernte oder der Lagerung in Säcken auf dem Boden kommen.

Einige identifizierte Spezies der am Anfang dieser Arbeit genannten Studien konnten auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es wurden unter anderem *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*) und *Staphylococcus* und einige andere Gattungen in den Kaffee- und Cappuccino-Getränkeproben und den Wassertanks identifiziert (vgl. auch Tabelle 18) (stern.de, 2013, CBS Pittsburgh, 2015, Vilanova *et al.*, 2015).

Bei der Betrachtung aller Ausgabetemperaturen, sowohl im gewerblichen Bereich als auch im Haushaltsbereich, ist es auffällig, dass trotz der gemessenen Temperaturen (die niedrigste gemessene Temperatur bei einer privaten Maschine betrug 54,3 °C und im gewerblichen Bereich 56,1 °C) in vielen Proben Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten. Grund dafür könnten zum Teil zu geringe Temperaturen sowie zu kurze Einwirkzeiten der Temperaturen sein. Diese beiden Faktoren beeinflussen die mikrobiologischen Unbedenklichkeit der Getränke. Die Gefahr einer Präsenz bzw. Ansammlung humanpathogener Keime wird durch zu geringe Temperaturen gefördert und in diesem Zusammenhang kann es auch zur Bildung von mikrobiellen Toxinen durch entsprechende Organismen kommen.

Es ist an der folgenden Abbildung zu erkennen, dass der Kaffee aus gewerblichen Maschinen mit einer Durchschnittstemperatur von 63,59 °C heißer war, als der aus Haushaltsgeräten mit 61,32 °C. Damit einher geht eine erhöhte Gesamtkeimzahl von 4,47E+02 KbE/mL bei den privaten Geräten im Gegensatz zu 7,79E+01 KbE/mL bei den gewerblichen Geräten.

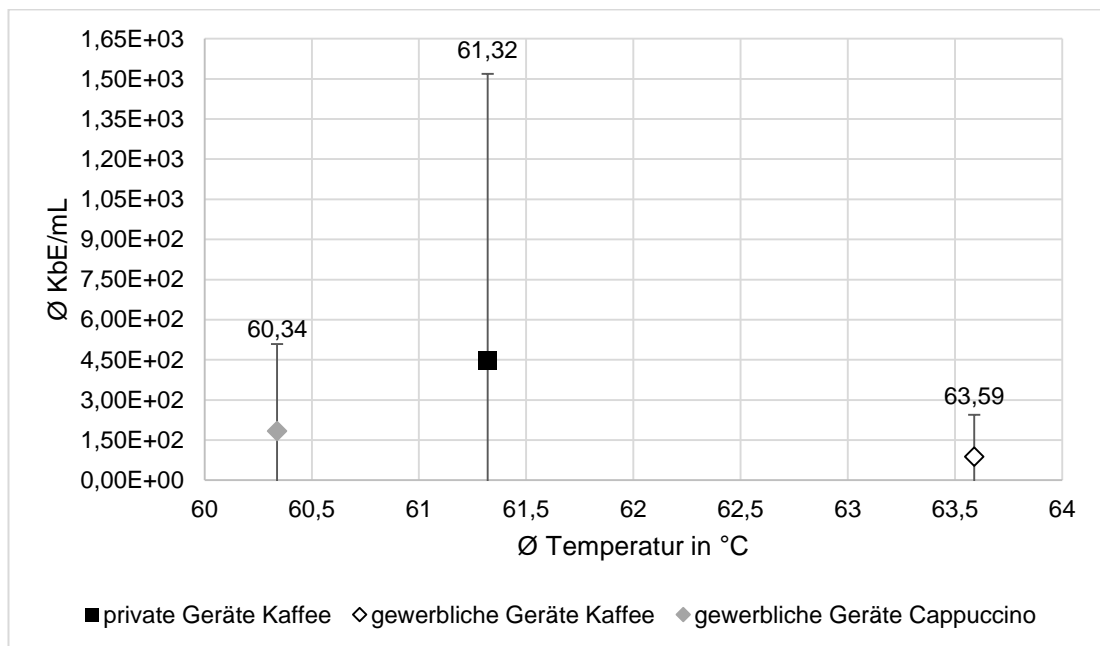


Abbildung 15 Vergleich der durchschnittlichen Gesamtkeimzahl und Ausgabetemperatur von privaten (Haushalts-) und gewerblichen Kaffeevollautomaten.

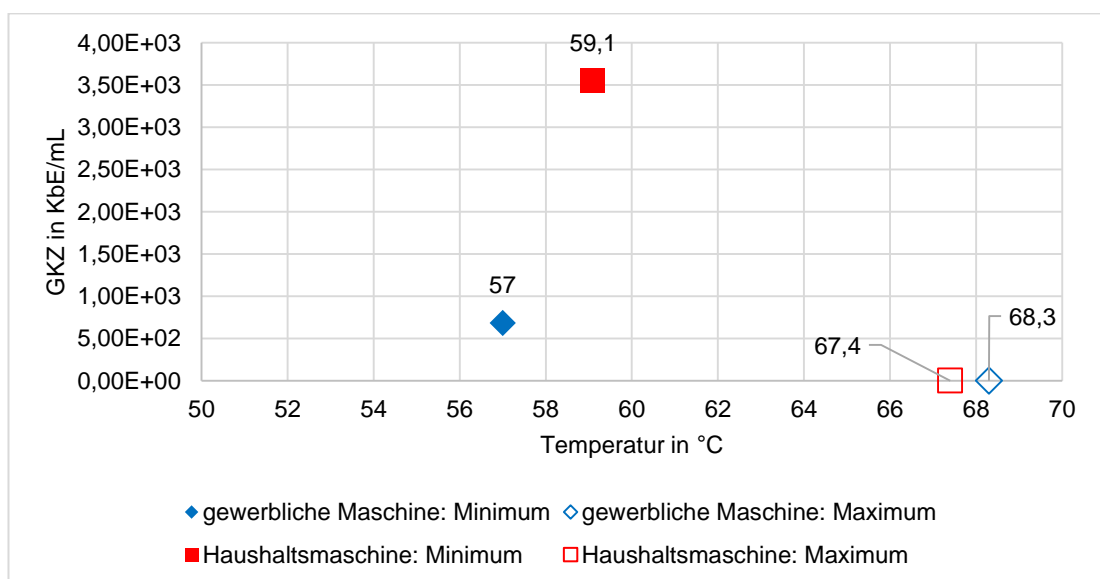


Abbildung 16 Übersichtsdarstellung der Kaffee -Getränkproben mit minimaler bzw. maximaler Ausgabetemperatur in °C kombiniert mit der zugehörigen Gesamtkeimzahl in KbE/mL.

Bei der geringsten gemessenen Temperatur (57 °C) in einer gewerblichen Maschine, bei welcher Mikroorganismen nachweisbar waren, betrug die GKZ $6,82E+02$ KbE/mL. Bei der höchsten gemessenen Ausgabetemperatur in gewerblichen Bereich (68,3 °C) waren keine Mikroorganismen nachweisbar. Dem gegenüber lag die geringste gemessene Temperatur, bei der Mikroorganismen nachweisbar waren, bei einer Haushaltsmaschine bei 59,1 °C und die GKZ betrug $3,55E+03$ KbE/ml, wohingegen bei der höchsten Temperatur von 67,4 °C keine Mikroorganismen nachweisbar waren. Erhöhte mikrobiologische Verunreinigungen bei Kaffee können somit mit niedrigeren Ausgabemperaturen korreliert werden. Ebenfalls sind niedrigere Kaffeeausgabemperaturen mit Haushaltskaffeevollautomaten zu korrelieren.

Vergleich zur Trinkwasserqualität

Nach der TrinkwV (2012) gilt Trinkwasser als keimarm, wenn 0 KbE/100mL *Enterococcus* und *Escherichia coli* in diesem vorhanden sind (Anlage 1, Teil 1).

Tabelle 19 Durchschnittliche GKZ der jeweiligen Getränkeproben.

Haushalt Kaffee	gewerblich Kaffee	gewerblich Cappuccino
4,47E+02 KbE/mL	8,79E+01 KbE/mL	1,83E+02 KbE/mL
~447 KbE/mL	~88 KbE/mL	~183 KbE/mL

Bei der Betrachtung von Tabelle 19 ist festzustellen, dass im Vergleich zu den Grenzwerten des Trinkwassers der Kaffee/Cappuccino diese Grenzwerte nicht einhält. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit besitzen Kaffee und Kaffeezubereitungsarten keine Trinkwasserqualität.

5.3 Mehrwegbecherproben

Es wurden stichprobenartig zehn natürlich kontaminierte Mehrwegbecher untersucht. In drei von zehn Mehrwegbechern konnten keine Keime identifiziert werden, die anderen waren mikrobiologisch kontaminiert (durchschnittlich $2,56E+03$ KbE/mL). Mittels MALDI-TOF-MS konnte einzig die Spezies *Acinetobacter johnsonii* exakt charakterisiert werden, die anderen Keime lagen unterhalb des sicheren Score Values oder bei ihnen war nur die Identifikation der Gattung möglich. Unter anderem wurden Gattungen von Hefen identifiziert: *Candida*, *Rhodotorula* und *Meyerozyma (guilliermondii)*. Das Auftreten von Hefen, Schimmelpilzen und anderen Umweltkeimen ist charakteristisch für Kaffee und eine Umgebung mit leicht feuchtem Milieu (Mehrwegbecher); de Melo Pereira *et al.* (2014) konnten 144 unterschiedliche Hefearten bei der spontanen Fermentation von Kaffeebohnen isolieren. Diese waren in der Lage, die extremen Gegebenheiten bei der Fermentation und Röstung der Kaffeebohnen zu überleben und könnten demnach so in die Maschine und auch in das Getränk übertragen werden.

