

### **2.5 Das Wirkprinzip Hitze**

#### **2.5.1 Verfahren der Hitzeanwendung**

Unterschieden wird zwischen physikalischen und chemischen Inaktivierungsverfahren. Unter die physikalischen Verfahren fallen Hitze, UV- Licht, ionisierende Strahlen sowie Ultraschall. Nach wie vor gilt Hitze als das weitaus zuverlässigste Mittel zur Inaktivierung bzw. Abtötung von Mikroorganismen. Vor einer Hitzebehandlung ist allerdings zu klären, ob das zu behandelnde Material einer Hitzebehandlung zugänglich ist bzw. diese verträgt.

Hitze kann in feuchter oder trockener Weise verwendet werden. Feuchte Hitze (heißes Wasser oder Dampf) ist im Vergleich zu trockener Hitze gleicher Temperatur deutlich wirksamer: Luft ist ein schlechterer Wärmeleiter als Wasserdampf (MROZEK 1996; BÖHM 2002). Deshalb sind bei der Trocken- Sterilisation höhere Temperaturen und längere Einwirkungszeiten erforderlich. Außerdem werden Proteine in feuchtem Milieu sehr viel leichter denaturiert als in wasserarmen Zustand (MROZEK 1996). Feuchte Hitze bewegt sich im Bereich von <100 °C im Dampftopf und >100 °C im Autoklaven.

Trockene Hitze dient vor allem zur Sterilisation von Instrumenten und hitzestabilen Geräteteilen.

Um eine nachhaltige Wirkung zu erzielen, muss gewährleistet sein, dass die Hitze tatsächlich die Mikroorganismen erreicht: Schmutz- bzw. Schutzschichten dürfen die Mikroorganismen möglichst wenig überlagern und somit abschirmen. Die Einwirkungszeiten von Hitze verlängern sich bei Vorhandensein schützenden organischen oder anorganischen Materials beträchtlich (BÖHM 2002).

#### **2.5.2 Einfluss von Hitze auf Mikroorganismen**

Mikroorganismen variieren stark hinsichtlich Größe und Aufbau. Dies drückt sich auch in ihrer unterschiedlichen Resistenz gegenüber den einzelnen Desinfektionsmaßnahmen aus. Einen grundlegenden Unterschied bezüglich der Mechanismen der Schädigung muss man zwischen den Viren ohne eigenen Stoffwechsel und den Mikroorganismen mit eigenen Stoffwechselaktivitäten (Bakterien, Pilze) sehen (SCHLIESSER 1981).

Das Entwicklungsstadium, in welchem sich ein Organismus befindet, hat entscheidenden Einfluss auf seine Hitzeresistenz. Zellen im Wachstum (logarithmische Phase) sind deutlich

hitzeanfälliger als solche in der stationären Phase. Die Hitzeresistenz nimmt gewöhnlich während der stationären Phase zu (GENIGEORGIS 1998).

Bakteriensporen nehmen eine Sonderstellung ein. Sie sind Dauerformen und aufgrund mehrschichtiger Membranhüllen (bis zu 6 Hüllen), Einlagerung von Ca– Dipicolinat und Fehlen von freiem Wasser gegen äußere Einflüsse (Hitze, Austrocknung, Chemikalien) besonders widerstandsfähig (SCHLIESSER 1981).

Procaryoten (Bakterien) und Eukaryoten (Pilze) haben außer einer eigenen Stoffwechselaktivität einen ähnlichen zellulären Aufbau (Zellwand, Zytoplasmamembran, Zytoplasma). Daher verläuft ihre Zerstörung nach einem annähernd gleichen Prinzip. Wichtig sind neben der Art, Intensität und Angriffspunkten der Noxen die Gruppen–, Gattungs– oder speziesspezifischen Eigenschaften der Mikroorganismen. Laut AUER (2002) hängt die unterschiedliche Resistenz der verschiedenen Mikroorganismen neben äußeren Faktoren auch vom Aufbau ihrer Zellwand ab.

