

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

und

dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene
sowie Tiermedizin mit Tierklinik
der Universität Hohenheim

**Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an einer
mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von
Speiseresten in Verbindung mit methodischen
Untersuchungen zum Nachweis von
Salmonellen und *Escherichia coli*
aus biologischem Material**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Milan Drča
aus Zadar-Kroatien
Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen
Prof. Dr. Reinhard Böhm

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Reinhard Böhm, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie
Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim
Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Gerd Schlenker, Institut für Tier- und Umwelthygiene des
Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 18. September 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Beschreibung der anaeroben Fermentation.....	3
2.2	Beschreibung der Fermentationssysteme.....	5
2.3	Anforderungen der Hygiene an den Betrieb von Biogasanlagen.....	8
2.4	Rechtliche Grundlagen.....	9
2.4.1	Bioabfallverordnung (BioAbfV).....	10
2.4.2	Düngemittelverordnung.....	13
2.4.3	Verordnung (EG) Nr. 1774/2002.....	13
2.4.4	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG).....	16
2.5	Beschreibung der seuchenhygienisch relevanten Mikroorganismen.....	17
2.5.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.5.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	18
2.5.3	Salmonellen.....	20
2.5.4	<i>Escherichia coli</i>	21
2.5.5	<i>Campylobacter jejuni</i>	23
2.5.6	Enterokokken.....	24
2.5.7	<i>Caliciviridae</i>	25
2.5.8	ECBO Virus.....	25
2.5.9	Bovines Parvovirus.....	26
2.6	Nachweis von Salmonellen.....	28
2.6.1	Konventionelle Methoden.....	28
2.7	Nachweis von <i>Escherichia coli</i>	29
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen.....	31
3.1.1	Beschreibung der Biogasanlage.....	31
3.1.1.1	Beschreibung der Vorgrube.....	31
3.1.1.2	Beschreibung der Hygienisierungsbehälter.....	32
3.1.1.3	Beschreibung der Beschickungsgrube.....	33
3.1.1.4	Beschreibung der mesophilen Reaktoren.....	33
3.1.1.5	Beschreibung der Nachfermenter.....	34
3.1.2	Versuchsdurchführung.....	34
3.1.2.1	Keimträgerversuche im Hygienisierungsbehälter.....	35
3.1.2.1.1	Einbringen und Entnahme der Keimträger.....	36
3.1.2.1.2	Darstellung der Ergebnisse.....	36

3.1.2.2	Keimträgerversuche im mesophilen Reaktor 2	36
3.1.2.2.1	Einbringen und Entnahme der Keimträger	37
3.1.2.2.2	Darstellung der Ergebnisse	38
3.1.2.3	Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“)	38
3.1.2.3.1	Probenentnahmen	39
3.1.2.3.2	Darstellung der Ergebnisse	39
3.1.3	Bakteriologische Methoden zu den Keimträger-Untersuchungen.....	40
3.1.3.1	Herstellung der Bakteriensuspensionen.....	40
3.1.3.2	Keimkonzentrationsbestimmung (Koch'sches-Oberflächen-Verfahren)	40
3.1.3.3	Herstellung und Beimpfung der Keimträger von Typ 1	41
3.1.3.4	Bestimmung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ („most probable number“, MPN)	42
3.1.3.5	Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	43
3.1.3.6	Nachweis von <i>Yersinia enterocolitica</i>	46
3.1.3.7	Nachweis von <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775.....	48
3.1.3.8	Nachweis von <i>Escherichia coli</i>	48
3.1.3.9	Nachweis von <i>Campylobacter jejuni</i>	48
3.1.3.10	Nachweis von <i>Enterococcus faecalis</i>	51
3.1.4	Bakteriologische Methoden zu den Untersuchungen des nativen Substrates („Input- und Outputkontrolle“)	53
3.1.4.1	Nachweis von <i>Enterococcus</i> spp. in 20 g Substrat	53
3.1.4.2	Nachweis von Gesamtcoliformen und Fäkalcoliformen in 20 g Substrat ...	53
3.1.4.3	Nachweis von Salmonellen	54
3.1.4.4	Bestimmung des pH-Wertes	54
3.1.5	Virologische Methoden zu den Keimträger-Untersuchungen	54
3.1.5.1	Verwendete Testviren.....	54
3.1.5.2	Vorgehensweise.....	54
3.1.5.2.1	Zellkultivierung	55
3.1.5.2.2	Herstellung der Keimträger von Typ 2	55
3.1.5.2.3	Elution der Keimträger vom Typ 2.....	56
3.1.5.2.4	Virustitration.....	57
3.1.5.2.5	Auswertung der Ergebnisse	58
3.2	Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und <i>Escherichia coli</i> aus biologischem Material.....	58
3.2.1	Untersuchungen auf Salmonellen.....	58
3.2.1.1	Beimpfung des Substrates	59
3.2.1.2	Darstellung der Ergebnisse	60

3.2.1.3	Methode 1: Methode der Flüssiganreicherung in Selenit-Cystin-Bouillon in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium zur semiquantitativen höchstwahrscheinlichsten Keimzahl von Salmonellen (MPN)	60
3.2.1.4	Methode 2: Methode der Flüssiganreicherung in Peptonwasser in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium zur semiquantitativen Bestimmung der höchstwahrscheinlichsten Keimzahl von Salmonellen (MPN).....	64
3.2.1.5	Methode 3: Membranfiltrationsmethode zur quantitativen Miterfassung vorgeschädigter Salmonellen	66
3.2.1.6	Methode 4: Methode der Flüssiganreicherung in Peptonwasser mit Novobiocin in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium zum qualitativen Nachweis des Vorkommens bzw. der Freiheit von Salmonellen in einer definierten Probenmenge	69
3.2.2	Untersuchungen auf <i>Escherichia coli</i>	70
3.2.2.1	Darstellung der Ergebnisse	70
3.2.2.2	Quantitativer Nachweis zur Ermittlung den „wahrscheinlichsten Keimzahl“ (MPN) von <i>Escherichia coli</i> aus biologischem Substrat (Makromethode)	71
3.2.2.3	Quantitativer Nachweis zur Ermittlung den „wahrscheinlichsten Keimzahl“ (MPN) von <i>Escherichia coli</i> aus biologischem Substrat (Mikromethode)	72
4	Ergebnisse	75
4.1	Bakteriologische Keimträger-Untersuchungen im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	75
4.1.1	Temperaturverlauf der Hygienisierung.....	75
4.1.2	Einwirkungsdauer der Temperatur während der Hygienisierung.....	76
4.1.3	Inaktivierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	77
4.1.4	Inaktivierung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	78
4.1.5	Inaktivierung von <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775	79
4.1.6	Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i>	80
4.1.7	Inaktivierung von <i>Campylobacter jejuni</i>	81
4.1.8	Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i>	82
4.1.9	Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Testbakterien	83
4.2	Virologische Keimträger-Untersuchungen im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	84
4.2.1	Temperaturverlauf der Hygienisierung.....	84
4.2.2	Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenentnahmen	85
4.2.3	Inaktivierung von Felinem Calicivirus (FCV).....	86

4.2.4	Inaktivierung von ECBO-Virus.....	87
4.2.5	Inaktivierung von Bovinem Parvovirus (BPV)	88
4.2.6	Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Testviren	89
4.3	Bakteriologische Keimträgeruntersuchungen im mesophilen Reaktor der Biogasanlage.....	90
4.3.1	Temperatur und pH-Werte im mesophilen Reaktor	90
4.3.2	Tauchröhre 1, Ebene oben	91
4.3.3	Tauchröhre 1, Ebene unten	92
4.3.4	Tauchröhre 2, Ebene oben	93
4.3.5	Tauchröhre 2, Ebene unten	94
4.3.6	Tauchröhre 3, Ebene oben	95
4.3.7	Tauchröhre 3, Ebene unten	96
4.4	Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“).....	97
4.4.1	Vorgrube	97
4.4.2	Beschickungsgrube	98
4.4.3	Reaktoren 1–4	98
4.4.4	Nachfermenter	102
4.5	Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und <i>Escherichia coli</i> aus biologischen Substraten.....	105
4.5.1	Salmonellenuntersuchungen	105
4.5.1.1	Erdproben	105
4.5.1.2	Gülleproben	107
4.5.1.3	Klärschlammproben.....	109
4.5.2	Statistische Auswertung der Ergebnisse	111
4.5.2.1	Erdproben	111
4.5.2.2	Gülleproben	112
4.5.2.3	Klärschlammproben.....	113
4.5.3	<i>Escherichia coli</i> -Untersuchungen.....	115
4.5.3.1	Bioabfallproben	115
4.5.3.2	Klärschlammproben.....	116
4.5.3.3	Gülleproben	116
4.5.3.4	Speiseabfallproben.....	116
5	Diskussion	118
5.1	Anmerkung zu den Keimträgerversuchen	118
5.2	Bewertung der Inaktivierung von Testbakterien im Hygienisierungsbehälter	119
5.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	119

5.2.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	120
5.2.3	<i>Salmonella Senftenberg</i> W 775.....	121
5.2.4	<i>Escherichia coli</i>	122
5.2.5	<i>Campylobacter jejuni</i>	122
5.2.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	123
5.3	Bewertung der Inaktivierung von ausgewählten Testviren im Hygienisierungsbehälter	124
5.3.1	Felines Calicivirus (FCV).....	124
5.3.2	ECBO-Virus.....	125
5.3.3	Bovines Parvovirus (BPV).....	126
5.4	Bewertung der Inaktivierung von ausgewählten Testbakterien im mesophilen Reaktor	127
5.5	Bewertung der bakteriologischen Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“).....	129
5.6	Diskussion der verwendeten Methoden zum kulturellen Nachweis von Salmonellen.....	132
5.6.1	Bewertung des Voranreicherungsverfahrens	133
5.6.2	Bewertung des Anreicherungsverfahrens	137
5.6.3	Bewertung der verwendeten selektiven Nährböden	141
5.6.4	Bewertung von <i>Salmonella Senftenberg</i> als relevantes Testbakterium für die Validierung der vier Nachweismethoden.....	144
5.6.5	Bewertung der angewandten Nachweisverfahren hinsichtlich der ermittelten Ergebnisse.....	146
5.7	Diskussion der zwei angewandten Methoden zum Nachweis von <i>Escherichia coli</i> aus biologischem Material	148
6	Zusammenfassung.....	153
7	Summary	155
8	Literaturverzeichnis	157
9	Anhang.....	185

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Biogasanlage	31
Abb. 2:	Schematische Darstellung des Hygienisierungssystems der Biogasanlage.....	33
Abb. 3:	Schematische Darstellung von Reaktor 2 (ADOLPH 2004)	37
Abb. 4:	Grafische Darstellung des Probenahmegerätes (ADOLPH 2004)	39
Abb. 5 :	Grafische Darstellung eines Keimträgers Typ 1.....	42
Abb. 6:	Temperaturverlauf während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter	75
Abb. 7:	Grafische Darstellung der Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenahmen im Hygienisierungsbehälter	76
Abb. 8:	Inaktivierung von <i>Listeria monocytogenes</i> während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	77
Abb. 9:	Inaktivierung von <i>Yersinia enterocolitica</i> während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	78
Abb. 10:	Inaktivierung von <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775 während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage.....	79
Abb. 11:	Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	80
Abb. 12:	Inaktivierung von <i>Campylobacter jejuni</i> während des Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	81
Abb. 13:	Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsreaktor der Biogasanlage.....	82
Abb. 14:	Inaktivierung von verwendeten Testbakterien während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage.....	83
Abb. 15:	Temperaturverlauf während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungs-behälter der Biogasanlage	84
Abb. 16:	Grafische Darstellung der Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenahmen im Hygienisierungsbehälter	85
Abb. 17:	Inaktivierung von Felinem Calicivirus während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	86
Abb. 18:	Inaktivierung von ECBO-Virus während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	87
Abb. 19:	Inaktivierung von Bovinem Parvovirus während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	88
Abb. 20:	Inaktivierung von verwendeten Testviren während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage	89

Abb. 21:	Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 1, Ebene oben.....	91
Abb. 22:	Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 1, Ebene unten.....	92
Abb. 23:	Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 2, Ebene oben.....	93
Abb. 24:	Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 2, Ebene unten.....	94
Abb. 25:	Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 3, Ebene oben.....	95
Abb. 26:	Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 3, Ebene unten.....	96
Abb. 27:	Durchschnittliche Konzentrationen der untersuchten Bakterien in den Speiseabfällen aus der Vorgrube	97
Abb. 28:	Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 1.....	100
Abb. 29:	Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 2.....	100
Abb. 30:	Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 3.....	101
Abb. 31:	Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 4.....	101
Abb. 32:	Durchschnittliche Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus den vier Reaktoren.....	102
Abb. 33:	Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus dem Nachfermenter.....	103
Abb. 34:	Durchschnittliche Konzentrationen der untersuchten Bakterien des Substrates aus dem Nachfermenter.....	104
Abb. 35:	Nachweis von <i>Escherichia coli</i> aus verschiedenen Substraten mit zwei unterschiedlichen MUG-fluoreszenzoptischen Methoden	152