Da trotz hoher gemessener Kaffeeausgabetemperaturen sowohl im gewerblichen als auch im Haushaltsbereich erhöhte Keimzahlen auftraten, sollte über eine empirische Versuchsreihe eine optimale Temperatur gefunden werden, die für den Verbraucher eine möglichst hohe mikrobiologische Sicherheit gewährleisten kann.

Für eine hohe mikrobiologische Reduktion sind nicht nur erhöhte Temperaturen wichtig sondern auch die Dauer des Einflusses dieser Temperaturen. Um diesen Aspekt überprüfen zu können, wurde jeweils eine Einwirkzeit von fünf Minuten und einer Minute mehrfach überprüft. Dazu wurden Bechergläser, die die Umgebung eines Mehrwegbechers simulieren sollten artifiziell kontaminiert. Hierzu wurden die Keime aus Tabelle 4 verwendet und ihre Ausgangskeimzahlen auf circa $1,00E+08$ KbE/mL eingestellt, um später vergleichbare Werte für die logarithmischen Reduktion (LR) zu erhalten. Diese Keime wurden entweder in Kaffeevollautomaten oder Mehrwegbechern detektiert oder wie im Fall von *Enterococcus faecium* aufgrund seiner Temperaturreistenz ausgewählt. Diese Resistenz ist unter anderem auch beim Einsatz von Biomonitoren zur Überprüfung von

Reinigungsleistungen von Vorteil, wie Kagemann *et al.* (2008) darstellen. Ebenso wird *E. faecium* in diversen Normen, zum Beispiel in der DIN 10510, als Testorganismus zur Prüfung gewerblicher Geschirrspüler empfohlen bzw. vorgeschrieben.

Die Ergebnisse der Simulation zum Einfluss bestimmter Wassertemperaturen über eine Dauer von fünf Minuten zeigen deutlich, dass ab 68 °C eine vollständige Reduktion stattfand, die LR lag oberhalb von 8,00. Im Gegensatz dazu betrug bei einer Temperatur von 60 °C die LR nur 1,51. Die GKZ lag dementsprechend bei 3,12E+06 KbE/mL.

Dies verdeutlicht, dass innerhalb des Temperaturbereiches zwischen 60 °C und 70 °C die kritische Temperatur bei dieser Einwirkzeit liegt. Aufgrund dessen wurde dieser Temperaturabschnitt genauer betrachtet. Bei einer Temperatur von 66 °C lag die LR bei 4,44 und die Gesamtkeimzahl betrug 3,70E+03 KbE/mL wohingegen bei einer Temperatur von 68 °C die GKZ 0,00E+00 KbE/mL betrug und die LR oberhalb von 8,00 lag.

Laut den Ergebnissen dieser Simulation wäre eine Temperatur von mindestens 68 °C bei fünf Minuten Einwirkzeit eine geeignete Kaffeetemperatur, um eine höhere mikrobiologische Sicherheit (bei kontaminierten Mehrwegbechern) zu gewährleisten. Alle Temperaturen wurden dreifach überprüft, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

Abbildung 17 stellt die logarithmischen Reduktionsfaktoren mit den zugehörigen Temperaturen dar. Hier ist zu erkennen, dass oberhalb von 68 °C von einer vollständigen Reduktion auszugehen ist.

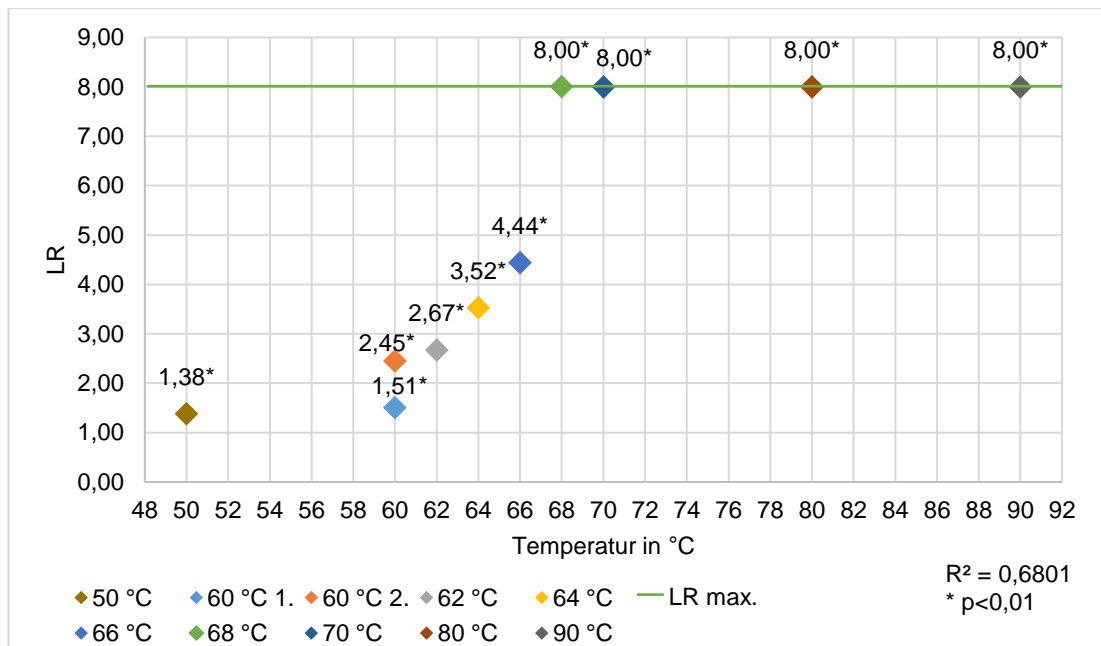


Abbildung 17 LR bei verschiedenen Wassertemperaturen und einer Einwirkzeit von fünf Minuten.

60 °C 1. ist die erste Messung in der die Temperatur in 10er Schritten überprüft wurde, 60 °C 2. dementsprechend die Überprüfung des Abschnittes 60-70 °C. Alle Ergebnisse sind zueinander signifikant innerhalb eines Signifikanzniveaus von $p < 0,01$.

Des Weiteren wurde die Dauer von einer Minute überprüft, um den Einfluss des Parameters Zeit auf die Reduktion durch bestimmte Wassertemperaturen zu zeigen.

Dies fand simultan zu dem Versuch mit fünf Minuten Einwirkdauer statt.

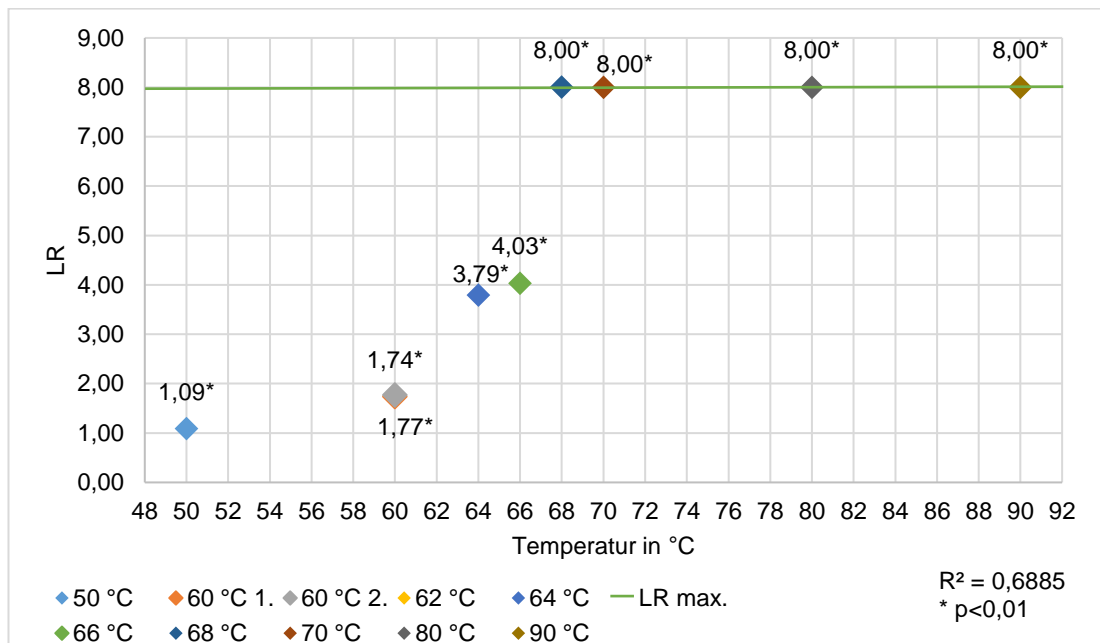


Abbildung 18 LR bei verschiedenen Wassertemperaturen und einer Einwirkzeit von einer Minute.

60 °C 2. Und 62 °C liegen übereinander, da bei beiden der LR 1,77 betrug. 60 °C 1. ist die erste Messung in der die Temperatur in 10er Schritten überprüft wurde, 60 °C 2. dementsprechend die Überprüfung des Abschnittes 60-70 °C. Alle Ergebnisse sind zueinander signifikant innerhalb eines Signifikanzniveaus von $p < 0,01$.

Anhand der Ergebnisse bei einer Einwirkdauer von einer Minute wird ersichtlich, dass auch hier ab 68 °C von einer vollständigen Reduktion ausgegangen werden kann.

Laut den Ergebnissen dieser Simulation wäre eine Temperatur von mindestens 68 °C bei einer Minute Einwirkzeit eine geeignete Kaffeetemperatur, um eine höhere mikrobiologische Sicherheit (bei kontaminierten Mehrwegbechern) zu gewährleisten. Alle Temperaturen wurden dreifach überprüft, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Einwirkdauer der Wassertemperatur bei dieser Simulation zu vernachlässigen ist, da sowohl bei einer Minute als auch bei fünf Minuten bei niedrigeren Temperaturen geringe Reduktionen stattfanden. Bei fünf Minuten betragen die LR bei 50 °C und 60 °C 1,38 und 1,51. Bei einer Minute betragen sie 1,09 und 1,74.