Durch die Hitzeeinwirkung werden primär Schädigungen an der Zytoplasmamembran, dem Zytoplasma mit seinem Inhalt und an der Zellwand registriert. Wenn wichtige Bestandteile der Zytoplasmamembran zerstört werden, wird die Zelle abgetötet oder sie wird vermehrungsunfähig (SCHLIESSER 1981).

Einfache oder „nackte“ Viren bestehen lediglich aus einem Nukleokapsid (= Genom und Kapsid). Behüllte Viren bestehen aus einem Nukleokapsid, welches zusätzlich eine Außenhülle aus Proteinen, Kohlenhydraten und vornehmlich ätherlöslichen Phospholipiden besitzt.

Eine Schädigung der Virushüllen (Proteine des Kapsids) führt wie eine Schädigung der viralen Nukleinsäure (Genom) gleichermaßen zum Infektiositätsverlust. Als schädigende Einflüsse wären proteindenaturierende Stoffe und physikalische Einflüsse wie Temperatur, UV– oder ionisierende Strahlen zu nennen. Welcher Weg jedoch letztendlich zur Inaktivierung führt, ist entscheidend von der Virusstruktur abhängig (SCHLIESSER 1981).

Viren sind bei niedrigen Temperaturen relativ stabil, während sie teilweise jedoch sehr anfällig für Hitze sind. Schon bei einer Temperatur von 55-70 °C (feuchte Hitze) kommt es

innerhalb von wenigen Minuten zur Denaturierung der Virushüllen und somit zu einem Infektiositätsverlust.

Grundsätzlich sind unbehüllte Viren gegen Hitze widerstandsfähiger als behüllte (BÖHM 2002).

### **2.5.3 Faktoren, die die Hitze– Effekte beeinflussen**

Der eigentlich ablaufende Prozess bei der Hitzesterilisation ist die Denaturierung von Eiweißen der Mikroorganismenzellen. Sie beginnt schon bei einer Temperatur von 55-60 °C (AUER 2002).

Unter Denaturierung versteht man den Verlust der nativen Proteinstruktur (irreversible Denaturierung von Enzymen und Strukturproteinen). Hierbei winden sich die Polypeptidketten durch die Hitze auf, verlieren ihre natürliche Struktur und bilden zufällige Anordnungen (LEHNINGER 1977). Ist die native Proteinstruktur nicht mehr vorhanden, verlieren Proteine z.B. ihre Wasserbindungsfähigkeit und Enzyme ihre biokatalytischen Fähigkeiten (LUDWIG 1996). Charakteristischer Befund bei einer Denaturierung ist demnach der Verlust der jeweiligen biologischen Aktivität.

Denaturierung kann durch organische Säuren (hier: Milchsäure), Harnstoff, grenzflächenaktive Verbindungen, durch Zufuhr mechanischer (beispielsweise Ultraschallbehandlung), thermischer Energie oder durch Strahlung erfolgen (LUDWIG 1996).

Laut LEHNINGER (1977) denaturieren die meisten globulären Proteine bei einer Temperatur von 60-70 °C. Wird die Hitze mit Feuchtigkeit kombiniert, so läuft dieser Prozess schon früher ab (AUER 2002). Da die meisten Proteine ihre biologische Aktivität nur innerhalb sehr eng gesteckten Temperatur– und pH– Bereichen behalten, kommt es schneller zur Denaturierung, wenn sie Extremen in diesen Bereichen ausgesetzt werden (LEHNINGER 1977).

Der Effekt der Hitze kann mit unterschiedlichen Kombinationen verstärkt werden.

#### **pH-Wert:**

Der pH– Bereich um den Neutralpunkt (pH 6-8) gilt als Optimum in der Thermoresistenz (LAWRENCE und BLOCK 1968). Ober– und unterhalb dieses Bereiches steigt die

Temperaturempfindlichkeit an, d.h. die zur Abtötung nötige Verweildauer wird bei gleicher Temperatur kürzer (RUSSELL et al. 1982).