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Biochemische Charakteristika der Gattung <i>Listeria</i> (SEELIGER u. JONES 1986).....	45
Tab. 2:	Biochemische Reaktionen von <i>Listeria monocytogenes</i> (LOVETT 1988).....	45
Tab. 3:	Qualitätskontrolle des Nährbodens.....	51
Tab. 5:	Qualitätskontrolle des Nährbodens mit Spiralplattenmethode	52
Tab. 6:	Übersicht über Temperatur und pH-Mittelwerte der 3 durchgeführten Versuche.....	90
Tab. 7:	Konzentrationen der untersuchten Bakterien in den Speiseabfällen aus der Vorgrube (Angaben in KBE/ml).....	97
Tab. 8:	Konzentrationen der untersuchten Bakterien der hygienisierten Speiseabfälle aus der Beschickungsgrube (Angaben in KBE/ml).....	98
Tab. 9:	Gehalte an Gesamt- und Fäkalcoliformen sowie Enterokokken im Substrat aus den vier mesophilen Reaktoren der Biogasanlage (Angaben in KBE/ml).....	99
Tab. 10:	Keimkonzentrationen der untersuchten Bakterien aus dem Substrat des Nachfermenters (Angaben in KBE/ml).....	102
Tab. 11:	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zum Nachweis von <i>Salmonella Senftenberg</i> in Erdproben	105
Tab. 12:	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zum Nachweis von <i>Salmonella Senftenberg</i> in Gülleproben	107
Tab. 13:	Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zum Nachweis von <i>Salmonella Senftenberg</i> in Klärschlammproben	109
Tab. 14:	Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Erdproben	111
Tab. 15:	Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Gülleproben	112
Tab. 16:	Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Klärschlammproben.....	113
Tab. 17:	Zusammenfassende Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zum Nachweis von <i>Escherichia coli</i> aus vier verschiedenen Substraten mit zwei unterschiedlichen MPN-Methoden	115

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
bzw.	=	beziehungsweise
BioAbfV	=	Bioabfallverordnung
BPLS-Agar	=	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
BPV	=	bovines Parvovirus
BSE	=	Bovine Spongiforme Encephalopathie
ca.	=	cirka
CEN	=	European Committee for Standardization
CIN-Agar	=	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar
DMEM	=	dulbeccos modifiziertes eagle's medium
DüMV	=	Düngemittelverordnung
d	=	Tag(e)
d.h.	=	das heißt
ECBO	=	bovines Enterovirus (enteritic cytopathogenic bovine orphan)
EEG	=	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FCF	=	Fäkalcoliforme
FCV	=	felines Calicivirus
FKS	=	fötales Kälberserum
GCF	=	Gesamtcoliforme
g	=	Gramm
H ₂ O	=	Wasser
h	=	Stunde(n)
ISO	=	International Organization for Standardization
KBE	=	koloniebildende Einheiten
KID ₅₀	=	zellkulturinfektiöse Dosis
l	=	Liter
MKS	=	Maul- und Klauenseuche
MPN	=	most-probable-number
ml	=	Milliliter
m	=	Meter
min	=	Minute(n)
o.g.	=	oben genannt(e)
PBS	=	phosphate-buffered-saline
pH	=	Wasserstoffionenkonzentration
Pkt.	=	Punkt
RVS-Bouillon	=	RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon

s	=	Sekunde(n)
sog.	=	sogenannt(e)
spp.	=	Subspezies
TS	=	Trockensubstanzgehalt
Tab.	=	Tabelle
u.	=	und
u.a.	=	unter anderem
UV	=	Ultraviolett
UVM	=	University of Vermont broth
vgl.	=	vergleiche
XLD-Agar	=	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
zit.	=	zitiert

1 Einleitung

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit zwei miteinander verbundenen Fragestellungen. Dies ist zum einen die Validierung einer neu konzipierten Praxisanlage zur Vergärung biogener Rest- und Abfallstoffe unter dem Aspekt der seuchenhygienischen Sicherheit und zum zweiten mit der Erarbeitung verschiedener Nachweisverfahren für Salmonellen und *Escherichia coli* in entsprechenden Substraten vor dem Hintergrund von derzeit laufenden Normungsarbeiten auf europäischer Ebene.

Die seuchenhygienische Unbedenklichkeit von organischen Düngemitteln aus behandelten biogenen Rest- und Abfallstoffen wird durch nationale und europäische Vorgaben gefordert, denn biologische Abfälle können eine Vielzahl an Mikroorganismen und Vertretern von pathogenen Bakterien und Viren enthalten. Werden biologische Abfälle unbehandelt einer Verwertung zugeführt, besteht die Gefahr der Verbreitung der Erreger in der Umwelt und damit eine Kontamination der Umwelthabitate Boden, Luft und Wasser (BÖHM 1995; STRAUCH 1997). Um dieser Gefahr vorzubeugen, wurde Ende der 90-er Jahre in der Bundesrepublik Deutschland die Bioabfallverordnung (BioAbfV 1998) verabschiedet, die in Anhang 2 detailliert Behandlungsmaßnahmen vorschreibt, um ein seuchen- und phytohygienisch unbedenkliches Produkt (Kompost oder Gärrest) zu erhalten. In der sog. „direkten Prozessprüfung“ werden Salmonellen (*Salmonella Senftenberg* W 775 H₂S negativ) mit einer speziellen Keimträgertechnik in ausreichend hoher Konzentration in die zu überprüfenden Anaerob- und Kompostanlagen eingebracht. Der Behandlungsprozess muss die artifiziell in die Anlagen eingebrachten Salmonellen eliminieren bzw. inaktivieren. Damit kann gegebenenfalls einer Anaerob- oder Kompostanlage die ausreichende „hygienisierende Wirksamkeit“ bestätigt werden.

Zum Verhalten von Salmonellen in Anaerobanlagen wurden in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Untersuchungen an unterschiedlichen Biogasanlagen bei der Verwertung der verschiedensten biologischen Substrate durchgeführt (GADRE et al. 1986; HOFERER 2001; STAFFA 2003; BAGGE et al. 2005; SMITH et al. 2005; SALSALI et al. 2006; SAHLSTRÖM 2006). Über das Verhalten weiterer wichtiger seuchen- und umweltrelevanter Bakterien und Viren, speziell deren Verhalten während der Hygienisierung bzw. bei der Monovergärung von Speiseabfällen im mesophilen Rohrfermenter, gab es bisher nur wenige Untersuchungen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Tenazität von *Salmonella Senftenberg* W 775, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter jejuni* durchgeführt. Zusätzlich wurde die Überlebensfähigkeit von ausgewählten Viren mit bekanntermaßen hoher Tenazität, wie Bovines Parvovirus, ECBO-Virus (BENDIXEN 1994; LUND et al. 1996) und Felines Calicivirus, untersucht.

Bei der Verbreitung von Mikroorganismen mit biologischen Abfällen wird u.a. Salmonellen und *Escherichia coli* eine große Bedeutung beigemessen (BÖHM 1993a). Um einen Überblick über deren Verhalten und Bedeutung zu erhalten, sind geeignete und sensitive Nachweismethoden für die genannten Bakterien aus Umweltproben notwendig. Probleme des kulturellen Nachweises von Salmonellen oder von *Escherichia coli* liegen einerseits im Vorhandensein einer gut an die Verhältnisse adaptierten Begleitflora und in einem reduzierten Wachstum durch eine subletale Schädigung der Salmonellen und *Escherichia coli* durch den Behandlungsprozess (BUSTA 1978; WALTMAN 2000). Aufgrund dieser Voraussetzungen müssen die qualitativen und quantitativen Nachweismethoden optimiert werden.

Mit dem Ziel geeignete Nachweismethoden zu erarbeiten, wurden von der Arbeitsgruppe CT/308 (Technical Committees) bei CEN (Europäisches Komitee für Normung) fünf Entwürfe zum Nachweis von Salmonellen und *Escherichia coli* optimiert bzw. validiert.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, die entsprechende Nachweismethoden für Salmonellen bzw. für *Escherichia coli* (CEN, ANON. 2002a; ANON. 2002b) mit den Substraten Klärschlamm-, Gülle-, Erd-, Bioabfall- und Speiseabfall zu erproben, um deren Eignung für die Praxis beurteilen zu können.

2 Literatur

2.1 Beschreibung der anaeroben Fermentation

Organische Substanzen werden mikrobiell entweder mit Luft (aerob) oder ohne Luft (anaerob) abgebaut. Während Aerobier cirka 50 % der abgebauten organischen Trockensubstanz in Kohlendioxid und Wasser umwandeln, die anderen 50 % jedoch zum Aufbau von Zellsubstanz nutzen, werden hierfür im anaeroben Prozess nur etwa 4 % verwendet. Aus dem Rest entsteht Biogas als ein vorwiegend aus Methan (ca. 50 Vol.-%) und Kohlendioxid (40 Vol.-%) bestehendes Gemisch (BEHMEL u. GLEIXNER 1995; KONSTANDT et al. 1982; KONSTANDT et al. 1983).

Die anaerobe Fermentation biologisch abbaubarer Stoffe, die als Biogaserzeugung bezeichnet wird, ist ein biologisch hochkomplexer Vorgang. Wissenschaftlich systematisch wurde er vermutlich erstmals 1776 von dem italienischen Naturforscher Alessandro Volta (1745-1827) beschrieben (WELLINGER et al. 1991).

Der anaerobe Abbauprozess mit der Bildung von Biogas ist in folgenden Stufen zu unterteilen (WELLINGER et al. 1991; SCHERER 1995; STRAUCH 1997; ANON. 2003a; SCHATTAUER u. WEILAND 2004):

Die erste Stufe des Prozesses wird als **Hydrolyse** bezeichnet. Die komplexen biologischen Grundbausteine (Polymere) Eiweiße, Fette und Kohlenhydrate werden während dieser Phase durch sogenannte Exoenzyme gespalten (Hydrolysephase). Bei den hierbei entstehenden Produkten handelt es sich um einfache Zweier- und Einerverbindungen (Dimere und Monomere).

Diese gebildeten Produkte werden nun von den säurebildenden Bakterien aufgenommen und in der Fermentation weiter abgebaut (**Versäuerungsphase**). Als Produkte dieses Abbaus entstehen Essig-, Propion- und Buttersäure sowie in kleineren Anteilen Milchsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid.

Anschließend werden diese Produkte in der **acetogenen Phase (Essigsäurebildung)** von obligat Protonen reduzierenden Bakterien zu Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid abgebaut.

In der anschließenden, letzten Phase (**methanogene Phase**) produzieren die beteiligten Methanbakterien hauptsächlich aus H_2 und CO_2 (kleinerer Teil) bzw. aus Essigsäure (größerer Teil) Methan.

Die Methanbakterien gehören zu den Archebakterien und damit zu den ältesten Lebewesen überhaupt. Methanbakterien als Produzenten von Biogas gibt es seit etwa 3,5 Milliarden Jahren auf der Erde (WIDMANN 2000). Sie umfassen Lang- und Kurzstäbchen, Spirillen,

Kokken und Sarcinen, bewegliche und unbewegliche, grampositive sowie gramnegative Arten (BRAUN 1982).

Die Familie *Methanobacteriaceae* umfasst drei Gattungen (*Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanococcus*) von insgesamt neun Spezies (BRYANT 1974), während BALCH et al. (1979) aufgrund der RNA-Basensequenz bei den Methanbakterien zwischen drei Ordnungen, vier Familien, sieben Gattungen und 17 Spezies unterscheidet.

Die anaerobe Behandlung von Bioabfällen wird neben der Kompostierung zunehmend wichtiger, da Vergärungsverfahren aufgrund der geschlossenen Prozessführung, der Energiegewinnung aus Abfällen als auch der starken Massereduzierung und der vergleichsweise kurzen Behandlungszeiten vielfältige Vorteile aufweisen. Welches große wirtschaftliche Potential in der Vergärung landwirtschaftlicher Abfallstoffe steckt, wurde bereits in den letzten Jahren durch hohe Steigerungsraten deutlich (BERGS 1999; SCHMIDT-HORNIG 1999; WELLINGER et al. 1991).

Neben tierischen Exkrementen aus der Landwirtschaft werden dabei vor allem Rest- und Abfallstoffe von Kommunen und aus der Industrie eingesetzt. Zusätzlich fanden seit Einführung des EEG (Erneuerbare-Energien-Gesetz) im Jahr 2000 immer häufiger speziell für die Energieerzeugung angebaute nachwachsende Rohstoffe Verwendung.