Bei beiden Zeiten wurde eine vollständige Reduktion jeweils ab mindestens 68 °C erreicht, deshalb wäre diese als Kaffeeausgabetemperatur (bei kontaminierten Mehrwegbechern) empfehlenswert. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Temperaturen in Simulationen mit Kaffeefullautomaten überprüft werden müssen. Es ist davon auszugehen, dass sich die Temperatur innerhalb der untersuchten Zeiträume in den Mehrwegbechern verringert hat. Normalerweise ist davon auszugehen, dass die Reduktion bei gleicher Temperatur bei einer höheren Dauer (fünf Minuten) größer sein müsste. Ebenso müssten bei längerer Dauer (fünf Minuten) auch bei niedrigeren Temperaturen größere Reduktionen im Vergleich zu kürzeren Einwirkzeiten (eine Minute) erzielt werden. Diese Aspekte müssen bei der Betrachtung der Ergebnisse der Simulation in Mehrwegbechern beachtet werden.

Die Ergebnisse können auch auf den Alltag übertragen werden. Viele Betriebe sträuben sich, Kaffee und Kaffeezubereitungsarten in mitgebrachte Mehrwegbecher zu füllen, da sie ein Hygienierisiko ausgehend von diesen Bechern fürchten (Philip Heldt, persönliche Kommunikation). Jedoch zeigt diese Arbeit, dass bei adäquaten Kaffeetemperaturen eine zu vernachlässigende Gefahr von den Mehrwegbechern ausgehen könnte. Es muss aber berücksichtigt werden, dass nur fünf Mikroorganismen, welche alle Bakterien waren, als artifizielle Anschmutzung verwendet wurden. Es sollten weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Mikroorganismen, besonders Hefen und Schimmelpilzen, stattfinden, die die Ergebnisse dieser Arbeit gegebenenfalls bekräftigen.

Die Mehrwegbecher wiesen durchschnittlich eine GKZ von $2,56E+03$ KbE/Mehrwegbecher auf. Die GKZ der Kaffeeproben aus dem Haushaltsbereich betrug $4,47E+02$ KbE/mL und aus dem gewerblichen Bereich $8,79E+01$ KbE/mL. Das allgemeine Kaffeeausgabevolumen beträgt ungefähr 200 mL.

$$\text{Umrechnung: } \frac{2,56E+03 \frac{\text{KbE}}{\text{Mehrwegbecher}}}{200 \text{ mL}} = 1,28E + 01 \frac{\text{KbE}}{\text{mL}}$$

Wird die Annahme getroffen, dass 200 mL Kaffee aus einem gewerblichen/privaten Vollautomaten mit einer Gesamtkeimzahl von $8,79E+01$ KbE/mL / $4,47E+02$ KbE/mL in einen kontaminierten Mehrwegbecher gefüllt werden, kann anhand der Ergebnisse und der Umrechnung angenommen werden, dass die mikrobiologische Verunreinigung des Mehrwegbeckers zu vernachlässigen ist. Auch die Temperatur des eingefüllten Getränkes führt zu einer weiteren Keimreduzierung im Mehrwegbecher. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das hygienische Risiko von kontaminierten Kaffeefullautomaten ausgeht. Die Belastung eines Mehrwegbeckers verschlechtert die mikrobiologische Qualität eines Kaffees nicht.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit könnte die Abfüllung von Kaffee in Mehrwegbecher gefördert werden, um somit die Müllentstehung der Pappbecher beim „Kaffee to go“ Konsum zu verringern. Es sollte jedoch der Kontakt der Mehrwegbecher mit dem Kaffeerauslauf vermieden werden, um Kreuzkontaminationen zu verhindern. Zudem müssen die Becher für die hohen Temperaturen der Getränke geeignet sein.

5.4 Biofilmbildung und TOC-Gehalt

Nach dem heutigen Stand der Technik ist eine vollständige Verhinderung der Bildung von Biofilmen nicht möglich (Dirk Bockmühl, persönliche Kommunikation). Sie werden unter anderem mit Trinkwassersystemen im Haushalt assoziiert (Schaechter, 2009) sowie mit Geräten, die zum Beispiel einen Wassertank, wasserführende Systeme oder einen Wasseranschluss besitzen. Die Entstehung und der grundsätzliche Aufbau von Biofilmen wurde in dieser Arbeit bereits beschrieben (Costerton *et al.*, 1994, Donlan und Costerton, 2002, Flemming *et al.*, 2007).

Demzufolge ist davon auszugehen, dass selbst bei optimaler Reinigung auch in Kaffeefullautomaten die Bildung von Biofilmen nicht zu verhindern ist. Es lässt sich vermuten, dass mikrobielle Zellen optimiert an bereits verschmutzte Oberflächen adhärieren, was zu einem stetigen Wachstum von Biofilmen beitragen würde.

Zwecks der Überprüfung auf eine Präsenz von Biofilmen in Kaffeevollautomaten wurden einem defekten Gerät der Marke Jura einige Schläuche an unterschiedlichen Stellen entnommen (vgl. 3.4.2). Eine Färbemethode mit Kristallviolett sollte die Präsenz von Biofilmen bestätigen (Bladel *et al.*, 2013) und anschließend erfolgte die Messung der Absorption und damit verbunden der Dichte bei 550 nm.

Die Ergebnisse unter Punkt 4.3 zeigen, dass in jedem getesteten Schlauchabschnitt Biofilme vorhanden waren. Besonders auffällig waren die Probennummern 2, 3, 5 und 8 bei welchen die gemessene Dichte am höchsten war.

Diese Schläuche waren ein Pumpenschlauch (2; 4,625), ein Schlauch vom Wassertank zur ersten Pumpe (3; 5,674) und ein Schlauch von der Brüheinheit zum Kaffeeauslass (5; 12,61). Die Zahlenwerte sind dimensionslos, jedoch sind sie nach der Ampelskala von Tabelle 10 als hoch bzw. sehr hoch einzuordnen. Diese Ergebnisse sind plausibel, da an diesen Stellen der Schläuche 2 und 3 das Wasser teilweise noch nicht erhitzt wurde und dementsprechend Raumtemperatur betrug. Die Resultate zur Biofilmbildung in diesen Schlauchabschnitten lassen sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Abstriche aus Wassertanks der Haushaltskaffeevollautomaten bestätigen, da diese eine stark erhöhte GKZ aufwiesen. Das Vorhandensein von dichten Biofilmen in dem Schlauchabschnitt 5 ist ebenfalls plausibel, denn dort lassen sich die meisten Kaffeerückstände vermuten, welche eine vergrößerte Oberfläche in diesem Schlauch generieren würden. Die Rückstände schaffen optimale Bedingungen für die Adhärenz von weiteren Mikroorganismen und das Wachstum eines Biofilms.

Um eine potentielle Bildung von Biofilmen in einem intakten Kaffeevollautomaten möglicherweise messen zu können, wurde die Spülflüssigkeit eines Gerätes der Marke Philips wöchentlich gesammelt. Diese Flüssigkeiten inklusive der Spülflüssigkeit wurden nach der Simulation (vgl. 5.5) auf ihren TOC-Gehalt untersucht. Die ermittelten Werte für den Gehalt ermöglichen Rückschlüsse auf eine Biofilmbildung, welche gegebenenfalls abhängig von der Nutzungsdauer und Nutzungsart sind.

Die Spülflüssigkeiten wurden über sieben Wochen gesammelt und die Ergebnisse zeigen, dass nach der ersten Woche bereits ein TOC-Gehalt von 3,8 g/L nachweisbar war. Bis zur vierten Woche schwankte dieser Gehalt in diesem Bereich, nach fünf Wochen konnte jedoch etwas mehr als eine Verdopplung festgestellt werden (9,0 g/L). In der sechsten Woche betrug der TOC-Gehalt 44,4 g/L. Nach der Simulation an dem Kaffeefullautomaten betrug der TOC-Gehalt 42,6 g/L, welches auf einen hohen Anteil an organischem Material (von den Mikroorganismen) in der Maschine zurückzuführen ist. Trotz regelmäßiger Reinigung und Entkalkung nach der Simulation betrug der Gehalt in der anschließenden Woche noch 33,9 g/L. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass der TOC-Gehalt wie vermutet mit längerer Nutzungsdauer zunimmt. Häufigere oder automatisierte Reinigungs- und Entkalkungsprogramme würden diesem Effekt eventuell entgegenwirken.

Bei den Ergebnissen muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich der TOC-Gehalt sowohl auf Biofilme als auch auf anderes organisches Material beziehen kann. Es kann sich somit auch um Ablagerungen in den Schläuchen aus dem Wasser, dem gemahlene Kaffee oder um Mikroorganismen handeln. Jedoch lässt sich bezogen auf vorher genannte Studien und die Biofilmidentifikation in der defekten Jura-Maschine von einer Biofilmbildung ausgehen. Auffällig dabei ist, dass die Maschine wie vom Hersteller empfohlen gereinigt und gepflegt wurde und sich trotz dessen organisches Material innerhalb des Gerätes abgelagert bzw. gebildet hat.