Laut CERNY (1980 I und II) zeigen Bakterien höchste Thermoresistenz bei pH 6-7, Hefen und Schimmelpilze bei pH 3-6. Diese Resistenzen werden mit steigender Temperatur stets geringer, während sich deutliche pH-Wert- Einflüsse im Bereich niedriger Erhitzungstemperaturen zeigen. Bei vegetativen Zellen kann ein geeigneter pH- Wert bis zu einer Temperatur bis ca. 65 °C die Abtötungszeiten konstant verkürzen. Dies gelingt bei Endosporen nicht. Hier bestehen noch bei 120-130 °C deutliche pH- Einflüsse. Laut MROZEK (1996) liegt dieses Phänomen an einer Beschleunigung der Eiweißdenaturierung, welche bei extremen pH-Werten bereits bei Raumtemperatur unmittelbar eintritt.

Auch nach GENIGEORGIS (1998) hat ein hoher bzw. niedriger pH- Wert einen bedeutenden Einfluss auf die Thermotoleranz der Mikroorganismen.

### **a<sub>w</sub>- Wert:**

Wichtig für die Resistenz ist der Einfluss des Wassergehaltes der Zellen bzw. der Wasseraktivität. So gerinnt wasserfreies Eieralbumin in 30 min bei 160-170 °C, Eieralbumin mit 25 % Wasser bei 74-80 °C und Eieralbumin mit 50 % Wasser bei 56 °C (PERKINS 1960). Vegetative Zellen haben einen Wassergehalt von 70-90 %. Laut GOULD (1977) liegen Sporen bei Werten um 10 % Wassergehalt. BLACK und GERHART (1962) beschrieben jedoch Werte von 65-80 % (durchschnittlicher Wassergehalt von Endosporen).

Als möglicher Erklärungsansatz für die wesentlich langsamere Wirkung trockener Hitze wird angeführt, dass die Widerstandsfähigkeit von Zellproteinen gegen eine Hitzekoagulation durch die gleichzeitig einsetzende Dehydratation heraufsetzt wird und dass Feuchtigkeit die Koagulation von Zellproteinen fördert, da Wasser chemische Reaktionen katalysiert (AUER 2002).

Wichtige Faktoren, die das Endergebnis beeinflussen, sind:

- Mikroorganismen und ihre Hitzeresistenz
- Ausgangskeimzahl der zu beeinflussenden Mikroflora
- Angelegte Temperatur

- Zeit der Einwirkung der Temperatur
- Umgebungsbedingungen wie gegebenenfalls pH der Lösung oder die umschließenden Schutzschichten
- „Qualität“ der Hitze (trocken/feucht)

Allgemein werden 3 Schmutzschichten unterschieden: 1. Strukturschmutz (ab 2 mm Dicke), 2. Schmutzdecke (bis 2 mm Dicke) und 3. adhäsiver Schmutz (Schmutzfilm). Der Strukturschmutz und die Schmutzdecke lassen sich relativ einfach durch die üblichen Reinigungsverfahren ablösen. Selbst angetrockneter Strukturschmutz kann nach vorherigem Einweichen mit entsprechendem Aufwand noch entfernt werden. Bei Verschmutzungen durch Fett ist zur Ablösung eine Temperatur nötig, die über dem Schmelzpunkt des Fettes liegt (WALLHÄUSER 1988).

Bei angetrockneten oder eingebrannten Verschmutzungen durch Eiweiß (Fleischsaft, Blut) kann nach Entfernung des Strukturschmutzes und der Schmutzdecke eine adhäsive Schicht zurückbleiben, die besonders intensiv mit der Unterlage verbunden ist und sich mit den üblichen Reinigungsmethoden nicht mehr entfernen lässt. Dieser Schmutzfilm ist optisch z.B. als schillernde Schicht auf V<sub>2</sub>A- Stahl zu erkennen.