Ein ganz entscheidender Vorteil der anaeroben Vergärung liegt in der Produktion von Biogas, als hochwertigem Energieträger, der nach entsprechender Aufbereitung zu Wärme- und Stromerzeugung und als Treibstoff genutzt werden kann. Bei entsprechender Prozessgestaltung (Vorerhitzung 70 °C/1 h oder thermophiler Betriebsweise 55 °C/20-24 h) kann ein seuchenhygienisch unbedenkliches Endprodukt erzeugt werden (PHILIPP 2002a, PHILIPP 2002b).

2.2 Beschreibung der Fermentationssysteme

Die zur Zeit angewandten Fermentationssysteme unterscheiden sich nach WEILAND (1999) u. SCHOLWIN et al. (2004) in folgende Verfahrensvarianten:

Kriterium	Unterscheidungsmerkmale
Anzahl der Prozessstufen	- einstufig - zweistufig - mehrstufig
Prozesstemperatur	- psychrophil - mesophil - thermophil
Art der Beschickung	- diskontinuierlich - semikontinuierlich - kontinuierlich
Trockensubstanzgehalt der Substrate	- Nassvergärung - Trockenvergärung
Inputmaterialien	- Monofermentation - Kofermentation

Bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen kommen meist ein- oder zweistufige Verfahren zur Anwendung, wobei der Schwerpunkt bei den einstufigen Anlagen liegt.

Unter natürlichen Bedingungen haben Methanbakterien ein sehr weites Temperaturspektrum von nahe dem Gefrierpunkt bis hin zu etwa 100 °C und betreiben damit ihren Stoffwechsel (Mc GHEE 1968; ZILLIG et al. 1981). Die Prozesstemperatur beeinflusst die Geschwindigkeit des anaeroben Abbaus. Je höher die Temperatur, desto schneller ist die Biogasproduktion (ANON. 2003a). In der Praxis werden Biogasanlagen allerdings bei lediglich drei Temperaturbereichen betrieben.

- psychrophil (cryophil): 10 - 25 °C (psychrophile Bakterien)
- mesophil: 25 - 40 °C (mesophile Bakterien)
- thermophil: 40 - 60 °C (thermophile Bakterien)

Wenn man voraussetzt, dass Methanbakterien unter anaeroben Umweltbedingungen ubiquitär vorkommen und innerhalb eines breiten Temperaturspektrums überlebensfähig sind, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass ein wechselseitiger Übergang von verschiedenen Temperaturbereichen in den Anaerobfermentern ohne Probleme möglich ist, solange die Temperaturumstellung langsam geschieht und die Belastung des Prozesses

(Menge zugeführter organischer Substanz je Kubikmeter Faulraumvolumen und Zeiteinheit) gering ist. Dabei kann es einige Monate dauern, bis sich die Bakterienstämme an andere Temperaturbereiche angepasst haben (WELLINGER et al. 1985). Sobald die Anpassungszeit beendet ist, kann das System wieder stärker belastet werden.

Im psychrophilen Temperaturbereich entfällt das Aufheizen der Substrate bzw. des Fermenters, jedoch sind Abbauleistung und Gasproduktion stark vermindert (SCHATTAUER u. WEILAND 2004).

Der Großteil der heutigen Praxisanlagen wird im mesophilen Temperaturbereich betrieben, wobei das Temperaturoptimum hier bei etwa 35 °C bis 37 °C mit den stabilsten Betriebsbedingungen zu liegen scheint (OECHSNER 1995). Je nach Substrat (z. B. Speiseabfälle oder Kategorie-3-Material) müssen die Biogasanlagen mit einer Pasteurisierung versehen werden (ANON. 2006a).

Im thermophilen Betrieb kann aufgrund einer Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit bei etwa 10 °C Temperaturanstieg bei biologischen Stoffwechselfvorgängen von einem schnelleren Abbau der zugeführten organischen Substanz ausgegangen werden (HORNIX et al. 2001). Jedoch ist zu bedenken, dass auch mehr Energie für das Aufheizen des Gärprozesses benötigt wird. Auch ist der Gärprozess in diesem Temperaturbereich empfindlicher gegenüber Störungen oder Unregelmäßigkeiten in der Substratzufuhr oder der Betriebsweise des Fermenters (SCHATTAUER u. WEILAND 2004). Ein weiterer Nachteil dieser Betriebsweise besteht in der Tatsache, dass eine mögliche Ammoniakhemmung eine stabile Prozessführung gefährdet, dem durch eine sorgfältigere Überwachung der Anlagensteuerung und des Prozessverlaufes begegnet werden muss (WELLINGER 1991).

Der Vorteil der thermophilen Betriebsweise, vor allem bei der Kofermentation mit hoch energiereichen Substraten wie z. B. Speiseresten, liegt in dem besseren Hygienisierungseffekt, der sich in der Eliminierung von Pathogenen zeigt (BÖHM 1998; HOFERER 2001).

Die Beschickung der Biogasanlage bestimmt in hohem Maße die Verfügbarkeit von frischem Substrat für die Mikroorganismen und wirkt sich damit auf die Biogasfreisetzung aus. Es wird grundsätzlich zwischen diskontinuierlicher, semikontinuierlicher und kontinuierlicher Beschickung unterschieden.

Bei der diskontinuierlichen Beschickung ist zwischen Batchverfahren und Wechselbehälterverfahren zu unterscheiden.

Beim Batch-Verfahren wird der Faulraum mit dem abzubauenen Substrat und einer bestimmten Menge Impfschlamm beschickt und verschlossen. Der Gasbildungsprozess läuft dann bis zu einem ökonomisch bestimmten Ende ab. Hierbei nimmt der Gasanfall zu Beginn deutlich zu und sinkt zum Ende ab (DÜRR 1983).

Wechselbehälterverfahren arbeiten mit zwei Gärbehältern. Der erste Behälter wird befüllt, während das Substrat im zweiten vollgefüllten Behälter ausfault.

Bei der semikontinuierlichen und der kontinuierlichen Beschickung kann zwischen Durchflussverfahren, Speicherverfahren und dem kombinierten Speicher–Durchflussverfahren unterschieden werden. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Beschickung wird bei der semikontinuierlichen Beschickung mindestens einmal arbeitstäglich eine unvergorene Substratcharge in den Fermenter einbracht (SCHOLWIN et al. 2004). Beim kontinuierlichen Verfahren wird dem Reaktor fortwährend Substrat zugeführt und ein entsprechendes Volumen an Faulschlamm abgezogen (DÜRR 1983).

Abhängig vom Wassergehalt im Fermentationsreaktor, ist zwischen Trocken- und Nassvergärungssystemen zu unterscheiden (MITTERLEITNER 2000). Als Trockenfermentationsanlagen werden Anlagen bezeichnet, deren Trockensubstanzgehalt in dem zu vergärenden Substrat über 25 % liegt. Bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen kommt fast ausschließlich die Nassvergärung zur Anwendung (ANON. 2003a; SCHOLWIN et al. 2004). Hierbei ist das Substrat sowohl vor als auch nach der Vergärung flüssig und wegen seiner hohen Pump- und Mischfähigkeit leicht handhabbar.

Je nach Anlagentechnik werden unterschiedliche Inputmaterialien für die Vergärungsanlagen eingesetzt. Dabei unterscheidet man zwischen Prozessen mit Monovergärung und solchen mit Kovergärung. Bei Monovergärungsverfahren werden Abfallstoffe der verschiedensten Bereiche einzeln oder in Mischung verwendet, während bei den Kofermentationsverfahren die Ausgangssubstanz stets gemeinsam mit einem Grundsubstrat (Flüssigmist oder vorbehandelter Festmist) vergoren wird. Die Kovergärung gehört daher zur Gruppe der Nassvergärungsverfahren, wobei seine Besonderheit darin besteht, dass eine Aufbereitung der Gärrückstände meist entfällt (WELLINGER et al. 1991; KERN 1999; WEILAND 1999).

Biogasanlagen sind allgemein verbreitet, doch unterscheiden sie sich hinsichtlich der Größe der Fermentervolumina und damit der täglich produzierten Gasmenge erheblich. Während in Entwicklungsländern überwiegend unbeheizte Kleinstanlagen auf landwirtschaftlichen Betrieben mit nur wenigen Kubikmetern Fermentervolumen dominieren und das Gas vorwiegend zum Heizen und Kochen verwendet wird (WERNER et al. 1983), gibt es in Industrieländern immer mehr Gemeinschaftsanlagen und Betreibergesellschaften. Die derzeit größte in Betrieb befindliche landwirtschaftliche Biogasanlage in der Bundesrepublik Deutschland, die von 75 Landwirten als ein 5 Mio. Euro teures Gemeinschaftsprojekt errichtet wurde (Bio Wend GmbH bei Lüchow), besitzt ein Fermentervolumen von 9.800 m³ mit 170.000 t Verarbeitungskapazität (FARMATIC 2001; zit. bei ADOLPH 2004).

2.3 Anforderungen der Hygiene an den Betrieb von Biogasanlagen

Derzeit werden große Mengen an Bioabfall wiederverwendet, deren Herkunft häufig unbekannt ist. Sie können daher pathogene Bakterien, Viren und Parasiten enthalten, die besonders in Festmist, Nebenprodukten oder tierischen Abfällen überleben (BENEDIXEN 1997). Aus diesem Grund muss stete Sorgfalt bei jedem Umgang mit diesen potentiellen Krankheitserregern geübt werden, etwa beim Transport und dem Umgang mit unbehandelter Gülle und Abfällen. Es sollten deshalb Maßnahmen ergriffen werden, die die Verbreitung der Krankheitserreger entlang dieser neuen Verteilungswege im Sektor Nutztiere und Nahrungsmittel unterbrechen (BENEDIXEN 1997; STRAUCH 1997).

Vor allem die bei der professionellen und ökologischen Verwertung von Lebensmittelresten ständig ansteigenden Mengen aus gewerblichen Küchen, der Lebensmittelindustrie und teilweise schon aus privaten Haushalten, stellen zunehmende Anforderungen an die Sicherheits- und Hygienekriterien der Entsorgungs- bzw. Verwertungslogistik. So stellen etwa die sich ständig wiederholenden Ausbrüche von Seuchen wie der Europäischen Schweinepest ein Indiz für einen allzu sorglosen Umgang mit den Hygienevorschriften dar (LÖBBERT 1996).

1992/93 wurden zum Beispiel Teile der Wildschweinpopulation von Niedersachsen und Mecklenburg-Vorpommern von einem aus dem Ausland eingeschleppten Virus infiziert, vermutlich durch illegale Verfütterung von Küchenabfällen.

Ein nicht unerheblicher Teil der Seuchenausbrüche ist durch die illegale Verfütterung von Speiseabfällen an Schweine entstanden, weil die Vorschriften über die Erhitzung der Abfälle (90 °C mindestens 1 h) vor der Verfütterung von Tierbesitzern nicht eingehalten wurden (STRAUCH 1997).

Vermutlich war der Einsatz unsachgemäß erhitzter, behandlungspflichtiger Lebensmittelabfälle bis heute mit einer der Gründe für den Ausbruch und die Verbreitung der Europäischen Schweinepest in Deutschland und in Europa (PHILIPP 2002b).

Am Institut für Epidemiologie der Bundesforschungsanstalt für Virus-Krankheiten der Tiere wurden die Ursachen der 1993 bis 1995 aufgetretenen Schweinepestausbürche in Hausschweinebeständen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 24 % aller Primärausbürche auf infizierte Küchenabfälle zurückzuföhren sind. Meistens handelte es sich dabei um vereinzelt Ausbrüche nach zu geringer oder nicht stattgefundenen Erhitzung der Küchenabfälle. Zu größeren Seuchenausbreitungen kam es seltener, so z. B. 1997 in Nordrhein-Westfalen. Als Folge wurden die Hygienevorschriften verschärft und die Speiserestaufbereitungsanlagen mit hohen Kosten nachgerüstet (KAUTZSCH 2000). Die Schweinepest ist vor allem wegen der hohen Überlebensfähigkeit ihres Erregers in

Küchenabfällen gefürchtet. In der Literatur finden sich dafür folgende Überlebenszeiten im Fleisch bzw. Fleischerzeugnissen (BÖHM 1999):

ESP-Virus (Europäische Schweinepest)	
Organe bei 4 °C	3-6 Monate
Kühlfleisch	35 Tage
Gefrierfleisch	150 Tage
ASP-Virus (Afrikanische Schweinepest)	
Schinken	ca. 6 Monate
Knochenmark	ca. 7 Monate
Blut	ca. 4 Monate
MKS-Virus (Maul- und Klauenseuche)	
Gefrierfleisch	ca. 240 Tage
Fleischerzeugnisse	ca. 4 Monate
<i>Herpesvirus suis</i>	
Fleisch	3-4 Monate

In einer Auswertung von 4127 *Salmonella*-Erstisolierungen (1978-1980) wurden für 87 % der Fälle Lebensmittel als Infektionsquelle festgestellt (PÖHN 1982). Hingegen wurden nur 12,8 % der Fälle durch die Kontaktinfektionen von Mensch zu Mensch hervorgerufen. Nach ROLLE u. MAYR (1984) werden die Lebensmittel entweder primär schon bei ihrer Entstehung mit Salmonellen kontaminiert oder sekundär im Verlauf der Gewinnung, der Be- und Verarbeitung und des Vertriebes. Diese Daten demonstrieren, wie hoch die Gefahr der Verbreitung der Salmonellen gerade durch Lebensmittel und deren Abfälle ist.