Es wurde nur eine Maschine über einen Zeitraum von sieben Wochen überprüft, jedoch sollten die erzielten Ergebnisse übertragen werden und an anderen Maschinen über längere Zeiträume überprüft werden. Die eventuell entstehenden Folgen sind schwer einzuschätzen, jedoch könnte sich dies nicht nur auf die Sensorik des Kaffees auswirken sondern auch auf die Gesundheit des Verbrauchers. Einige in dieser Arbeit identifizierte Mikroorganismen sind fakultativ pathogen und können sich unter bestimmten Voraussetzungen (infektiöse Dosis) auf die Gesundheit des Verbrauchers auswirken. Besonders *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* können humanpathogen wirken. *P. aeruginosa* ist ein typisches Wasserbakterium und findet sich häufig in Wasserinstallationen

im Haushalt und in Geräten wieder, welche mit Wasser in Kontakt kommen (Rolle, 2007). Biofilme dienen auch anderen pathogenen Keimen als Reservoir und wurden bereits im Gesundheitssektor nachgewiesen, wie beispielsweise in den Wasserleitungen in Zahnarztpraxen (Montebugnoli *et al.*, 2004). Die pathogenen Erreger und andere Organismen dieser mikrobiellen Gemeinschaft können über das Wassersystem übertragen werden und so eventuell auch in Kontakt mit anderen Geräten mit Wasseranschlüssen oder Wassertanks kommen, wodurch der Mensch dieser Exposition ausgesetzt wäre.

5.5 Simulation zur Keimreduktion durch einen Kaffeevollautomaten

In Kaffeevollautomaten sind Thermoblöcke integriert, die für die Erhitzung und den Brühvorgang der Getränke zuständig sind. Diese Brüheinheiten können Temperaturen von bis zu 140 °C erreichen. Dementsprechend kann von einer keimreduzierenden Wirkung des Gerätes ausgegangen werden, da alle vegetativen Zellen von Mikroorganismen bei einem Temperatureinfluss von ca. 60 °C für ungefähr fünf Minuten abgetötet werden (Fuchs, 2007). Jedoch ist die Dauer des Brühprozesses deutlich kürzer und die Kaffeeausgabetemperatur deutlich geringer als die Brühtemperatur. Die Ergebnisse der Probennahme von Kaffeezubereitungsarten im Haushalts- und gewerblichen Bereich zeigen, dass bei 25 % der Kaffeeproben aus privaten Haushalten eine mikrobiologische Belastung festgestellt werden konnte. Die Wassertanks aller Geräte waren belastet und die Kaffeeausläufe zu 90 % kontaminiert. Im gewerblichen Bereich konnte bei 40 % aller Kaffeezubereitungen eine Kontamination ermittelt werden.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass das Temperatur/Einwirkzeit-Verhältnis in Kaffeevollautomaten nicht optimal ist.

Zur Untersuchung und Optimierung dieses Verhältnisses sollten systematisch Temperatur/Zeit-Kombinationen getestet werden, um eventuell Mindestanforderungen an diese Parameter für eine verbesserte Verbrauchersicherheit erarbeiten zu können. Vergleichbare Studien wurden bereits im Haushaltsbereich für Haushaltswaschmaschinen durchgeführt

(Honisch *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Simulation mit einem Haushaltskaffeevollautomaten der Marke Philips durchgeführt; das Wasser im Wassertank wurde mit einer Testkeimsuspension versetzt. Diese Suspension setzte sich aus Mikroorganismen zusammen, welche in Kaffeevollautomaten identifiziert werden konnten (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *A. baumannii* und *P. aeruginosa*). Zusätzlich wurde *Enterococcus faecium* aufgrund seiner Temperaturreistenz verwendet. Bei dem verwendeten Gerät waren drei Kaffeeausgabetemperaturstufen programmierbar: Minimum (61,9 °C – 64,2 °C), Medium (66,1 °C – 68,9 °C) und Maximum (68,3 °C – 70,1 °C). Die genannten Temperaturen waren jeweils die minimale bzw. maximale gemessene Temperatur bei der Verwendung dieser Einstellung. Die Dauer des Brühvorgangs konnte nicht genau gemessen werden, jedoch betrug die Zeit zwischen Mahlen und Beginn des Kaffeeauslasses circa 20 – 25 Sekunden.

Zur Untersuchung wurde jeweils ein Liter Wasser mit 1 mL Keimsuspension versetzt. Die jeweiligen Ausgangskeimzahlen lagen zwischen $2,49\text{E}+06$ KbE/mL und $1,21\text{E}+07$ KbE/mL. Aus jedem Liter konnten vier Tassen Kaffee (200 mL/Tasse) hergestellt werden, welche jeweils überprüft wurden. Es ist davon auszugehen, dass mit höheren Temperatureinstellungen höhere Reduktionen erreicht werden können. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass bei jeder Einstellung die prozentuale Reduktion ungefähr 45 %-50 % betrug. Auffällig war hierbei, dass sich mit steigender Tassenanzahl die prozentuale Reduktion verringerte, also eine höhere GKZ im ausgegebenen Kaffee vorlag. Die mikrobiologische Belastung nahm von der ersten bis zur vierten untersuchten Tasse deutlich zu. Dieser Sachverhalt ist besonders gut an der Temperatureinstellung Maximum darzustellen: Bei der ersten Tasse betrug die Reduktion 54,49 % und die GKZ $6,30\text{E}+02$ KbE/mL, bei der vierten Tasse lagen die Werte oberhalb der Nachweisgrenze. Bei der dritten Tasse konnte eine GKZ von $2,82\text{E}+0$ KbE/mL und eine prozentuale Reduktion von 44,15 % nachgewiesen werden. Es wurde aufgrund der unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen der Temperatureinstellungen die prozentuale Reduktion berechnet.

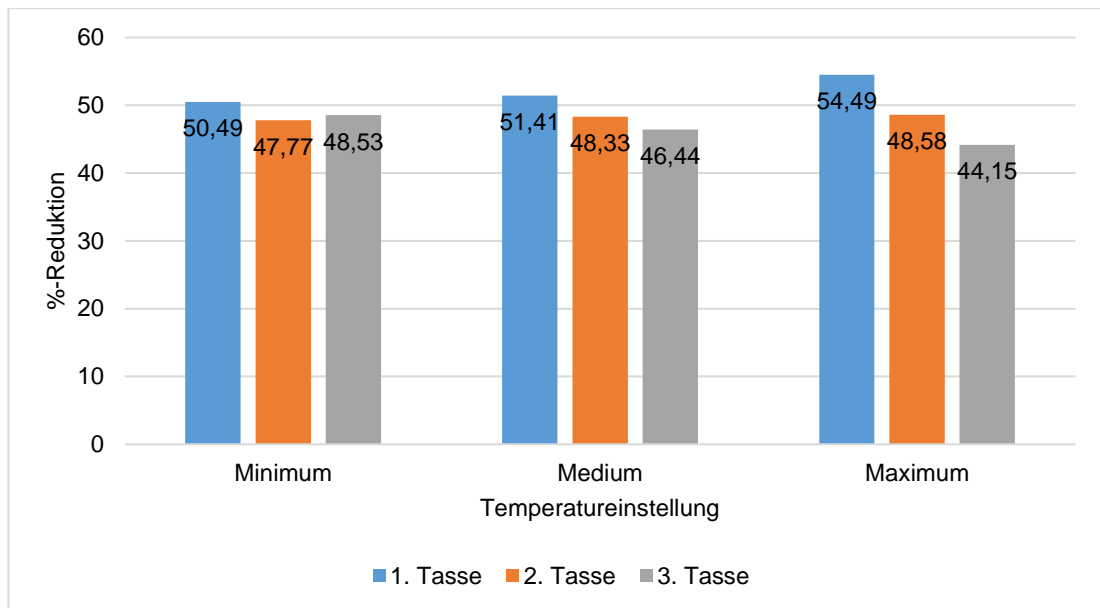


Abbildung 19 Prozentuale Reduktion der Tassenreihenfolge kombiniert mit der Temperatureinstellung.

Anhand Abbildung 19 ist zu erkennen, dass mit Ausnahme der Einstellung „Minimum“ die Reduktion mit zunehmender Tassenanzahl abnahm. Der Unterschied bei Minimum ist jedoch zu vernachlässigen. Die Abnahme der Reduktion ist darauf zurückzuführen, dass der Wasserstand im Wassertank mit zunehmender Tassenanzahl sank und somit die Konzentration der Keimsuspension anstieg. Trotz stetigem Homogenisieren des Wassers mit der Keimsuspension sank diese aufgrund einer höheren Viskosität auf den Wassertankboden ab und wurde so konzentrierter. Dementsprechend stiegen die GKZ und die Reduktion nahm ab. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse müsste eventuell die Reihenfolge der Temperaturstufen variiert werden, um den Einfluss der Reihenfolge an sich zu untersuchen. Normalerweise wäre von einer erhöhten Reduktion bei höheren Temperaturen (Maximum) auszugehen, jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine andere Konstellation. Außerdem sind diese geringen Reduktionen (damit einher geht die enorme mikrobiologische Belastung der Proben) innerhalb weniger Tage zu hinterfragen. Eventuell handelt es sich um einen systematischen Fehler. Dennoch ist eine mikrobiologische Reduktion von ca. 50 % oder weniger bei Temperaturen über 65 °C sehr gering. Die Einwirkdauer der gewählten Temperatur ist voraussichtlich zu kurz und müsste verlängert werden, um eine höhere Reduktion gewährleisten zu können.