Nach MOTZ et al. (1974) erfordert die Entfernung der adhäsiven Schmutzschicht eine Wassertemperatur von 80-85 °C und einen Aufpralldruck von 20-25 kp/cm<sup>2</sup>.

### 2.5.4 Der D– Wert

Beim Absterben einer Mikroorganismenpopulation durch Hitze einwirkung handelt es sich um einen Zeit– und Temperatur– abhängigen Prozess. In diesem Zusammenhang spricht man nicht von einem Abtötungspunkt, sondern von einer Abtötungskurve.

Diese Kurve folgt den Gesetzmäßigkeiten einer Reaktion erster Ordnung, d.h. in einer logarithmischen Absterbeordnung stirbt in der gleichen Zeiteinheit der gleiche Prozentsatz an Mikroorganismen.

Dies induziert den Schluss, dass es nie möglich ist, eine absolute Keimfreiheit zu erreichen, da die Kurve eine asymptotische Tendenz zum Nullpunkt hat. Außerdem sind „zur Erzielung des gleichen Abtötungseffektes mit zunehmender Temperatur kürzere Erhitzungszeiten erforderlich“ (MÜLLER und MÜLLER 1996). Zwischen Temperatur und Zeit besteht

bezüglich der Hitzeabtötung eine logarithmische Beziehung, d.h. je höher die zur Hitzeabtötung verwendete Temperatur ist, umso geringer ist die Zeit, die zur Abtötung aufgebracht werden muss.

„Der D- Wert ist die Zeitspanne, die bei einer gegebenen Temperatur zur Reduktion einer Mikroorganismenpopulation auf 10 % erforderlich ist (gleich Senkung der Lebendkeimzahl um 90 %)“ (MÜLLER und MÜLLER 1996). Er wird gewöhnlich in Minuten gemessen, wobei gleichzeitig die Erhitzungstemperatur angegeben wird.

Laut DOHERTY et al. (1998) versteht man unter dem D- Wert die Zeit in Minuten, die ein Mikroorganismus bei einer bestimmten Temperatur gehalten werden muss, um eine 90 %ige Reduktion der Ausgangskeimzahl zu erlangen.

FEHLHABER und BECKER (2000) geben als Definition des D- Wertes an: “(...) Diese dezimale Reduktionszeit ist die erforderliche Zeit in Minuten für die Reduzierung der Ausgangskeimzahl einer bestimmten Population von Mikroorganismen um 90 %“.

Der D- Wert (= Dezimalreduktionszeit) für einen bestimmten Organismus in einem bestimmten physiologischen Zustand kann experimentell ermittelt werden. Wenn die Anzahl der überlebenden Organismen bei einer konstanten Temperatur gegen die Behandlungszeit aufgetragen wird, ergibt sich eine exponentielle Abtötungskurve. Der D- Wert wird durch die Neigung der Absterbekurve eines Mikroorganismus bei konstanter Temperatur charakterisiert (MÜLLER und MÜLLER 1996).

D- Werte werden von weiteren Umgebungsparametern wie pH, Schmutz, Luftanteil in der Probe stark beeinflusst. Laut SANCHEZ et al. (1995) verringern pH-Wert- Extreme den D- Wert.

Durch die Ermittlung der D- Werte unter gleichen Bedingungen gelingt es, Keime anhand ihrer Hitzeresistenz miteinander zu vergleichen (MÜLLER und MÜLLER 1996).

Eine besondere Bedeutung hat der z- Wert. “Der keimspezifische z- Wert gibt die Temperaturänderung in °C an, die erforderlich ist, um den D- Wert (...) um den Faktor 10 zu ändern.“ (BÖHM 2002).