2.4 Rechtliche Grundlagen

Im Bereich der Reststoffverwertung verfolgt die Umweltpolitik von Bund und Ländern zwei Ziele: Auf der einen Seite die weitgehende und umweltgerechte Verwertung von Bioabfällen, auf der anderen Seite den Auf- und Ausbau der Bioenergie als Element einer verantwortungsvollen Energiepolitik mit der Maßgabe einer sachgerechten Einbettung der Bioenergie in den umwelt-, naturschutz- und verwaltungsrechtlichen Rahmen (HÖCHST 2002). Im landwirtschaftlichen Bereich sind bei der Errichtung von Biogasanlagen in Anlehnung der möglichen Umweltauswirkungen eine Vielzahl gesetzlicher Anforderungen sowie Sicherheitsanforderungen und die in den erforderlichen Genehmigungsbescheiden und Erlaubnissen festgelegten Anforderungen zu beachten.

Biogasanlagen definiert man als technische Einrichtungen, bei denen die Gefährdung für Boden und Gewässer durch den Umgang mit wassergefährdenden Stoffen bei der Betrachtung der Umweltgefährdungen im Vordergrund stehen. Von großer Bedeutung sind

daher die wasserrechtlichen Anforderungen an die Errichtung der Lagerbehälter, Vorlage- und Gärbehälter, Endlagerbehälter, Rohrleitungssysteme, Abtankflächen und Einrichtungen für die unterschiedlichen Lager- und Behandlungsbereiche. Die Aufbringung der Gärprodukte auf landwirtschaftliche Nutzflächen wird hingegen durch die Bioabfallverordnung (ANON. 1998a) und das einschlägige Düngemittelrecht bestimmt. Auch hier sind jedoch die wasserrechtlichen Vorschriften zu beachten (ANON. 2002c). Um den Bau und Betrieb von Biogasanlagen zu steuern und zu überwachen, bzw. die Genehmigung und Überwachung in einen geordneten Rahmen zu stellen, gilt daher eine Vielzahl an Gesetzen und Vorschriften. Aufgrund der Anzahl der geltenden gesetzlichen Regelungen sollen jedoch nur die Gesetze näher erläutert werden, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit stehen.

2.4.1 Bioabfallverordnung (BioAbfV)

Die Bioabfallverordnung ist eine Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (ANON. 1998a).

Im Einvernehmen mit dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BMVEL) und dem Bundesministerium für Gesundheit (BMG) hat das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) am 21. September 1998 auf Grund des § 8 Abs. 1 und 2 des Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes (KrW-/AbfG) vom 27. September 1994 die sogenannte Bioabfallverordnung erlassen (BGBl. I S. 2705). Diese gilt für unbehandelte und behandelte Bioabfälle und Gemische, die zur Verwertung auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzten Böden aufgebracht werden sollen oder zum Zweck der Aufbringung abgegeben werden. Der Geltungsbereich erstreckt sich darüber hinaus auch auf die Behandlung und Untersuchung solcher Bioabfälle und Gemische.

Diese Verordnung gilt für die folgenden Anwendungsbereiche:

- öffentlich-rechtliche Entsorgungsträger und Dritte, Verbände oder Selbstverwaltungskörperschaften der Wirtschaft, denen nach § 16 Abs. 2, § 17 Abs. 3 oder § 18 Abs. 2 des Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes Pflichten zur Verwertung von Bioabfällen übertragen worden sind (Entsorgungsträger),
- Erzeuger oder Besitzer von Bioabfällen oder Gemischen, soweit sie diese Abfälle nicht einem Entsorgungsträger überlassen,
- Denjenigem, der Bioabfälle behandelt (Bioabfallbehandler),
- Hersteller von Gemischen unter Verwendung von Bioabfällen (Gemischhersteller),

- Bewirtschafter von landwirtschaftlich, gärtnerisch oder forstwirtschaftlich genutzten Böden, auf denen unbehandelte oder behandelte Bioabfälle oder Gemische aufgebracht werden sollen oder aufgebracht werden.

Im Anhang 2 der BioAbfV sind die Anforderungen zur Prüfung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit für Produkte nach einer biologischen Behandlung (Aerobbehandlung/Kompostierung und Anaerobbehandlung/Vergärung) enthalten. Die seuchen- und phytohygienische Unbedenklichkeit von Produkten aus der biologischen Abfallbehandlung wird durch Prozess- und Produktprüfungen festgestellt.

Die Prozesssteuerung in Kompostierungsanlagen muss so erfolgen, dass über einen Zeitraum von mehreren Wochen ein thermophiler Temperaturbereich und eine hohe biologische Aktivität bei günstigen Feuchte- und Nährstoffverhältnissen sowie eine optimale Struktur und Luftführung gewährleistet sind. Der Wassergehalt soll mindestens 40 % betragen und der pH-Wert um 7 liegen. Im Kompostierungsverfahren muss im Verlauf der Kompostierung eine Temperatur von mindestens 55 °C über einen möglichst zusammenhängenden Zeitraum von 2 Wochen oder von 65 °C (bei geschlossenen Anlagen: 60 °C) über 1 Woche im gesamten Mischgut einwirken.

In Vergärungsanlagen muss die Abfallmatrix so behandelt werden, dass eine Mindesttemperatur von 55 °C über einen zusammenhängenden Zeitraum von 24 Stunden sowie eine hydraulische Verweilzeit im Reaktor von mindestens 20 Tagen erreicht wird.

Bei niedrigeren Betriebstemperaturen oder kürzerer Einwirkungszeit muss entweder eine thermische Vorbehandlung der Inputmaterialien (70 °C; 1 Stunde) oder eine entsprechende Nachbehandlung der Produkte (Erhitzung auf 70 °C; 1 Stunde) bzw. eine aerobe Nachrotte der separierten Gärrückstände (Kompostierung) durchgeführt werden; Wirtschaftsdünger in landwirtschaftlichen Kofermentationsanlagen (einzelbetriebliche und Gemeinschaftsanlagen) bleiben davon unberührt, soweit Bestimmungen des Tierseuchenrechts dem nicht entgegenstehen. Noch nicht hygienisierte Inputmaterialien sind so aufzubewahren, dass sie nicht mit bereits erhitzten, kompostierten oder vergorenen Materialien in Berührung kommen können.

Die hygienische Unbedenklichkeit von Produkten aus der biologischen Abfallbehandlung wird mit Hilfe von direkten und indirekten Prozessprüfungen und mit Produktprüfungen festgestellt. Die Produkte sind erst dann als hygienisch unbedenklich einzustufen, wenn alle Prüfungsanforderungen erfüllt sind.

Mit der direkten Prozessprüfung wird durch Einbringen von Test- oder Indikatororganismen der Wirkungsgrad des Verfahrens aus hygienischer Sicht für den gesamten Verfahrensablauf ermittelt. Die direkte Prozessprüfung erfolgt mit dem Testkeim

Salmonella Senftenberg W775 (H₂S-negativ). Eine direkte Prozessprüfung ist innerhalb von zwölf Monaten nach Inbetriebnahme einer neu errichteten Bioabfallbehandlungsanlage durchzuführen. Dies gilt entsprechend für bereits geprüfte Anlagen bei Einsatz neuer Verfahren oder wesentlicher technischer Änderung der Verfahren oder Prozessführung. Mit der direkten Prozessprüfung wird durch Einbringen von Test- oder Indikatororganismen der Wirkungsgrad des Verfahrens aus hygienischer Sicht für den gesamten Verfahrensablauf ermittelt. Die Indikatororganismen werden dafür in die für die thermische Inaktivierung der Testorganismen repräsentativen Prozessabschnitte und nach entsprechend zeitlich angepasster Entnahme auf überlebende bzw. infektiöse Testorganismen geprüft.

Geeignete Abfallbehandlungstechniken und die dazu notwendigen baulichen Voraussetzungen können das Gesundheitsrisiko im Umgang mit tierischen Abfällen wesentlich reduzieren (BÖHM 1999; COLE et al. 1999).

Zum Ausschluss der Beteiligung von Biogasanlagen an der Verbreitung von Tierseuchengeschehen, ist es daher notwendig, alle erforderlichen Rahmenbedingungen beim Bau und Betrieb einer solchen Anlage zu erfüllen. Anaerobanlagen müssen aus hygienischer Sicht folgende Bedingungen für eine „direkte Prozessprüfung“ erfüllen (BÖHM 1999):

- Zugangsöffnungen am Reaktor und/oder an der Vor- bzw. Nacherhitzungseinrichtung zum Einbringen der Keimträgerproben,
- Messfühler für Temperatur an den für die thermische Inaktivierung der Testkeime relevanten Anlagenteilen (Hygienisierung),
- pH- und Temperaturmessung im Bereich der Keimträgerproben,
- errechnete bzw. an der Anlage gemessene Angaben zur realen Verweilzeit der Substratpartikel.

Bei den indirekten Prozessprüfungen sind lediglich über den Temperaturverlauf an repräsentativen Stellen der Anlage, z. B. Kernzonen der Hygienisierungseinrichtung, bzw. des Anaerobreaktors, und die Beschickungsintervalle der anaeroben Behandlungsanlagen Aufzeichnungen zu führen und fünf Jahre aufzubewahren.

Die Produktprüfungen (Endproduktkontrollen) im Rahmen der Fremdüberwachung sollen gewährleisten, dass das Endprodukt hygienisch unbedenklich ist. In jeder Kompostierungs- und Vergärungsanlage sind mindestens halbjährliche bzw. vierteljährliche Produktprüfungen durchzuführen.

2.4.2 Düngemittelverordnung

Die Düngemittelverordnung ist eine Verordnung über die Zulassung von Düngemitteltypen sowie Anforderung an Düngemittel, Natur- und Hilfsstoffe (DüMV) (ANON. 1999a).

Nach § 1 Nr. 3 bis 5 der Düngemittelverordnung vom 15. Januar 1998 dürfen Düngemittel und Stoffe, die organische Bestandteile enthalten, nur dann in Verkehr gebracht werden, wenn sichergestellt ist, dass sie bei der Ausbringung nicht für die Übertragung von Krankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich gemacht werden können und keine Schäden an Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und Böden verursachen. Durch die DüMV werden aktuelle Entwicklungen im Hinblick auf die Zulassung von Düngemitteltypen sowie erforderliche rechtliche Präzisierungen einzelner Regelungen berücksichtigt (PHILIPP 2002b). Ziel der Verordnung ist unter anderem die Verwertung von Gärresten aus Anaerobanlagen als Dünger in der Landwirtschaft sicherzustellen. In diesem Zusammenhang werden in der zu erwartenden neuen Düngemittelverordnung Anforderungen an Düngemittel hinsichtlich der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit formuliert werden. Insbesondere sollen dadurch Risiken für die Fruchtbarkeit des Bodens, Gesundheit von Menschen, Haustieren und Nutzpflanzen vermieden werden.

2.4.3 Verordnung (EG) Nr. 1774/2002

Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 03. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (ANON. 2002d).

In Reaktion auf die BSE- und MKS-Krise wurden auch für risikofreie Rückstände aus der Lebensmittelbranche hohe hygienische Anforderungen an den Betrieb und die Ausstattung von Kompostierungs- und Vergärungsanlagen bestimmt.

Innerhalb der Europäischen Union werden mit dieser Verordnung hygiene- und tierseuchenrechtliche Vorschriften hinsichtlich

- Verarbeitung und Verwendung oder Beseitigung,
- Abholung und Sammlung sowie
- Beförderung, Lagerung und Behandlung

tierischer Nebenprodukte erlassen. Die Verordnung dient wie die DüMV, dem Schutz und der Sicherheit der Gesundheit von Mensch und Tier im Umgang mit tierischen Nebenprodukten, wobei Küchen- und Speiseabfällen eine besondere Bedeutung zugemessen werden: „Als Küchen- und Speiseabfälle betrachtet die Europäische Kommission Abfälle aus Einrichtungen, in denen Lebensmittel für den unmittelbaren Verzehr hergestellt werden.