In dieser Arbeit wurde bereits eine optimale Kaffeeausgabetemperatur von mindestens 68 °C (bei kontaminierten Mehrwegbechern) genannt. Diese muss basierend auf den Ergebnissen der Simulation mit dem Kaffeevollautomaten teilweise revidiert werden. Die hohe Reduktion bei Temperaturen über 68 °C ist in diesem Fall auf die direkte Einwirkung zu beziehen, d.h. das temperierte Wasser stand sofort und für die gesamte Einwirkzeit (eine und fünf Minuten) in Kontakt mit der eingetrockneten Keimsuspension. Im Falle des Vollautomaten wurde die Keimsuspension jedoch in einem größeren Volumen verwendet und die Temperatur wirkte nicht ununterbrochen und nicht direkt auf die Mikroorganismen, sondern nur während des Aufbrühens im Thermoblock und für deutlich kürzere Zeiten.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit sollten Mindestanforderungen für die Parameter Zeit und Temperatur charakterisiert werden, die einen positiven Einfluss auf die mikrobiologische Qualität und somit auf die Lebensmittelsicherheit haben könnten. Es stellt sich heraus, dass die Einwirkzeit der Temperatur in einem Kaffeevollautomaten zu gering ist, um den Kaffee möglichst keimfrei herstellen zu können. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit wird deutlich, dass die Dauer erhöht werden muss. Ebenfalls sollte die Ausgabetemperatur angehoben werden, da diese im Durchschnitt zu gering war und so die mikrobiologische Belastung vieler Getränkeproben erhöht war. Für weitere Überprüfungen wäre die Konzeption einer Brüheinheit von Vorteil, an welcher die exakte Brühtemperatur und Einwirkzeit programmiert und bestimmt werden könnte. So könnten durch weitere empirische Versuchsreihen genaue Mindestanforderungen für diese Parameter festgelegt werden, die zur Verbrauchersicherheit beitragen würden.

Einige Mikroorganismen wie *Staphylococcus*, *Pseudomonas* und *Bacillus* traten wiederholt in Geräten aus dem Haushalts- und gewerblichen Bereich auf und wurden auch teilweise in anderen Studien identifiziert (Vilanova *et al.*, 2015). Es stellte sich heraus, dass sich die mikrobiologische Belastung zwischen dem Haushalts- und dem gewerblichen Bereich nicht groß unterscheidet, lediglich die Temperaturunterschiede zwischen gewerblichen Geräten und Haushaltskaffeevollautomaten waren auffällig. In der Studie von Vilanova *et al.* (2015) wurde ein charakteristisches „Kaffee-Bakterium“ in den untersuchten Maschinen beschrieben. Jedoch sollte die Identifizierung eines „Kaffee-Mikrobioms“ zusätzlich eruiert werden, da von einer Belastung des Kaffees mit Hefen und Schimmelpilzen auszugehen ist. Dieser Aspekt wäre hinsichtlich einer Untersuchung der Toxin- und Sporenbildung in Kaffeezubereitungen interessant und hilfreich, um auf Grundlage dessen Gegenmaßnahmen für ein sicheres Lebensmittel treffen zu können.

Für die Zukunft wäre es wünschenswert in weiteren Studien die Biofilmbildung in Kaffeevollautomaten zu untersuchen und so eine Grundlage für eine bessere Konzeption von Kaffeevollautomaten („Hygienic Design“ von Wassertanks und wasserführenden Systemen) und deren Reinigungsprogrammen (selbstständiges, automatisiertes Entkalkungsprogramm) zu schaffen. Basierend darauf wäre es von Vorteil, den Einfluss häufigerer Spülungen und Reinigungen auf die mikrobiologische Qualität der Kaffeezubereitungsarten zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Anstieg des TOC-Gehaltes im Spülwasser eines Kaffeevollautomaten mit zunehmender Gebrauchsdauer. Studien mit unterschiedlichen organischen Anschmutzungen würden einen großen Beitrag zur Untersuchung der Biofilmbildung in Kaffeevollautomaten bieten. Ebenfalls könnte diese mit standardisierten Biofilmen auf standardisierten Oberflächen überprüft werden.

In dieser Arbeit wurde die mikrobiologische Kontamination von Mehrwegbechern stichprobenartig untersucht und der Einfluss der Wassertemperatur auf diese Kontaminationen überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kaffeeausgabetemperatur mindestens 68 °C betragen sollte, um die mikrobiologisch belasteten Mehrwegbecher ohne Bedenken verwenden zu können (Inaktivierung der vorhandenen Mikroorganismen). Um der weltweiten Müllentstehung durch die Verpackungen der „Kaffee to go“-Getränke entgegenzuwirken, sollte die Ausgabe in Mehrwegbechern gefördert werden. Jedoch haben viele Betriebe die Sorge, dass durch mitgebrachte Mehrwegbecher ein größeres, unkontrollierbares Hygienerisiko entsteht (Philip Heldt, persönliche Kommunikation). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist nicht von einem Hygienerisiko auszugehen, es sollte jedoch der Kontakt der Mehrwegbecher mit dem Kaffeeauslauf vermieden werden, um Kreuzkontaminationen zu verhindern und die Becher müssen für die hohen Temperaturen der Getränke geeignet sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Hauptrisiko von Vollautomaten (durch unzureichende Reinigung, Verwendung und Pflege der Geräte) sowohl im privaten als auch gewerblichen Bereich ausgeht und nicht von den Behältnissen.

7. Literaturverzeichnis

- ADAM, D., DOERR, H. W., LINK, H., LODE, H.** 2013. *Die Infektiologie*, Springer Verlag, Hamburg, S. 493 ff. , S. 1234 f.
- ANAYA, D.** 2007. *Mathematisch-Statistische Modellierung von Schäumen*. diplom.de, S. 19 ff.
- ARRIETA, G., HERNANDEZ, A., ESPINOZA, A. M.** 2004. *Diversity of Bacillus thuringiensis strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer Hypothenemus hampei*. Rev Biol Trop, 52, 757-64.
- ASHBOLT, N. J.** 2015. *Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems*. Curr Environ Health Rep, 2, 95-106.
- BALTES, W.** 2013. *Lebensmittelchemie*, Springer Verlag, Hamburg, S. 276.
- BAST, E.** 2001. *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- BAUMGART, J., BECKER, B., STEPHAN, R.** 2014. *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln: Ein Leitfaden für das Studium*, Behr's Verlag, Hamburg
- BAYRISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, SÄCHSISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT THÜRINGER LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT.** 2005. *Schimmelpilze und Mykotoxine in Futtermitteln*. [Accessed 23.01.2017].
- BEDIENUNGSANLEITUNG PHILIPS HD8844** 2016. *Bedienungsanleitung Espressovollautomat Philips HD8844*,,.
- BLADEL, I., WAGNER, K., BECK, A., SCHILLING, J., ALEXANDER SCHMIDT, M., HEUSIPP, G.** 2013. *The H-NS protein silences the pyp regulatory network of Yersinia enterocolitica and is involved in controlling biofilm formation*. FEMS Microbiol Lett, 340, 41-8.
- BRANDEINS.DE.** 2013. *Kaffeereport 2013* [Online]. https://www.brandeins.de/fileadmin/redaktion/wissen/kaffee_in_zahlen/Kaffeereport2013.pdf. (Accessed 13.11.2016)
- BRUCKMAIER, R. M.** 2007. *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 113 ff.
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 15/1997** 1997. *BgVV empfiehlt Höchstmengen für Ochratoxin in Lebensmitteln*.
- CBS PITTSBURGH.** 2015. *Coffee Crud: Harmful Bacteria Found In Coffee Makers* [Online]. <http://pittsburgh.cbslocal.com/2015/05/18/coffee-crud/>. (Accessed 25.11.2016)
- CHAVES, J. Q., CAVADOS CDE, F., VIVONI, A. M.** 2012. *Molecular and toxigenic characterization of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis strains isolated from commercial ground roasted coffee*. J Food Prot, 75, 518-22.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D., JAMES, G.** 1994. *Biofilms, the customized microniche*. J Bacteriol, 176, 2137-42.
- DE MELO PEREIRA, G. V., SOCCOL, V. T., PANDEY, A., MEDEIROS, A. B., ANDRADE LARA, J. M., GOLLO, A. L., SOCCOL, C. R.** 2014. *Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process*. Int J Food Microbiol, 188, 60-6.

- DEUTSCHE UMWELTHILFE.** 2016. *Becherheld: Mehrweg to go: Problem Kaffeebecher* [Online]. http://www.duh.de/becherheld_problem.html. (Accessed 13.11.2016)
- DGHM** 2001. *Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren.* In: DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (ed.).
- DGHM** 2012. *Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln* In: DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (ed.).
- DIN 10113-1** 1997. *Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich Teil 1: Quantitatives Tupfverfahren,* Deutsches Institut für Normung, Berlin.
- DIRHEIMER, G.CREPPY, E. E.** 1991. *Mechanism of action of ochratoxin A.* IARC Sci Publ, 171-86.
- DIRK BOCKMÜHL.** persönliche Kommunikation.
- DOGEN, A., KAPLAN, E., OKSUZ, Z., SERIN, M. S., ILKIT, M.DE HOOG, G. S.** 2013. *Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey.* Med Mycol, 51, 493-8.
- DONLAN, R. M.COSTERTON, J. W.** 2002. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.* Clin Microbiol Rev, 15, 167-93.
- EBERMANN, R.ELMADFA, I.** 2011. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie und Ernährung,* Springer Verlag, Wien, S. 500 ff.
- EG 178/2002** 2002. *Verordnung zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.* EU Parlament und Rat.
- EG 852/2004** 2004. *Verordnung über Lebensmittelhygiene. Anhang 2, Kapitel 5: Vorschriften für Ausrüstungen.* EU Parlament und Rat.
- EG 1881/2006** 2006. *Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.* EU Kommission.
- EG 1935/2004** 2004. *Verordnung über Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen.* EU Parlament und Rat.
- FINK-GREMMELS, J., JAHN, A.BLOM, M. J.** 1995. *Toxicity and metabolism of ochratoxin A.* Nat Toxins, 3, 214-20; discussion 221.
- FLEMMING, H. C., NEU, T. R.WOZNIAK, D. J.** 2007. *The EPS matrix: the "house of biofilm cells".* J Bacteriol, 189, 7945-7.
- FOCUS.DE.** 2016. *Auf Knopfdruck: Dieses Risiko geht von vielen Kaffeevollautomaten aus* [Online]. http://www.focus.de/gesundheit/videos/gesundheitsgefahrdend-auf-knopfdruck-dieses-risiko-geht-von-kaffeevollautomaten-aus_id_5431493.html. (Accessed 25.11.2016)
- FUCHS, G.** 2007. *Allgemeine Mikrobiologie,* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 183.
- GATTLEN, J., AMBERG, C., ZINN, M.MAUCLAIRE, L.** 2010. *Biofilms isolated from washing machines from three continents and their tolerance to a standard detergent.* Biofouling, 26, 873-82.