### 2.5.5 Beispiele für Hitzeresistenzwerte

Mikroorganismen lassen sich in Abhängigkeit von ihren zur Vermehrung benötigten Temperaturoptima in 3 Gruppen zusammenfassen (**Tab. 2.2**):

Psychrophile Organismen, worunter Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, und *Lactobacillus*, Hefen der Gattung *Candida* sowie einige Hyphomyceten fallen, können sich auch noch bei Temperaturen von 0 °C und niedriger vermehren, wobei ihr Vermehrungsoptimum zwischen 15 °C und 20 °C liegt.

Die meisten Mikroorganismen werden in die Gruppe der Mesophilen eingeteilt. Ihre optimale Vermehrungstemperatur liegt zwischen 20 °C und 37 °C.

Die Mikroorganismen, welche sich in einem Temperaturbereich von 50 °C bis 65 °C optimal vermehren, werden in die Gruppe der Thermophilen eingeteilt. Zu ihnen gehören meist *Actinomyceten* und *Bacillen*. Nur wenige Pilze zählen zu dieser Gruppe (MÜLLER 1996 I).

**Tab. 2.2: Temperaturbereiche der Mikroorganismenvermehrung aus MÜLLER (1996 I)**

	TEMPERATURBEREICH IN °C		
	MINIMUM	OPTIMUM	MAXIMUM
<b>Psychrophile</b>	-10....0	15....20	20....30
<b>Mesophile</b>	10....25	20....37	35....50
<b>Thermophile</b>	30....50	50....65	60....95

Die Hitzeresistenz von Hyphen (von Pilzen) ist gering und vergleichbar mit der von vegetativen Bakterienzellen. Auch hier liegen die D- Werte für 65 °C in feuchter Hitze nur bei wenigen Sekunden bis maximal einer Minute. Hefen sind generell empfindlicher als Hyphomyceten. Sie werden teilweise schon bei Temperaturen über 40 °C geschädigt (MÜLLER und MÜLLER 1996). Zum Vergleich sind einige D- Werte in **Tab. 2.3** aufgeführt.

## Literatur

**Tab. 2.3: D– Werte im Vergleich (FRANK 1994; MROZEK 1996; MÜLLER und MÜLLER 1996; Fries 2002 II)**

KEIM	TEMPERATUR	ZEIT (D- Wert)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	50 °C	23,6 min
<i>Salmonella</i> Typhimurium	55 °C	1,1 min
<i>Salmonella</i> Typhimurium	60 °C	0,2 min (12 sek)
<i>Aspergillus niger</i> (Hyphen)	60 °C	15 min
<i>Vibrio cholerae</i>	65 °C	3 sek
andere Salmonellen– Typen	71 °C	1,2 sec
<i>Salmonella typhi</i>	75 °C	1 sek
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75 °C	5 sek
<i>Enterobacter aerogenes</i>	75 °C	3 sek
<i>Aspergillus fumigatus</i> (Konidien)	80 °C	>60 min
<i>Staphylococcus aureus</i>	80 °C	2 sek
<i>Trichosporon variabile</i> (Konidien)	100 °C	>15 min
<i>Bacillus anthracis</i> (Endosporen)	100 °C	15 min
<i>Clostridium tetani</i> (Endosporen)	105 °C	25 min
Thermophile Sporenbildner (Endosporen)	110 °C	300 min
<i>Clostridium botulinum</i> (Endosporen)	120 °C	20 min
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	121,1 °C	4 min
Mesophile Sporenbildner (Endosporen)	130 °C	1 min

**Tab. 2.4: Resistenzstufen von Mikroorganismen gegen feuchte Hitze nach KONRICH (1938), KONRICH und STUTZ (1963) und (MROZEK 1996)**

RESISTENZSTUFE	TESTKEIM	RESISTENZ GEGEN FEUCHTE HITZE	
I	Staphylococcus aureus	1 min	80 °C
II	Sporen von Bacillus anthracis	8- 12 min	100 °C
III	Mesophile native Erds sporen	10- 15 min	120 °C
IV	Thermophile native Erds sporen	5 min	140 °C