Dazu gehören Restaurants, Catering-Einrichtungen und Küchen, einschließlich Groß- und Haushaltsküchen. Sandwich-Bars oder Sandwich-Herstellungsbetriebe, die Lebensmittel zum unmittelbaren Verzehr anbieten, können dazu gehören, nicht aber Einzelhandelsverkaufsstellen wie Supermärkte oder Lebensmittelfabriken, die Produkte für den Einzelhandel herstellen“.

„Küchen- und Speiseabfälle, die Erzeugnisse tierischen Ursprungs enthalten, können ebenfalls ein Kanal für die Verbreitung von Seuchen sein. Zum Ende von Punkt 8 heißt es: „Küchen- und Speiseabfälle, die innerhalb der Gemeinschaft anfallen, sollten nicht für die Verfütterung an Nutztiere, ausgenommen Pelztiere, verwendet werden“.

Artikel 1 legt den Geltungsbereich fest. Die Verordnung ist damit grundsätzlich anzuwenden, wenn Küchen- und Speiseabfälle für die Tierernährung, die Verwendung in einer Biogasanlage oder zur Kompostierung bestimmt sind. In Artikel 4 bis 6 erfolgen genaue Begriffsbestimmungen der tierischen Nebenprodukte mit einer Einteilung in drei Kategorien, wobei Küchen- und Speiseabfälle, sowie Lebensmittelmarktrückläufer (z. B. abgelaufenes Mindesthaltbarkeitsdatum oder schadhafte Verpackung) in Kategorie 3 eingeordnet sind. Absatz 2 ordnet an, dass das Material der Kategorie 3 unverzüglich abzuholen, abzutransportieren und zu kennzeichnen ist und entweder in einer Verbrennungsanlage, auf einer Deponie oder in einer zugelassenen Biogasanlage verwertet werden muss.

Weiterhin enthält die Verordnung spezielle Vorschriften für die Zulassung von Biogas- und Kompostieranlagen im Anhang VI unter Kapitel II, geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 208/2006 der Kommission vom 7. Februar 2006 (ANON. 2006a).

Entsprechend Abschnitt A müssen Biogasanlagen über nachfolgende Einrichtungen verfügen:

1. unumgehbare Pasteurisierungs-/Entseuchungsabteilung mit

- Geräte zur Überwachung der Temperaturentwicklung,
- Aufzeichnungsgeräten zur kontinuierlichen Aufzeichnung der oben genannten Messergebnisse
- einem angemessenem Sicherheitssystem zur Vermeidung einer unzulänglichen Erhitzung

2. geeignete Einrichtungen zur Reinigung und Desinfektion von Fahrzeugen und Behältern beim Verlassen der Biogasanlage.

Unter Abschnitt B-, C- und D wird zudem detailliert auf die Hygienevorschriften, Verarbeitungsnormen und Fermentationsrückstände und Kompost eingegangen:

1. Material der Kategorie 3, das in mit einer Pasteurierungs-/Entseuchungsabteilung ausgestatteten Biogasanlage als Rohmaterial verwendet wird, muss folgende Mindestnormen erfüllen:

- Höchstteilchengröße vor Eingang in die Abteilung: 12 mm,
- Mindesttemperatur des gesamten Materials in der Abteilung 70 °C und
- Mindestzeit in der Abteilung ohne Unterbrechung: 60 Minuten

2. Validierung des geplanten Verfahrens durch Messung der Verminderung der Lebensfähigkeit/Infektiosität von:

- endogenen Indikatororganismen während des Verfahrens, wobei der Indikator:
 - im Rohmaterial ständig in hoher Anzahl vorhanden ist,
 - nicht weniger hitzeresistent gegenüber den letalen Aspekten des Behandlungsverfahrens ist, jedoch auch nicht signifikant resistenter als die Pathogenen, zu deren Überwachung er verwendet wird,
 - relativ leicht zu quantifizieren sowie relativ leicht zu ermitteln und zu bestätigen ist; oder
 - einem gut beschriebenen Testorganismus oder Virus während der Exposition, der in einen geeigneten Testkörper im Ausgangsmaterial eingebracht wird;

3. Mit der Validierung des in oben genannten geplanten Verfahrens muss nachgewiesen werden, dass das Verfahren folgende Gesamtrisikominderungen erreicht:

- bei thermischen und chemischen Verfahren durch:

- Verminderung von 5 log₁₀ von *Enterococcus faecalis* oder *Salmonella Senftenberg* (775W, H₂S negativ);
- Verminderung des Infektiositätstiters von thermoresistenten Viren, wie etwa Parvovirus um mindestens 3 log₁₀ immer dann, wenn sie als relevante Gefahr ermittelt werden;

- bei chemischen Verfahren auch durch:

- Verminderung resistenter Parasiten wie etwa Eiern von *Ascaris spp.* um mindestens 99,9 % (3 log₁₀) der lebensfähigen Stadien;

4. Repräsentative Proben von Fermentationsrückständen bzw. Kompost, die während oder unmittelbar nach der Verarbeitung aus der Biogas- oder Kompostieranlage zur Überwachung des Verfahrens entnommen werden, müssen folgende Normen erfüllen:

- *Escherichia coli*: n = 5, c = 1, m = 1 000, M = 5 000 in 1 g oder
- *Enterococcaceae*: n = 5, c = 1, m = 1 000, M = 5 000 in 1 g; und

Repräsentative Proben von Fermentationsrückständen bzw. Kompost, die während oder unmittelbar nach der Auslagerung aus der Biogas- oder Kompostieranlage entnommen werden, müssen folgende Normen erfüllen:

Salmonella: in 25 g nicht nachweisbar: $n = 5$; $c = 0$; $m = 0$; $M = 0$ wobei

n = Anzahl der zu untersuchenden Proben;

m = Schwellenwert der Anzahl Bakterien; das Ergebnis gilt als zufriedenstellend, wenn die Keimzahl in allen Proben m nicht überschreitet;

M = Höchstwert der Anzahl Bakterien; das Ergebnis gilt als nicht zufriedenstellend, wenn die Keimzahl in einer oder mehreren Proben größer oder gleich M ist;

c = Anzahl der Proben, bei denen die Keimzahl zwischen m und M liegen kann, wobei die Probe noch als zulässig gilt, wenn die Keimzahl in den anderen Proben m oder weniger beträgt.

Fermentationsrückstände oder Kompost, der die in diesem Kapitel genannten Anforderungen nicht erfüllt, ist erneut zu verarbeiten.

2.4.4 Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG)

Dieses Gesetz dient der Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (ABl. EG Nr. L 273 S. 1), zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 416/2005 der Kommission vom 11. März 2005 (ABl. EU Nr. L 66 S. 10), und der zu ihrer Durchführung ergangenen Rechtsakte der Europäischen Gemeinschaft (ANON. 2004a).

Die nach Landesrecht zuständigen Körperschaften des öffentlichen Rechts (Beseitigungspflichtige) haben, soweit nach der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 tierische Nebenprodukte

1. Material der Kategorie 1 gemäß Artikel 4 Abs. 2 und 3 der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002,

2. Material der Kategorie 2 - ausgenommen Milch, Kolostrum, Gülle sowie Magen- und Darminhalt - gemäß Artikel 5 Abs. 2 und 3 der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002,

abzuholen, zu sammeln, zu befördern, zu lagern, zu behandeln, zu verarbeiten und zu beseitigen. Sie können sich zur Erfüllung dieser Pflicht Dritter bedienen. Satz 2 gilt auch für verendete wild lebende Tiere, sofern die zuständige Behörde eine Verarbeitung und Beseitigung anordnet.

Genauere Vorschriften zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes sind in der Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes zu finden (ANON. 2006b).

2.5 Beschreibung der seuchenhygienisch relevanten Mikroorganismen

2.5.1 *Listeria monocytogenes*

Nach JONES u. SEELIGER (1992) gehören zur Gattung *Listeria* folgende sechs Arten:

- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria innocua*
- *Listeria welshimeri*
- *Listeria grayi*

Innerhalb der Gattung spielt *Listeria monocytogenes* als tier- und menschenpathogene Spezies die Hauptrolle, auch *Listeria ivanovii* ist pathogen und verursacht bei Wiederkäuern Aborte. Die übrigen Arten sind als apathogen einzustufen (LOW und DONACHIE 1997; SELBITZ 2002). Listerien sind grampositive, Oxidase negative und Katalase positive Stäbchen mit einem Durchmesser von etwa 0,4-0,5 µm und einer Länge von etwa 0,5-2 µm (SEELIGER u. JONES, 1986). Sie sind einzeln oder in kurzen Ketten gelagert, selten in längeren Filamenten. Listerien sind fakultative Anaerobier und bauen Glucose fermentativ ab.

Infektionen mit Listerien können prinzipiell in sechs verschiedenen Formen verlaufen (SELBITZ 2002):

- latente Darmbesiedlung mit fäkaler Ausscheidung
- cerebrale Form (Gehirnlisteriose, Meningoencephalitis listeriosa)
- septikämische Form (Listerien-Septikämie)
- metrogene Form (Listerienabort, Metritis)
- Mastitis
- Manifestation am Auge (Keratokonjunktivitis, Iritis, Uveitis).

Die Listeriose ist bei immunkompetenten Erwachsenen selten und äußert sich in der Regel als selbstlimitierende, grippeähnliche Symptomatik (BEUTH u. SCHÜTT-GEROWITT 2001).

Listerien haben ein sehr breites Temperaturspektrum. Die obere Wachstumsgrenze liegt von 42 bis 44 °C und die untere bei 1 °C. Eine Vermehrung ist im pH-Bereich von 5,6 bis 9,6 bei einigen Stämmen bis pH 4,3 möglich (ROLLE u. MAYR 1978; FABER 1989).

Eine Kontamination mit Listerien stellt ein gravierendes Problem in der Lebensmittelindustrie dar (NORTON et al. 2001a; NORTON et al. 2001b; TOMPKIN 2002). Nach den aufsehenerregenden Listerioseepidemien der 80er Jahre hat die gezielte

Suche eine überraschend weite Verbreitung des Erregers in Lebensmitteln, vor allem in Rohprodukten, zutage gefördert, hauptsächlich in Hackfleisch, weniger häufig in Molkereiprodukten, namentlich in der Schmiere von Weichkäse, aber auch in rohem Gemüse. Recht häufig sind Salz- und Süßwasserfische, Garnelen, Hummer sowie Muscheln und Austern mit *Listeria monocytogenes* kontaminiert (BÜLTE 2004c).

Wegen ihrer Fähigkeit, sich in gekühlten Lebensmitteln zu vermehren, bezeichnet man Listerien als „Kühlschrankflora“. Daher geht ein erhebliches Infektionsrisiko von kontaminierten Lebensmitteln aus. Auch in Silage und Abwässern wurde das Vorkommen von Listerien nachgewiesen (GUENICH u. MÜLLER 1984). Bemerkenswert ist die hohe Kochsalzresistenz und wie bereits erwähnt, die konservierende Wirkung von tiefen Temperaturen, wobei die Überlebensdauer unabhängig vom jeweiligen Substrat erheblich verlängert wird. Listerien vermögen sich noch in 10 %iger Kochsalzlösung zu vermehren, bei 20 % und einer Temperatur von 4 °C überleben sie in der Regel bis zu acht Wochen. Listerien können in Teichwasser bei einer Temperatur von 2-8 °C 790 Tage lang nachgewiesen werden. In feuchter Erde halten sich Listerien 11 Monate (ROLLE u. MAYR 1978).

2.5.2 *Yersinia enterocolitica*

Das Genus *Yersinia* gehört der Familie *Enterobacteriaceae* an (ZIEGERT 1988). Nach ALEKSIC u. BOCKEMÜHL (1990) werden zehn verschiedene Spezies zum Genus *Yersinia* zugeordnet:

- *Yersinia pestis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Yersinia frederiksenii*
- *Yersinia intermedia*
- *Yersinia kristensenii*
- *Yersinia rohdei*
- *Yersinia aldovae*
- *Yersinia molaretii*
- *Yersinia bercovieri*

Bei *Yersinia enterocolitica* handelt es sich um gramnegative, fakultativ anaerobe, ovoide Stäbchen von 1,0 bis 3,5 µm Länge und 0,52 bis 1,27 µm Breite (ZIEGERT 1988). *Yersinia enterocolitica* vergärt Glucose mit geringer oder ohne Gasbildung, reduziert Nitrat zu Nitrit und zeigt eine Katalase positive und Oxidase negative Reaktion. *Yersinia enterocolitica* zeigt ein biochemisches Verhalten, das stark temperaturabhängig ist. Hierbei sind die biologischen Leistungen bei 25-29 °C stärker ausgeprägt als bei 35-37 °C (NILEHN 1969). Die optimale Wachstumstemperatur liegt jedoch bei 28-30 °C (KLEER 2004).