- HAMATSCHEK, J.** 2016. *Lebensmitteltechnologie: Die industrielle Herstellung von Lebensmitteln aus landwirtschaftlichen Rohstoffen*, UTB, Stuttgart, S. 101 f.
- HEESCHEN, W.ZSCHALER, R.** 2015. *Prozesshygiene*, Behr's Verlag, Hamburg, S. 90.
- HOELL, K.** 2011. *Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, S. 234.
- HOLZAPFEL, W.** 2007. *Mikrobiologie der Lebensmittel-Lebensmittel pflanzlicher Herkunft*, Behr's Verlag, Hamburg.
- HONISCH, M., STAMMINGER, R. BOCKMÜHL, D. P.** 2014. *Impact of wash cycle time, temperature and detergent formulation on the hygiene effectiveness of domestic laundering*. J Appl Microbiol, 117, 1787-97.
- HOSSEINI, S. MARTINEZ-CHAPA, S.** 2016. *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis: Applications in Bio-diagnosis, Tissue Engineering and Drug Delivery*, Springer Verlag, Hamburg.
- KAFFEE-VOLLAUTOMATEN-VERGLEICH.** 2016. *Kaffeevollautomaten-Test: Was bedeutet Kaffeevollautomat?* [Online]. <http://www.kaffeevollautomat-vergleich.de/was-bedeutet-kaffeevollautomat/> (Accessed 17.11.2016)
- KAGEMANN, G., HILGENBERG, B., RECH, J., HEINTZ, M. VOSSEBEIN, L.** 2008. *Use of Biomonitors for the validation of chemo-thermal disinfecting washing procedures*. Journal of Surfactants and Detergents, 45, S. 334-339.
- KANNAN, A. GAUTAM, P.** 2015. *A quantitative study on the formation of Pseudomonas aeruginosa biofilm*. Springerplus, 4, 379.
- KHAN, F. Y., ABUKHATTAB, M. ANAND, D.** 2013. *Nosocomial Escherichia coli meningitis in adults: Report of four cases and literature review*. J Neurosci Rural Pract, 4, 349-51.
- KLUWER ACADEMIC** 2005. *Microorganisms in Food 6 th Edition*, ICMSF, New York, S. 452 ff. , 457.
- KRÄMER, J.** 2011. *Lebensmittel-Mikrobiologie*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, S. 75 ff. , S. 92 ff. , S. 146, S. 256/257, S. 321 ff. .
- KUNZ, B.** 2015. *Lebensmittelbiotechnologie: Mikrobiologie-Enzyme-Bioprosesstechnik-biotechnologische Prozesse*, Behr's Verlag, Hamburg, S. 264 ff.
- KUROKI, R., KAWAKAMI, K., QIN, L., KAJI, C., WATANABE, K., KIMURA, Y., ISHIGURO, C., TANIMURA, S., TSUCHIYA, Y., HAMAGUCHI, I., SAKAKURA, M., SAKABE, S., TSUJI, K., INOUE, M. WATANABE, H.** 2009. *Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis*. Intern Med, 48, 791-6.
- LEBENSMITTELHYGIENE-VERORDNUNG** 2016. *Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Lebensmitteln*. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz.
- LGL BAYERN.** 2012. *Kaffee-, Kaffeeersatzstoffe* [Online]. https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/warengruppen/wc_46_kaffee/index.htm#mehr. (Accessed 13.11.2016)
- LGL BAYERN.** 2014. *Ochratoxine* [Online]. <http://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/chemie/schimmelpilzgifte/ochratoxine/index.htm#lebensmitteln>. (Accessed 26.01.2107)

- LIDUMA, I., TRACEVSKA, T., BERS, U.ZILEVICA, A.** 2012. *Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by Staphylococcus epidermidis*. *Medicina (Kaunas)*, 48, 305-9.
- LIU, S., GUNAWAN, C., BARRAUD, N., RICE, S. A., HARRY, E. J.AMAL, R.** 2016. *Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems*. *Environ Sci Technol*, 50, 8954-76.
- MARTI, S., RODRIGUEZ-BANO, J., CATEL-FERREIRA, M., JOUENNE, T., VILA, J., SEIFERT, H.DE, E.** 2011. *Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by Acinetobacter species*. *BMC Res Notes*, 4, 5.
- MATISSEK, R.BALTES, W.** 2015. *Lebensmittelchemie*, SpringerSpektrum, Berlin, S. 490 ff.
- MILCH-GÜTEVERORDNUNG** 2010. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz.
- MONROE, D.** 2007. *Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms*. *PLoS Biol*, 5, e307.
- MONTEBUGNOLI, L., SAMBRI, V., CAVRINI, F., MARANGONI, A., TESTARELLI, L.DOLCI, G.** 2004. *Detection of DNA from periodontal pathogenic bacteria in biofilm obtained from waterlines in dental units*. *New Microbiol*, 27, 391-7.
- MUECKE, W.LEMMEN, C.** 2004. *Schimmelpilze: Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen*, ecomed-Storck GmbH, Landsberg, S. 84 ff.
- MÜHLHARDT, C.** 2013. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, Springer Verlag, Hamburg, S. 148.
- NIX, I., FRONTZEK, A. BOCKMUEHL, D. P.** 2015. *Characterization of Microbial Communities in Household Washing Machines*. *Tenside Surfactants Detergents*, 52, 432-440.
- OSTRY, V., MALIR, F.RUPRICH, J.** 2013. *Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin*. *Toxins (Basel)*, 5, 1574-86.
- PHILIP HELDT.** persönliche Kommunikation. *RE: Korrespondenz zum Thema Abfüllung von Getränken in mitgebrachte Becher*.
- PICHHARDT, K.** 2013. *Lebensmittelmikrobiologie: Grundlagen für die Praxis*, Springer Verlag, Hamburg, S. 80/81.
- QUENTIN, K.** 2013. *Trinkwasser: Untersuchung und Beurteilung von Trink- und Schwimmbadwasser*, Springer Verlag, Hamburg, S. 243.
- RIMBACH, G., NAGURSKY, J.ERBERSDOBLER, H.** 2015. *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*, Springer Verlag, Hamburg, S. 283 ff.
- ROLLE, M.** 2007. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 354 f.
- SCHAECHTER, M. E.,** , 2009. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press. S. 133 ff.
- SCHILLER, J.** 2004. *MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Analytik von Lipiden, Proteinen und biologischen Kohlenhydraten* [Online]. Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Leipzig.)
- SCHUBERT, S.WIESER, A.** 2010. *MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik*. *BIOspektrum*, 16, 760-762.

- STATISTA.COM.** 2013. *Täglicher Pro-Kopf-Konsum von Kaffee weltweit nach Ländern im Jahr 2013 (in Tassen)* [Online]. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/319915/umfrage/taeglicher-pro-kopf-konsum-von-kaffee-weltweit-nach-laendern/> (Accessed 13.11.2016)
- STATISTISCHES BUNDESAMT** 2015. *In 12 % der Haushalte steht ein Kaffeevollautomat* https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/zdw/2015/PD15_008_p002pdf.pdf?blob=publicationFile.
- STEINBUECHEL, A., OPPERMAN-SANIO, F. B., EWERING, C. POETTER, M.** 2012. *Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie*, Springer Verlag, Heidelberg, S. 127.
- STERN.DE.** 2013. *Kaffeevollautomaten richtig reinigen: So verhindern Sie Keime im Kaffee* [Online]. <http://www.stern.de/genuss/trinken/ratgeber-kaffee/kaffeevollautomaten-richtig-reinigen-so-verhindern-sie-keime-im-kaffee-3645240.html>. (Accessed 25.11.2016)
- STERRY, W.** 2013. *Kurzlehrbuch Dermatologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 52 f.
- SUERBAUM, S., HAHN, H., BURCHARD, G., KAUFMANN, S. SCHULZ, T.** 2012. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag, Hamburg S. 181.
- SZEWZYK, U. SZEWZYK, R.** 2003. *Biofilme-die etwas andere Lebensweise*, Biospektrum, Heidelberg 9(3), 253-255.
- TRINKWV** 2012. *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch* In: VERBRAUCHERSCHUTZ, B. D. J. U. F. (ed.).
- UMWELTBUNDESAMT** 2015. *Aufkommen und Verwertung von Verpackungsabfällen in D 2012*.
- VERBRAUCHERZENTRALE HAMBURG.** 2016. *Der Becher soll gehen* [Online]. <http://www.vzhh.de/umwelt/357189/der-becher-soll-gehen.aspx>. (Accessed 13.11.2016)
- VILANOVA, C., IGLESIAS, A. PORCAR, M.** 2015. *The coffee-machine bacteriome: biodiversity and colonisation of the wasted coffee tray leach*. Sci Rep, 5, 17163.
- WALLHAEUßER, K.-H.** 2013. *Lebensmittel und Mikroorganismen: Frischware-Konservierungsmethoden-Verderb*, Springer Verlag, Hamburg, S. 287.
- WATERS, D. M., ARENDT, E. K. MORONI, A. V.** 2016. *Overview on the mechanisms of coffee germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage quality*. Crit Rev Food Sci Nutr, 57, 259-274.
- WEBER, H.** 2010. *Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 1: Grundlagen*, Behr's Verlag, Hamburg, S. 319/320.