Yersinien besitzen folgende drei Antigengruppen:

- O-Antigene
- K-Antigene
- H-Antigene.

Für *Yersinia*-Stämme sind 60 O-Gruppen nachgewiesen, wobei 28 O-Gruppen bei *Yersinia enterocolitica*, 12 bei *Yersinia frederiksenii*, 11 bei *Yersinia intermedia* und 9 bei *Yersinia kristensenii* auftreten. Bestimmte O-*Yersinia enterocolitica*-Serogruppen kombiniert mit H-Antigenen haben in manchen geografischen Orten eine Bedeutung für die menschliche und tierische Gesundheit. In Europa sind die für Menschen pathogenen Stämme hauptsächlich Stämme der Serovaren O:3 Biovar 4, O:9 und O:5, Biovar 2 (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL 1990).

Yersinia enterocolitica ist als Krankheitserreger wesentlich später als *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* bekannt geworden. Bei Menschen ist diese Bakterienart häufiger Erreger von Darminfektionen und kann ein breites Spektrum von klinischen Syndromen verursachen, die vom Alter, Abwehrzustand, Histokompatibilitätstyp und Geschlecht des Patienten abhängen. Tiere fungieren als Erregerreservoir (HEESEMAN 2001a; SELBITZ 2002).

Die deutlich ausgeprägte Psychrotrophie des Erregers, dessen minimale Vermehrungstemperatur bei -1 °C liegt, dürfte die Ursache dafür sein, dass er vor allem in gemäßigten Zonen Bedeutung hat und sich die Yersiniose-Fälle im Spätherbst und Winter häufen. In Lebensmitteln mit pH-Werten im Neutralbereich (frisches Fleisch, Geflügel, Milch) ist auch bei strikter Kühlung eine schnelle Vermehrung möglich (Generationszeit bei Optimaltemperatur von 28-30 °C: 34 min, bei 7 °C: 5 h). Werden Lebensmittel nach dem Erhitzen mit Yersinien kontaminiert, sind ihre Wachstumschancen bei Kühlung deutlich erhöht, weil andere psychrotrophe Mikroflora-Anteile ausgeschaltet sind. Konkurriert der Erreger in kohlenhydrathaltigen Substraten mit glykolytisch aktiven Keimen, wie z. B. Laktobazillen, setzen sich diese infolge der Säurebildung gegenüber den Yersinien durch.

Hitzeresistenz ($D_{68,3\text{°C}}$ in Milch: 5,4 s), Kochsalzempfindlichkeit (maximal 5 % NaCl), pH-Grenzwerte (4,2 bzw. 9,6) und der untere a_w -Grenzwert für das Wachstum (0,97) entsprechen etwa denen von anderen Enterobacteriaceen (KLEER 2004).

2.5.3 Salmonellen

Zu den Salmonellen, die zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehören, rechnet man derzeit 2500 Erregertypen, die sich aber nur auf zwei Spezies verteilen: *Salmonella Enterica* und *Salmonella Bongori* (TSCHÄPE u. BOCKEMÜHL 2002). Die fortlaufende Entwicklung bei den biochemischen, molekularbiologischen, sowie taxonomischen Untersuchungen rechtfertigten eine Zuordnung aller Salmonellen von über 70 % zu der Spezies *Salmonella Enterica* (LE MINOR u. POPOFF 1987). Auf dieser Basis sind heute sechs Subspezies anerkannt (HEESEMAN 2001b):

- *Salmonella Enterica* Subspezies I *enterica*
- *Salmonella Enterica* Subspezies II *salamae*
- *Salmonella Enterica* Subspezies III *arizonae*
- *Salmonella Enterica* Subspezies IV *diarizonae*
- *Salmonella Enterica* Subspezies V *houtenae*
- *Salmonella Enterica* Subspezies VI *indica*.

Salmonellen sind gramnegative, meist bewegliche Kurzstäbchen, 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm groß ohne Sporenbildung und peritrich begeißelt (DEDIE et al., 1993).

Entsprechend den Eigenschaften der diagnostisch wichtigen Antigene erfolgt die Serotypisierung auf der Basis des Kauffmann-White-Schemas (WHITE 1926; KAUFFMANN 1972; KAUFFMANN 1978). Es wird zwischen den drei folgenden Antigenen differenziert:

- O-Antigen (somatisches Antigen)
- H-Antigen (Geißelantigen)
- K-Antigen (Hüllenantigen)

Die Salmonellose des Menschen gehört zu den bedeutendsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, die durch Lebensmittel übertragen wird. Obwohl viele Varianten von *Salmonella enterica* bekannt sind, treten von ihnen nur wenige (insbesondere Stämme der *Salmonella*-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*) epidemiologisch und klinisch in der Vordergrund. Laut dem Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für das Jahr 2005 (ANON. 2006c) wurden die folgenden Serovare als die zehn häufigsten angegeben:

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| - <i>Salmonella Enteritidis</i> | - <i>Salmonella Virchow</i> |
| - <i>Salmonella Typhimurium</i> | - <i>Salmonella Derby</i> |
| - <i>Salmonella Bovismorbificans</i> | - <i>Salmonella Anatum</i> |
| - <i>Salmonella Infantis</i> | - <i>Salmonella Newport</i> |
| - <i>Salmonella Goldcoast</i> | - <i>Salmonella Hadar</i> |

Durch Salmonellen-Ausscheider bei Haus- und Wildtieren, sowie über städtische und industrielle Abwässer kann es zur Kontamination der Umwelt kommen. Der Boden und damit auch die dort wachsenden Pflanzen können bei der landwirtschaftlichen Verwertung von unbehandeltem Klärschlamm, Abwasser oder Fäkalien oder durch Überflutung von Weideflächen kontaminiert werden. Darauf folgt die Infektion der örtlichen Fauna sowie der landwirtschaftlichen Nutztiere (STRAUCH 1987; BÖHM 1993; DEDIE et al. 1993). Die Hitzeempfindlichkeit von Salmonellen ist abhängig vom Serovar und Substrat. Ein Stamm von *Salmonella Senftenberg* wird als besonders thermoresistenter „Prüfkeim“ verwendet, auch *S. Enteritidis* Phagotyp 4 erwies sich als hitzeresistent (PIETZSCH 1981). Außerhalb des tierischen und menschlichen Organismus sind Salmonellen lange lebensfähig. Sie können in offenen Gewässern, im Abwasser, in Jauchegruben, im Brunnenschlamm und auf gedüngtem Boden wochenlang überleben (DEDIE et al. 1993). Je trockener dabei das Material ist, desto größer ist die Tenazität (ROLLE u. MAYR 1993). In Abwasser beträgt die Überlebensdauer 11-23 Tage, in Klärschlamm jedoch bis 6 Monate und in Belebtschlamm bis 11 Monate. In feuchtem Rinderkot waren Salmonellen 10-11 Monate, in getrocknetem Kot sogar 2 Jahre und 7 Monate, in Gülle über 33 Monate lang nachweisbar; in feuchter Erde blieben sie 12 Monate, in trockener Erde 16 Monate lebensfähig. In getrockneten und von licht geschützten menschlichen Fäzes überleben sie 39 Tage bzw. 1-4 Jahre in Rinderdung (DEDIE et al. 1993). Verschiedene Faktoren bestimmen das Überleben von Salmonellen in der Umwelt. Befinden sie sich auf festen Oberflächen, hängt dies von der Ausgangskeimzahl, der relativen Luftfeuchte, den konservierenden Schutzsubstanzen und der natürlichen UV-Strahlung ab. In Flüssigkeiten wird dies vom pH-Wert, den gelösten Stoffen und den antagonistischen Mikroorganismen bedingt. Im Boden ist die Wasseraktivität maßgeblich (BÖHM 1993).

2.5.4 *Escherichia coli*

In der Gattung *Escherichia*, die zur Familie *Enterobacteriaceae* gehört, bildet die Spezies *Escherichia coli* den bedeutendsten Vertreter. Es handelt sich um ein gramnegatives, plumpes und nicht sporenbildendes Bakterium, das 2-6 µm lang und 1-1,5 µm breit ist. Die Beweglichkeit der meisten *Escherichia coli*-Stämme wird durch peritriche Begeißelung ermöglicht (SELBITZ 2002).

Escherichia coli gehört zur normalen Darmflora des Menschen und warmblütiger Tiere. Ca 90 % aller *Escherichia coli*-Stämme sind Teil der menschlichen oder tierischen kommensalen Fäkalflora und völlig apathogen. In die Umwelt gelangt *Escherichia coli* über fäkale Ausscheidungen. Da kein natürliches Habitat für das Bakterium in der Umwelt bekannt ist, wird der Nachweis von *Escherichia coli* in Lebensmitteln und Wasser als Hinweis einer fäkalen Verunreinigung bewertet (HACKER et al. 1991; HEESEMANN 2001b).

Nach der Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006a) kann *Escherichia coli* als Überwachungsparameter bei Fermentationsrückständen und Komposten angewandt werden.

Je nach Ausstattung mit Pathogenitätsfaktoren verursachen die fakultativ pathogenen *Escherichia coli* Harnwegsinfektionen, Septikämien, Wundinfektionen, Pneumonien, Cholezystitis und Abszesse (HEESEMAN 2001b). Auch in der Veterinärmedizin spielt *Escherichia coli* eine Rolle. Die größte praktische Bedeutung besitzt *Escherichia coli* im Komplex der neonatalen Kälberdiarrhoe, weiterhin werden Durchfallerkrankungen bei Lämmern, Septikämien bei Kälbern und Lämmern sowie Mastitis verursacht (SELBITZ 2002).

Innerhalb der Spezies *Escherichia coli* kommen Stämme mit ausgeprägter Enteropathogenität vor, die zu klinisch und epidemiologisch unterschiedlichen Formen von Durchfallerkrankungen führen können. In pathogenetischer Hinsicht werden heute vier Gruppen enteropathogener Colibakterien unterschieden (LEWINE 1987):

- Enteropathogene Serovare von *Escherichia coli* (EPEC)
- Enterotoxigene Serovare von *Escherichia coli* (ETEC)
- Enteroinvasive Serovare von *Escherichia coli* (EIEC)
- Enterohämorrhagische Serovare von *Escherichia coli* (EHEC)

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* Stämme (EHEC) können bei Menschen schwerwiegend verlaufende Erkrankungen und auch Todesfälle hervorrufen. Sie stellen eine Untergruppe der Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) dar (BÜLTE 2002d). Die Toxine werden aufgrund ihrer Strukturanalogie zum Zytotoxin von *Shigella dysenteriae* als Shiga-like-Toxin (SLT) bezeichnet (LEWINE 1987). Als Prototypus der EHEC gilt das Serovar O157:H7, das nach wie vor weltweit bei der hämorrhagischen Colitis (HC) und der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) am häufigsten nachgewiesen wird.

Die Übertragung von *Escherichia coli* erfolgt im Allgemeinen auf dem Weg Mensch oder Tier → (Abwasser) → Lebensmittel → Mensch, im Falle der EHEC aufgrund der niedrigen *Dosis infectiosa minima* auch häufig direkt von Mensch zu Mensch. Rohe Vegetabilien als Beilage und Salate, in denen sie verarbeitet werden, sowie rohe bzw. nicht ausreichend durcherhitzte Lebensmittel tierischen Ursprungs dienen meist als Vehikel. Ursprüngliches Reservoir der VTEC-Stämme sind die Wiederkäuer, dem nach Rinder, Schafe, Ziegen und auch Wildwiederkäuer. Der direkte Kontakt mit Wiederkäuern und ihren Fäzes im Tierhaltungsbereich stellt somit eine erste und in der Bundesrepublik Deutschland offensichtlich auch häufig ermittelte Hauptinfektionsquelle für den Menschen

dar (BÜLTE 2002d). Daneben konnte in Deutschland auch EHEC-kontaminierte Milch als Infektionsquelle identifiziert werden (BOCKEMÜHL et al. 1990).

Beim Erhitzen auf 60 °C werden die *Escherichia coli*-Bakterien in der Regel innerhalb von 15 min abgetötet. Im feuchten Milieu besitzen die Keime eine hohe Tenazität, auch im angetrockneten Zustand bleiben die Keime mehrere Monate lebensfähig (ROLLE u. MAYR 1978; SELBITZ 2002).

2.5.5 *Campylobacter jejuni*

Die Gattungen *Campylobacter* und *Arcobacter* bilden die Familie *Campylobacteraceae*. Bakterien der Gattung *Campylobacter* sind gramnegative, sporenlose, gebogene oder gelegentlich gerade Stäbchen von 0,2-0,9 x 0,5-5,0 µm. Ihre Beweglichkeit erlangen sie durch uni- oder bipolare, monotriche Begeißelung. Das Temperaturoptimum liegt im Bereich von 30-42 °C, die Kultivierung erfolgt mikroaerophil bei 3-15 % Sauerstoff (SELBITZ 2002).