8. Anhang

Tabelle 20 Keimzahlen zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl.

Organismus	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	KbE/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	>300	144	4	1	1,4*10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	>300	>300	60	14	6,7*10 ⁹
<i>Enterococcus faecium</i>	>300	150	16	5	1,5*10 ⁹
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>300	115	19	2	2,7*10 ⁹
<i>Acinetobacter baumannii</i>	>300	>300	75	5	7,5*10 ⁹

Tabelle 21 Detaillierte Auflistung aller MALDI-TOF-MS Ergebnisse.

Nummer	Probenart	Agar	Organismus	Score Value
1	A	MacC.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,01
1.1	A	MEA	<i>Candida pararugosa</i>	2,04
1.2	A	MEA	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,82
1	A	TSA	<i>Microbacterium maritypicum</i>	1,99
2	A	MacC.	No Identification	1,58
4.1	A	TSA	No Identification	1,58
4.2	A	TSA	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	1,80
4	A	MacC.	<i>Delftia acidovorans</i>	2,02
5	A	TSA	No Identification	1,28
1	HK	TSA	No Identification	1,41
3.1	HK	MacC.	<i>Bacillus cereus</i>	2,11
3.2	HK	MacC.	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,21
4	HK	TSA	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,93
5	HK	TSA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,09
6	HK	TSA	<i>Escherichia coli</i>	2,20
7	HK	TSA	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,04
8	HK	MacC.	No Identification	1,53
10	HK	TSA	No Identification	1,65
2	M	TSA	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,17

1.1	W	TSA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,79
1.2	W	TSA	<i>Sphingobium cloacae</i>	1,75
1	W	MacC.	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,29
2.1	W	TSA	<i>Chryseobacterium sp</i>	1,95
2.2	W	TSA	<i>Microbacterium arborescens</i>	1,85
2	W	MEA	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,82
4	W	TSA	<i>Microbacterium oxydans</i>	2,10
4	W	MEA	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,91
4	W	MacC.	No Identification	1,43
5	W	TSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,12
5	W	MEA	No Identification	1,69
12	GK	TSA	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,13
15	GK	MacC.	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,24
23	GK	TSA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,09
32	GK	MacC.	<i>Bacillus cereus</i>	2,24
38	GK	MacC.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,15
39	GK	TSA	<i>Microbacterium oxydans</i>	2,02
46	GK	MacC.	<i>Bacillus cereus</i>	2,18

Tabelle 22 Detaillierte Auflistung aller gewerblichen Kaffeevollautomaten mit Nummerierung (vgl. MALDI-TOF-MS Ergebnisse) und Ausgabetemperatur.

Nummer	Modell	Kaffeetemp.	Cappuccino-
		(in °C)	temp. (in °C)
1	WMF Cafemat + Schärf Xpress	66,2	63,2
2	La Cimbali S39 TE	67,3	63,9
3	Thermoplan Black&White 3	62,4	60,2
4	La Cimbali S39 TE	66	62,1
5	De Longhi ESAM 6600	66,1	63,1
6	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	64,9	60
7	WMF Cafemat + Schärf Xpress	67	61,9
8	Jura Impressa F8 TFT	59,9	57,1
9	Jura Giga 5	62	59,2

10	Siemens TI 909701 HC	68	62,7
11	Bonamat Esprecious 22	64,2	58,7
12	Jura Giga X7	62,3	57,8
13	Saeco Aulika One Touch	63,4	61,2
14	Franke Kaffevollautomat FM 850	61,3	58,7
15	Jura Giga X7	60,1	59
16	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	60,9	61,1
17	La Cimbali S39 TE	65,9	63,4
18	Thermoplan Black&White 3	61,1	57,2
19	De Longhi ESAM 6000	60,9	56,1
20	Jura Giga 5	64,2	61,2
21	Jura Giga X7	64,3	62,9
22	Jura Giga 5	63,9	58,2
23	La Cimbali S39 TE	61,3	57,6
24	Saeco Aulika One Touch	62,4	61,3
25	Thermoplan Black&White 3	64	60,2
26	Bonamat Esprecious 22	65,3	61,1
27	De Longhi ESAM 6600	67,2	62,3
28	Franke Kaffevollautomat FM 850	63,3	59,8
29	Jura Giga X7	63,9	60,3
30	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	65,4	61,5
31	Jura Giga 5	60,7	57,9
32	Jura Impressa F8 TFT	58,6	56,3
33	WMF Cafemat + Schärf Xpress	67,1	63,8
34	Saeco Aulika One Touch	63,5	60,9
35	Thermoplan Black&White 3	62,2	59,6
36	Animo OptiVend 4	65,1	62
37	WMF 1000 S	68,3	63,4
38	Saeco Royal HD8920	57	56,4
39	Necta Solista Espresso	61,7	59
40	Privileg Edition 50	65,2	61,3
41	Jura Z6 Carbon One Touch	64,9	62,1

42	Bonamat Esprecious 11	63,8	60,5
43	WMF Cafemat + Schärf Xpress	64	61,6
44	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	62,3	60,1
45	De Longhi ESAM 6600	63,4	59,8
46	Jura Impressa F8 TFT	60,4	57,2
47	Animo OptiVend 4	65	60,3
48	Bonamat Esprecious 22	65,2	61,9
49	Jura Giga X7	63,9	59,6
50	WMF Cafemat + Schärf Xpress	63,5	60,2
MW		63,59	60,34

Tabelle 23 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der gewerblichen Kaffeeproben.

	Modell	TSA		GKZ
		1,00E+00	1,00E-01	
1	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
2	La Cimbali S39 TE	0	0	0,00E+00
3	Thermoplan Black&White 3	0	0	0,00E+00
4	La Cimbali S39 TE	0	0	0,00E+00
5	De Longhi ESAM 6600	1	9	0,00E+00
6	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	0	0	0,00E+00
7	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
8	Jura Impressa F8 TFT	11	3	1,10E+02
9	Jura Giga 5	0	0	0,00E+00
10	Siemens TI 909701 HC	0	0	0,00E+00
11	Bonamat Esprecious 22	0	0	0,00E+00
12	Jura Giga X7	17	1	1,70E+02
13	Saeco Aulika One Touch	5	0	0,00E+00
14	Franke Kaffevollautomat FM 850	0	0	0,00E+00
15	Jura Giga X7	34	19	4,82E+02
16	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	21	8	2,10E+02
17	La Cimbali S39 TE	0	0	0,00E+00
18	Thermoplan Black&White 3	23	17	3,64E+02
19	De Longhi ESAM 6000	11	3	1,10E+02
20	Jura Giga 5	0	0	0,00E+00
21	Jura Giga X7	0	0	0,00E+00
22	Jura Giga 5	0	0	0,00E+00
23	La Cimbali S39 TE	47	14	5,55E+02
24	Saeco Aulika One Touch	13	1	1,30E+02

25	Thermoplan Black&White 3	0	0	0,00E+00
26	Bonamat Esprecious 22	0	0	0,00E+00
27	De Longhi ESAM 6600	0	0	0,00E+00
28	Franke Kaffeevollautomat FM 850	0	0	0,00E+00
29	Jura Giga X7	0	0	0,00E+00
30	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	0	0	0,00E+00
31	Jura Giga 5	16	1	1,60E+02
32	Jura Impressa F8 TFT	32	11	3,91E+02
33	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
34	Saeco Aulika One Touch	0	0	0,00E+00
35	Thermoplan Black&White 3	21	7	2,10E+02
36	Animo OptiVend 4	6	0	0,00E+00
37	WMF 1000 S	0	0	0,00E+00
38	Saeco Royal HD8920	52	23	6,82E+02
39	Necta Solista Espresso	12	2	1,20E+02
40	Privileg Edition 50	0	0	0,00E+00
41	Jura Z6 Carbon One Touch	0	0	0,00E+00
42	Bonamat Esprecious 11	0	0	0,00E+00
43	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
44	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	9	0	0,00E+00
45	De Longhi ESAM 6600	17	3	1,70E+02
46	Jura Impressa F8 TFT	24	4	2,40E+02
47	Animo OptiVend 4	0	0	0,00E+00
48	Bonamat Esprecious 22	0	0	0,00E+00
49	Jura Giga X7	12	0	1,20E+02
50	WMF Cafemat + Schärf Xpress	17	8	1,70E+02
MW				8,79E+01

Tabelle 24 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der gewerblichen Cappuccino-Proben.