Neue taxonomische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Campylobacter* weisen fünf eigenständige Gruppen aus, von denen innerhalb der Gruppe der thermophilen und Katalase-positiven Spezies in erster Linie *Campylobacter jejuni*, gelegentlich *Campylobacter coli* und *Campylobacter laridis* zu nennen sind (BÜLTE 2004a).

Die spiralförmigen Bakterien der Gattung *Campylobacter* verursachen zwei große Gruppen von Erkrankungen, nämlich eine akute Enterokolitis des Menschen und fetale und enterale Infektionen bei Rind, Schaf und Schwein. *Campylobacter jejuni* ist verantwortlich für ca. 90 % aller *Campylobacter*-Infektionen des Menschen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt in erster Linie über tierische Lebensmittel. Schlachtgeflügel, besonders deren Innereien, und Rohmilch sind bedeutende Risikofaktoren; Innereien von Rind und Schaf können ebenfalls kontaminiert sein (KIST 1994).

Die im Vergleich zur Salmonellose wesentlich niedrigere Infektionsdosis und die Schwierigkeit, den Erreger aus der üppig wuchernden Stuhlflora zu isolieren, sind wahrscheinlich der Grund dafür, dass die Bedeutung der Erkrankung als Lebensmittelinfektion erst spät erkannt worden ist. Weil *Campylobacter* eine optimale Bebrütungstemperatur von 42 °C hat, kommt er meist in so geringen Mengen im Lebensmittel vor, dass die kulturelle Isolierung nur ausnahmsweise und bei gezielter Untersuchung gelingt. Weiterhin ist anzuführen, dass *Campylobacter* häufiger in der sogenannten „viable, but non-culturable form“ (VNCF) vorliegt (BÜLTE 2004a).

Campylobacter sind hitzeempfindlicher als Salmonellen. Durch Kochen einer Speise wird das Bakterium abgetötet, auch bei der Pasteurisierung der Milch. Auch in getrockneten Lebensmitteln hält er sich nicht und kann sich nicht vermehren (BÜLTE 2004a).

Mit 62.114 Fällen im Jahre 2005 rangiert die Campylobacteriose gleich nach der Norovirus-Infektionen an zweiter Stelle bei den meldepflichtigen Darminfektionen in Deutschland (ANON. 2006d).

2.5.6 Enterokokken

Dieser Gruppe im Darm von Menschen und Tieren vorkommender Bakterien wurde innerhalb der Gattung *Streptococcus* lange eine gewisse Sonderstellung eingeräumt, bis sie als eigene Gattung abgetrennt wurde. Zur Gattung *Enterococcus* gehören kugelförmige oder ovoide grampositive Bakterien mit einem Durchmesser bis zu 2 µm. Für die Abgrenzung von den Streptokokken sind Wachstums- und Toleranzkriterien (Sherman-Kriterien) wesentlich. Sie beinhalten das Wachstum in einem Bereich von 10-45 °C, bei einem pH-Wert von 9,6 in Anwesenheit von 6,5 % NaCl und 40 % Galle. Die meisten Enterokokken besitzen das Gruppenantigen D (SELBITZ 2002).

Enterokokken sind in der Natur weit verbreitete Bakterien. Sie besiedeln das Darmlumen von Wirbellosen und Wirbeltieren und finden sich auf Pflanzen, im Wasser, in Futtermitteln sowie im Erdboden. Enterokokken sind beim Menschen ubiquitär verbreitet und können Harnwegsinfektionen bei hospitalisierten Patienten verursachen. Wegen der teilweise auftretenden Probleme während der Therapie stellen Infektionen durch Enterokokken beim Menschen ein ernstes Problem dar. Eine schwerwiegende und therapeutisch häufig problematische Infektion ist die Enterokokken-Endokarditis (HAHN et al. 1970; BLOBEL u. SCHLIESSER 1994; PODBIELSKI u. LÜTTICKEN 2001).

Bei den Tieren werden Enterokokken als Erreger von Mastitiden, Pneumonien, Urogenitalinfektionen, Endokarditiden und Septikämien beschrieben. Vorwiegend handelt es sich dabei um sporadische, faktorenbeeinflusste Erkrankungen. Dabei lassen sich u. a. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus durans* isolieren (SELBITZ 2002).

Die Enterokokken können durch Lebensmittel, aerogen und durch Wund- und Schmierinfektionen übertragen werden (DEDIE et al. 1993; FEHLHABER 2004).

Enterokokken zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber mesophilen Temperaturen, Schwankungen von Temperatur, Salzkonzentration und hohen pH-Werten aus (PODBIELSKI u. LÜTTICKEN 2001).

Nach der Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006) können Enterokokken sowohl als Überwachungsparameter bei Fermentationsrückständen und Komposten angewandt als auch unter bestimmten Voraussetzungen zur Validierung eines geplanten Verfahrens benutzt werden.

2.5.7 *Caliciviridae*

Caliciviren sind kleine unbehüllte Viren die resistent gegenüber Äther, Chloroform und Lipidlösungsmitteln sind. Alle Caliciviren sind stabil gegenüber Fettlösungsmitteln, werden aber bei pH-Werten von 3-5 rasch inaktiviert (KAADEN 2002).

Die Familie *Caliciviridae* enthält die vier Genera:

- Lagovirus
- Vesicovirus (felines Calicivirus)
- Norwalk-like-Virus
- Sapporo-like-Virus

Die Calicivirusinfektion der Katze ist eine auf den oberen Respirationstrakt beschränkte Schnupfenerkrankung mit meist gutartigem Verlauf. In manchen Fällen treten Pneumonien auf (ROLLE u. MAYR 1978).

Feline Caliciviren besitzen eine relative Stabilität bei pH 4, werden aber bei pH-Werten von 3 rasch inaktiviert. Caliciviren sind sehr stabil und ihre Desinfektion wird am besten mit 2 % Natronlauge oder 2 % Formalin bzw. entsprechenden Handelspräparaten erreicht.

Bei den Virose des Menschen stehen weltweit die Noroviren ätiologisch im Vordergrund. Es handelt sich um ein neues Genus, das innerhalb der Familie der Caliciviren die bisher als Norwalk-like-Viren bzw. als small round structures viruses (SRSV) bezeichneten Spezies zusammenfasst. Es sind kleine, einzelsträngige RNA-Viren, die nicht behüllt sind (BÜLTE 2004b). Mehr als 60 % aller Gastroenteritisausbrüche werden durch Noroviren verursacht (GELDERBLOM 2001).

Norovirusinfektionen werden hauptsächlich über zwei Gruppen von Lebensmitteln übertragen, und zwar durch Meeresfrüchte, insbesondere Muscheln, sowie Lebensmittel, die während der Produktion, der Behandlung und Zubereitung kontaminiert werden, aber keinem Erhitzungsprozess mehr unterliegen (≥ 90 °C, 2 min). Diese erklärt die Vielzahl verschiedenster Lebensmittel, die als Vektoren ermittelt werden konnten wie Gemüse, Obst, Säfte, Sandwiches, Mischsalate, Backwaren und Eis (BÜLTE 2004b).

2.5.8 **ECBO Virus**

Die Familie *Picornaviridae* (*pico* = klein + RNA) umfasst unbehüllte Viren mit einer RNA positiven Polarität. Picornaviren sind 22-30 nm groß und stabil gegenüber Chloroform sowie allen Fettlösemitteln. Die Picornaviren sind in 5 Genera untergliedert, die sich nicht aufgrund ihrer Morphologie und Größe, aber anhand von Säureempfindlichkeit,

Flotationsdichte und aufgrund biologischer Eigenschaften differenzieren lassen. Es handelt sich um die folgenden Genera (KAA DEN 2002):

- Enterovirus (ECBO-Virus)
- Hepatovirus
- Cardiovirus
- Aphtovirus
- Rhinovirus

Rinderenteroviren (ECBO, enteric cytopathogenic bovine orphan) sind in großer Zahl aus dem Kot gesunder Tiere und von Rindern mit unterschiedlichen Krankheitssymptomen isoliert worden. Neben den Isolaten aus Kot werden ECBO-Viren auch aus Lunge, Nasenschleim, Hoden, Samen, den Geschlechtsorganen und von Feten nachgewiesen (ROLLE und MAYR 1978).

ECBO-Viren sind weltweit verbreitet und auch in Europa und der Bundesrepublik Deutschland häufig isoliert worden. In der Regel verlaufen ECBO-Virusinfektionen bei Kalb und Rind inapparent. Neben ihrer Affinität zum Respirations- und Digestionstrakt besitzen einige Stämme einen Tropismus für den Genitaltrakt und für embryonales Gewebe. Krankheitsbilder sind Diarrhoe bei Kälbern, respiratorische Symptome und in Ausnahmefällen Vaginitis und Balanoposthitis.

Während die Enteroviren und Hepatoviren im sauren Bereich bis zu pH 2 stabil bleiben, sind die Cardio-, Aphto- und Rhinoviren säurelabil und werden bei pH-Werten unter 6 relativ rasch inaktiviert. Picornaviren haben überwiegend eine hohe Resistenz gegenüber Hitzebehandlungen und dies konnte in verschiedenen Tenazitätsuntersuchungen bestätigt werden. So untersuchten MONTEITH et al. (1986) die Stabilität des bovinen Enterovirus unter anaeroben Bedingungen in Rinderflüssigmist. Bei einer Temperatur von 35 °C blieb das Virus 13 Tage nachweisbar. Dagegen war das untersuchte Virus bei 55 °C innerhalb von 30 min inaktiviert. PINKEPANK et al. (1997) untersuchten die Tenazität von ECBO-Virus während der anaeroben Faulung bei 30 °C und 50-55 °C. Bei 30 °C blieb das Virus ca. neun Tage nachweisbar. Im Gegensatz dazu kam es bei der Kofermentationsstufe bei 50-55 °C innerhalb von 1,5 h zu einer vollständigen Inaktivierung des untersuchten Virus.

2.5.9 Bovines Parvovirus

Die Familie der *Parvoviridae* ist in zwei Subfamilien untergliedert: *Parvovirinae* und *Densovirinae*. Die Virusarten des Genus *Parvovirus* vermehren sich in empfänglichen

Zellkulturen autonom. Diesem Genus gehören alle pathogenen Parvoviren der Vertebraten an (KAADEN 2002).

Bovine Parvoviren verursachen v. a. bei neugeborenen Kälbern sowie bei Feten während der ersten zwei Drittel der Trächtigkeit Erkrankungen. Neugeborene Kälber können schwere, wässrige Diarrhöen entwickeln. In Feten vermehrt sich das Virus in allen Organen. Bei schweren Verlaufsformen kommt es zum intrauterinen Fruchttod mit Abort.

Parvoviren zeichnen sich durch eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegenüber pH-Bedingungen (pH 3-9) und Lipidlösungsmitteln aus. Außerdem gehören sie zu den Viren mit einer außergewöhnlich hohen Tenazität (MARTENS et al. 1999; HOFERER 2001; WINTER 2002). Schon ABINATI u. WARFIELD (1961) vermuteten, dass sie die stabilsten aller bei Wirbeltieren vorkommenden Viren sind. MAHNEL (1979) konnte durch Versuche mit verschiedenen viruziden Wirkstoffen das bovine Parvovirus (BPV) in Bezug auf Thermostabilität, Empfindlichkeit gegen anoxische Oxidation, Strahlenstabilität und Widerstandsfähigkeit gegenüber viruziden Substanzen als das stabilste identifizieren.

LEUZE (1984) und MONTEITH et al. (1986) untersuchten die Inaktivierung des bovinen Parvovirus während der anaeroben Faulung in Rindergülle (35 °C) bzw. im Schlamm (33 °C). Die vollständige Inaktivierung des getesteten Virus konnte in beiden Untersuchungen nach 8-13 Tagen festgestellt werden.

Bei Tenazitätsuntersuchungen von PINKEPANK et al. (1997) im Rahmen der mesophilen Faulung von Gülle bzw. Speiseresten kombiniert mit Gülle, konnte ermittelt werden, dass im mesophilen Bereich keine ausreichend sichere Inaktivierung des bovinen Parvovirus im Biogassubstrat gewährleistet ist.

2.6 Nachweis von Salmonellen

Die Methoden zum Nachweis bzw. Differenzierung von Salmonellen umfassen konventionelle (KÜHN et al. 1993; WALTMAN 2000), serologische (WILLIAMS u. WHITTEMORE 1979; SELBITZ 1992; BARROW 2000), biochemische (JONES et al. 2000), kommerzielle (WEBER 1988) und molekularbiologische (FLOWERS et al. 1987; OLSEN 2000) Nachweisverfahren.