	Modell	TSA		GKZ
		1,00E+00	1,00E-01	
1	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
2	La Cimbali S39 TE	0	0	0,00E+00
3	Thermoplan Black&White 3	0	0	0,00E+00
4	La Cimbali S39 TE	0	0	0,00E+00
5	De Longhi ESAM 6600	0	3	0,00E+00
6	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	21	2	2,10E+02
7	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
8	Jura Impressa F8 TFT	77	34	1,01E+03
9	Jura Giga 5	0	0	0,00E+00
10	Siemens TI 909701 HC	0	1	0,00E+00
11	Bonamat Esprecious 22	0	0	0,00E+00

12	Jura Giga X7	34	22	5,09E+02
13	Saeco Aulika One Touch	0	0	0,00E+00
14	Franke Kaffevollautomat FM 850	10	0	1,00E+02
15	Jura Giga X7	89	25	1,04E+03
16	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	36	12	4,36E+02
17	La Cimbali S39 TE	0	0	0,00E+00
18	Thermoplan Black&White 3	13	3	1,30E+02
19	De Longhi ESAM 6000	10	0	1,00E+02
20	Jura Giga 5	0	0	0,00E+00
21	Jura Giga X7	0	0	0,00E+00
22	Jura Giga 5	0	0	0,00E+00
23	La Cimbali S39 TE	67	23	8,18E+02
24	Saeco Aulika One Touch	31	16	4,27E+02
25	Thermoplan Black&White 3	0	0	0,00E+00
26	Bonamat Esprecious 22	0	0	0,00E+00
27	De Longhi ESAM 6600	0	0	0,00E+00
28	Franke Kaffevollautomat FM 850	0	0	0,00E+00
29	Jura Giga X7	0	0	0,00E+00
30	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	0	0	0,00E+00
31	Jura Giga 5	53	24	7,00E+02
32	Jura Impressa F8 TFT	64	34	8,91E+02
33	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
34	Saeco Aulika One Touch	0	0	0,00E+00
35	Thermoplan Black&White 3	23	19	3,82E+02
36	Animo OptiVend 4	0	0	0,00E+00
37	WMF 1000 S	0	0	0,00E+00
38	Saeco Royal HD8920	79	54	1,21E+03
39	Necta Solista Espresso	6	1	0,00E+00
40	Privileg Edition 50	0	0	0,00E+00
41	Jura Z6 Carbon One Touch	0	0	0,00E+00
42	Bonamat Esprecious 11	0	0	0,00E+00
43	WMF Cafemat + Schärf Xpress	0	0	0,00E+00
44	RLX bravilor bonamat + Tiger Milk	0	0	0,00E+00
45	De Longhi ESAM 6600	23	25	4,36E+02
46	Jura Impressa F8 TFT	44	27	6,45E+02
47	Animo OptiVend 4	0	0	0,00E+00
48	Bonamat Esprecious 22	0	0	0,00E+00
49	Jura Giga X7	6	7	0,00E+00
50	WMF Cafemat + Schärf Xpress	12	6	1,20E+02
	MW			1,83E+02

Tabelle 25 Detaillierte Auflistung aller (privaten) Haushaltskaffeefullautomaten mit Nummerierung (bzgl. MALDI-TOF-MS Ergebnissen) und Kaffeeausgabetemperaturen.

Nummer	Modell	Kaffeetemp. (in °C)
1	Impressa S9/57 avantgarde	61,2
2	AEG Electrolux Caffè` Silenzio	54,3
3	De Longhi Magnifica Pronto Cappuccino	59,1
4	Saeco Moltio HD8769	63,4
5	Gaggenau CM 250	60
6	Saeco Royal Professional	67,4
7	Saeco Moltio HD8763	64,1
8	De Longhi Perfecta ESAM 5550	63,2
9	Impressa C 65	58,3
10	Saeco Incanto HD8917	62,2
MW		61,32

Tabelle 26 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der Kaffee-Getränkeproben aus Haushaltskaffeefullautomaten.

	Modell	TSA		GKZ (KbE/mL)
		1,00E+00	1,00E-01	
1	Impressa S9/57 avantgarde	0	0	0,00E+00
2	AEG Electrolux Caffè` Silenzio	0	0	0,00E+00
3	De Longhi Magnifica Pronto Cappuccino	>300	91	>3,55E+03
4	Saeco Moltio HD8769	0	0	0,00E+00
5	Gaggenau CM 250	2	0	0,00E+00
6	Saeco Royal Professional	7	1	0,00E+00
7	Saeco Moltio HD8763	0	0	0,00E+00
8	De Longhi Perfecta ESAM 5550	3	1	0,00E+00
9	Impressa C 65	0	0	0,00E+00

10	Saeco Incanto HD8917	84	17	9,18E+02
	MW			>4,47E+02

Tabelle 27 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der Wassertanks der Haushaltskaffeevollautomaten.

	Modell	TSA		GKZ (KbE/mL)
		1,00E+00	1,00E-01	
1	Impressa S9/57 avantgarde	>300	127	>3,88E+03
2	AEG Electrolux Caffè` Silenzio	111	55	1,53E+03
3	De Longhi Magnifica Pronto Cappuccino	>300	113	>3,75E+03
4	Saeco Moltio HD8769	>300	>300	>5,45E+03
5	Gaggenau CM 250	180	19	1,81E+03
6	Saeco Royal Professional	298	121	3,81E+03
7	Saeco Moltio HD8763	>300	154	>4,13E+03
8	De Longhi Perfecta ESAM 5550	190	23	1,94E+03
9	Impressa C 65	102	69	1,55E+03
10	Saeco Incanto HD8917	>300	>300	>5,45E+03
	MW			>3,33E+03

Tabelle 28 Detaillierte Keimzahlen mit Angabe der GKZ in KbE/mL der Ausläufe der Haushaltskaffeevollautomaten.

	Modell	TSA		GKZ (KbE/mL)
		1,00E+00	1,00E-01	
1	Impressa S9/57 avantgarde	>300	190	>4,45E+03
2	AEG Electrolux Caffè` Silenzio	26	8	2,60E+02

3	De Longhi Magnifica Pronto Cappuccino	>300	181	>4,37E+03
4	Saeco Moltio HD8769	>300	89	>3,54E+03
5	Gaggenau CM 250	80	17	8,82E+02
6	Saeco Royal Professional	0	0	0,00E+00
7	Saeco Moltio HD8763	>300	124	>3,85E+03
8	De Longhi Perfecta ESAM 5550	97	11	9,82E+02
9	Impressa C 65	27	11	3,45E+02
10	Saeco Incanto HD8917	>300	111	>3,74E+03
MW				>2,24E+03

Tabelle 29 Übersichtsdarstellung der Keimzahlen und der GKZ in KbE/mL der Temperatureinstellungen Minimum, Medium und Maximum.

	1,00E+00	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	GKZ
Min.	>300	>300	>300	294	191	76	2,53E+06
	>300	>300	>300	>300	254	67	2,92E+07
	>300	>300	>300	271	178	51	4,50E+06 1,21E+07
Med.	>300	>300	>300	280	157	51	2,20E+06
	>300	>300	>300	271	123	19	3,72E+06
	>300	>300	>300	>300	147	32	1,63E+07 7,40E+06
Max.	>300	>300	290	201	112	34	5,73E+05
	>300	>300	>300	234	144	56	3,91E+06
	>300	>300	>300	212	103	15	2,97E+06 2,49E+06

Tabelle 30 Koloniezahlen der Verdünnungsstufen und Gesamtkeimzahlen der Mehrwegbecherproben.

Nummer	TSA			MacConkey		
	1,00E+00	1,00E-01	KbE/mL	1,00E+00	1,00E-01	KbE/mL
1	0	0	0,00E+00	>300	>300	>5,45E+03
2	>300	>300	>5,45E+03	77	6	7,70E+02

3	>300	>300	>5,45E+03	>300	211	>4,65E+03
4	71	0	7,10E+02	13	1	1,30E+02
5	>300	11	>2,83E+03	0	0	0,00E+00
6	0	0	0,00E+00	>300	211	>4,65E+03
7	111	17	1,16E+03	0	0	0,00E+00
8	>300	270	>5,18E+03	0	0	0,00E+00
9	187	57	2,22E+03	213	98	2,83E+03
10	0	0	0,00E+00	>300	>300	>5,45E+03
<i>Mittelwert</i>			>2,56E+03			>2,39E+03

Tabelle 31 Auflistung aller gemessenen Temperaturen bei der Simulation mit dem Haushaltskaffeevollautomaten.

Temperaturen in °C					
	Tassen	1. WDH	2. WDH	3. WDH	MW
Minimum	1	64	63,6	64,2	63,93
	2	62,3	61,9	62,6	62,27
	3	63,1	62,8	64,1	63,33
	4	63,2	63,4	64,2	63,60
Medium	1	66,7	67,1	67,2	67,00
	2	67,9	68,2	68,9	68,33
	3	66,8	66,9	66,1	66,60
	4	67,1	66,7	67,2	67,00
Maximum	1	68,8	69,2	68,3	68,77
	2	69,4	69,7	69,1	69,40
	3	69,1	68,9	68,7	68,90
	4	69,5	69,5	70,1	69,70

Tabelle 32 Darstellung aller Keime pro Platte der jeweiligen Wiederholung (WDH.) bei den Versuchen an dem Haushaltskaffeevollautomat Philips HD8844.

	Tassen		1. WDH	2. WDH	3. WDH	
Minimum	1	<i>1,00E+00</i>	114	123	143	
		<i>1,00E-01</i>	67	79	84	
	2	<i>1,00E+00</i>	254	198	176	
		<i>1,00E-01</i>	112	100	112	
	3	<i>1,00E+00</i>	250	242	>300	
		<i>1,00E-01</i>	120	145	134	
	4	<i>1,00E+00</i>	>300	>300	>300	
		<i>1,00E-01</i>	>300	>300	>300	
	Medium	1	<i>1,00E+00</i>	103	111	119
			<i>1,00E-01</i>	51	49	64
		2	<i>1,00E+00</i>	201	190	178
			<i>1,00E-01</i>	79	67	55
3		<i>1,00E+00</i>	267	200	231	
		<i>1,00E-01</i>	122	144	126	
4		<i>1,00E+00</i>	>300	>300	>300	
		<i>1,00E-01</i>	>300	>300	>300	
Maximum		1	<i>1,00E+00</i>	57	37	52
			<i>1,00E-01</i>	28	14	20
		2	<i>1,00E+00</i>	125	97	101
			<i>1,00E-01</i>	61	55	49
	3	<i>1,00E+00</i>	207	212	198	
		<i>1,00E-01</i>	101	91	123	
	4	<i>1,00E+00</i>	>300	>300	>300	
		<i>1,00E-01</i>	>300	>300	>300	

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt und durch meine Unterschrift, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Inhalte und Passagen, die aus fremden Quellen stammen und direkt oder indirekt übernommen worden sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Ferner versichere ich, dass ich keine andere, außer der im Literaturverzeichnis angegebenen Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich sowohl auf Textinhalte sowie alle enthaltenen Abbildungen, Skizzen und Tabellen. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Krefeld, 03.02.2017