2.6.1 Konventionelle Methoden

Im Folgenden werden die allgemeinen Prinzipien der konventionellen Nachweisverfahren erläutert. Die detaillierte Beschreibung bzw. die Diskussion über Nachweismethoden sowie der verwendeten Medien befinden sich in den Kapiteln 3.2.1 und 5.6.

Die gramnegativen Salmonellen können morphologisch nicht von anderen Enterobakterien unterschieden werden, dadurch bringt die mikroskopische Untersuchung keinen diagnostischen Gewinn. Das gilt auch für die Kolonienformen auf Universalnährböden, mit denen nur hämolysierende Enterobakterienstämme eindeutig von Salmonellen abgegrenzt werden können.

Salmonellen stellen keine besonderen Ansprüche an Nährmedien (SELBITZ 2002). Für die Abgrenzung von allen anderen Arten werden jedoch Differentialnährböden eingesetzt. Folgende drei Stoffwechselfparameter werden dabei genutzt:

- die Unfähigkeit, Laktose zu spalten. Auf laktosehaltigen Nährböden werden an Hand des Farbumschlages von Indikatoren die salmonellenverdächtigen laktosenegativen von den laktosepositiven Kolonien (z. B. *Escherichia coli*) unterschieden
- die Bildung von H₂S, in dessen Folge Sulfide entstehen, die den Kolonien ein schwärzliches Aussehen verleihen
- der Abbau von Propylenglykol, bei dem Säure gebildet wird, die ein Indikator durch Farbumschlag anzeigt, Salmonellenkolonien nehmen eine charakteristische Rotfärbung an.

Zum Nachweis besonders geringer Salmonellen-Mengen oder subletal geschädigter Keime ist eine Voranreicherung ohne selektive Zusätze nötig (Trockenprodukte, Tiefgefrierware, bestrahlte Lebensmittel mit niedrigem pH, Abwasser, Komposte u. a.), weshalb als Voranreicherungsmedium 1 % phosphatgepuffertes Peptonwasser verwendet werden sollte. Das Medium wird mit 10 % des Volumens an gut zerkleinertem Material beimpft

und 12-24 h bei 37 °C bebrütet (EDEL u. KAMPELMACHER 1973; PIETZSCH u. KEMPF 1984).

Der diagnostische Gewinn kann durch Anzucht in flüssigen Anreicherungsmedien, in denen die Begleitflora durch Tetrathionatsalze, Natriumbiselenit, Brillantgrün oder Rindergalle gehemmt wird, erhöht werden. Aus dem Anreicherungsmedium wird nach 24- bis 48-stündiger Bebrütung jeweils auf Laktose-Indikatorplatten abgeimpft. Salmonellenverdächtige, Laktose nicht abbauende Kolonien werden serologisch und biochemisch weiter untersucht (KARUNIAWATI 2001).

Serologische Diagnostik und Einordnung in das Kauffmann-White-Schema bauen auf der Bestimmung der O- und H-Antigene auf (SELBITZ 2002). Ein zusätzliches Hüllenantigen (K-Antigen), bekannt unter der Bezeichnung Vi-Antigen, welches die O-Agglutination stören kann, weisen nur die menschenpathogene Serovare *Salmonella Typhi* und *Salmonella Paratyphi C* auf. Salmonellen mit gleichem O-Antigen, aber ungleichem H-Antigen werden in einer Gruppe zusammengefasst. Stämme mit identischen O- und H-Antigenen gelten als gleicher Serotyp oder Spezies. Heute sind über 60 verschiedene thermostabile O-Antigene und über 90 thermolabile H-Antigene bekannt. Da die Salmonellen neben einem bestimmten Gruppen-O-Antigen noch über andere O-Antigene verfügen und die einzelnen Typen auch fast immer mehrere H-Antigene aufweisen, ergeben sich daraus sehr viele verschiedene Kombinationen, für deren Charakterisierung Buchstaben und arabische Zahlen als Symbole Verwendung finden. Die Gesamt-Antigenformeln mit den lateinischen Bezeichnungen der heute bekannten Serotypen sind im Kauffmann-White-Schema niedergelegt (ROLLE u. MAYR 1978).

2.7 Nachweis von *Escherichia coli*

Die Anzüchtung von *Escherichia coli* bereitet keine Schwierigkeiten, die Differenzierung beginnt in der Regel mit dem Nachweis der Laktosespaltung auf Selektivnährmedien, die biochemische Charakterisierung führt zur Speziesdiagnose. Selektive chromogene Nährböden erlauben an Hand der positiven β -Glucuronidase- und β -Galactosidasereaktion die Differenzierung der *Escherichia coli*-Kolonien von denen anderer lactosepositiver, coliformer Bakterien (SELBITZ 2002).

Bakterien, die bei 45 °C sowohl Laktose unter Gasbildung vergären als auch Indol bilden, werden als „präsumtiver“ *Escherichia coli* bezeichnet (HEESCHEN 1988).

Der fluoreszenzoptische Nachweis von *Escherichia coli* mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) als Substrat der β -D-Glucuronidase ist ein in der Fachliteratur anerkanntes Verfahren (HEIZMANN et al. 1988; SCHWIEN 1988; SCHINDLER 1991).

Das Prinzip eines fluoreszenzoptischen Nachweisverfahren besteht darin, dass ein bestimmtes, in diesem Fall für *Escherichia coli* charakteristisches Enzym mit einem fluorogenen Substrat nachgewiesen wird. Ein fluorogenes Substrat ist dadurch charakterisiert, dass es farblos ist und dass nach enzymatischer Umsetzung zwei Spaltprodukte entstehen, von denen eines durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Als geeignetstes Enzymsubstrat für den Nachweis von β -D-Glucuronidase erwies sich 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG). Die β -D-Glucuronidase wird auch bei *Escherichia coli*-Stämmen gefunden, die kein Gas aus Laktose, keine Säure aus Laktose und kein Indol aus Tryptophan bilden sowie möglicherweise in einer Anreicherungskultur von einem Konkurrenzkeim überwachsen werden. Der Vorteil des fluoreszenzoptischen Nachweises liegt daher darin, dass er in etwa die gleiche Sicherheit bietet, wie die konventionellen Methoden, wenn er in einen konventionellen Nährboden inkorporiert ist. Die Überlegenheit des fluoreszenzoptischen Nachweisverfahren gegenüber den konventionellen Methoden ist dort am größten, wo *Escherichia coli* aus Probenmaterialien angereichert werden muss (SCHWIEN 1988).

3 Material und Methoden

3.1 Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen

Die seuchenhygienisch-mikrobiologischen Untersuchungen an der Biogasanlage wurden im Jahr 2002/03 nach dem damalig geltenden Tierkörperbeseitigungsrecht (ANON. 2001d) durchgeführt.

3.1.1 Beschreibung der Biogasanlage

Die Praxisuntersuchungen wurden in einer neu errichteten, mesophil betriebenen Biogasanlage durchgeführt. Es handelte sich um eine Monovergärung von Speiseabfällen aus Großküchen. Die schematische Darstellung der gesamten Biogasanlage ist der folgenden Abbildung 1 zu entnehmen.

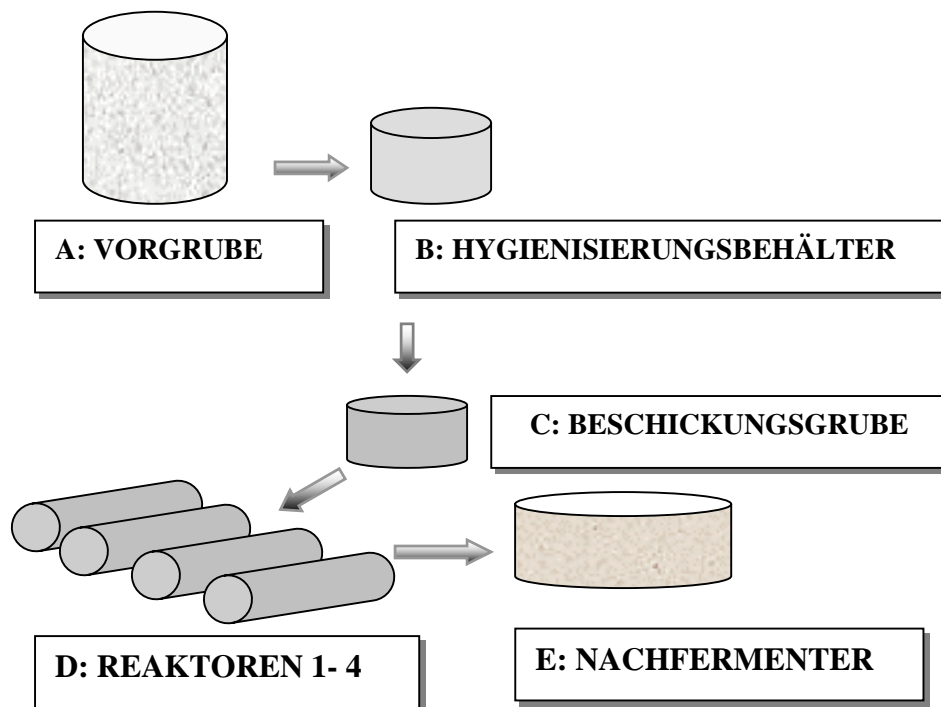


Abb. 1: Schematische Darstellung der Biogasanlage

3.1.1.1 Beschreibung der Vorgrube

Die Speisereste werden in zerkleinertem, pumpfähigen Zustand mit dem LKW angeliefert und nach der Verwiegung in die Vorgrube mit einem Fassungsvermögen von 200 m³ gepumpt. Um gegenüber den niedrigen pH-Werten des angelieferten Materials unempfindlich zu sein, wurde der Betonbehälter mit einer speziellen Innenbeschichtung aus Kunststoff geschützt. Die Vorgrube dient zudem gleichzeitig zur Abpufferung eventuell auftretender, stark schwankender Nährstoff-Zusammensetzung der angelieferten Speisereste. Die Speiseabfälle wurden innerhalb von 24 h nach der Anlieferung verarbeitet.

3.1.1.2 Beschreibung der Hygienisierungsbehälter

Die Hygienisierungsanlage besteht im wesentlichen aus 3 Behältern mit folgenden Funktionen:

- **Behälter 1** ist der Wiegebehälter – Hygienisierungsbehälter
- **Behälter 2** ist ein Warmwasserspeicherbehälter mit eingebauter Edelstahlrohrwendel zur Aufheizung des Substrates
- **Behälter 3** ist ein Behälter mit eingebauter Edelstahlrohrwendel zur Rückkühlung des Substrates.

Diese Behälter sind durch ein System von Rohren, Pumpen und Ventilen miteinander verbunden.

Die nachfolgende Funktionsbeschreibung bezieht sich auf Abbildung 2. In der Grundposition ist der Behälter 2 mit Wasser von ca. 90 °C gefüllt. Dieses Wasser wird vom Blockheizkraftwerk (BHKW) über einen Wärmetauscher ständig auf Temperatur gehalten. Über ein eingebautes Thermometer ist die Temperatur erkennbar. Die Anlage wird von einem Prozessrechner gesteuert. Über eine Vorprogrammierung werden alle notwendigen Daten für den automatischen Ablauf eingegeben. Mittels Startbefehl geht die Anlage in Betrieb. Zunächst wird über eine Beschickungspumpe aus dem Vorlagebehälter eine vorgewählte Menge in Behälter 1 gepumpt. Der Inhalt wird elektronisch gewogen. Nach Erreichen der Füllmenge von 4.000 l beginnt der Heizprozess und nach Erreichen von 70 °C, die Hygienisierung. Dazu wird mittels Beschickungspumpe Substrat durch das Edelstahlrohrwendel des Behälters 2 gepumpt und dabei erwärmt es sich. Der Vorgang läuft so lange bis der Temperaturfühler den eingestellten Wert von 70 °C erreicht. Nun schaltet eine Sicherheitsschaltung ein und hält die erreichte Temperatur für 30 min konstant auf 70 °C. Nach 30 min Heizdauer öffnet ein Ablassventil und eine Pumpe pumpt das Substrat in Behälter 3. In diesem Behälter liegt eine Rohrwendel, welche von Kaltwasser durchströmt wird und die Wärme abführt. Nachdem die Kühltemperatur von ca. 40 °C erreicht ist, wird der Behälterinhalt mittels einer Pumpe in ein Vorratslager leergepumpt. Von dort werden die Reaktoren beschickt. Der Vorgang wiederholt sich kontinuierlich. Die Füll- und Entleerungsvorgänge werden von einem Prozessrechner durch vorgegebene Befehle überwacht. Außerdem steuert er die Temperatur.

Die bakteriologischen und virologischen Untersuchungen mit den Volumen- und Sandwichkeimträgern (siehe 3.1.2.1) fanden im Behälter 1 statt.

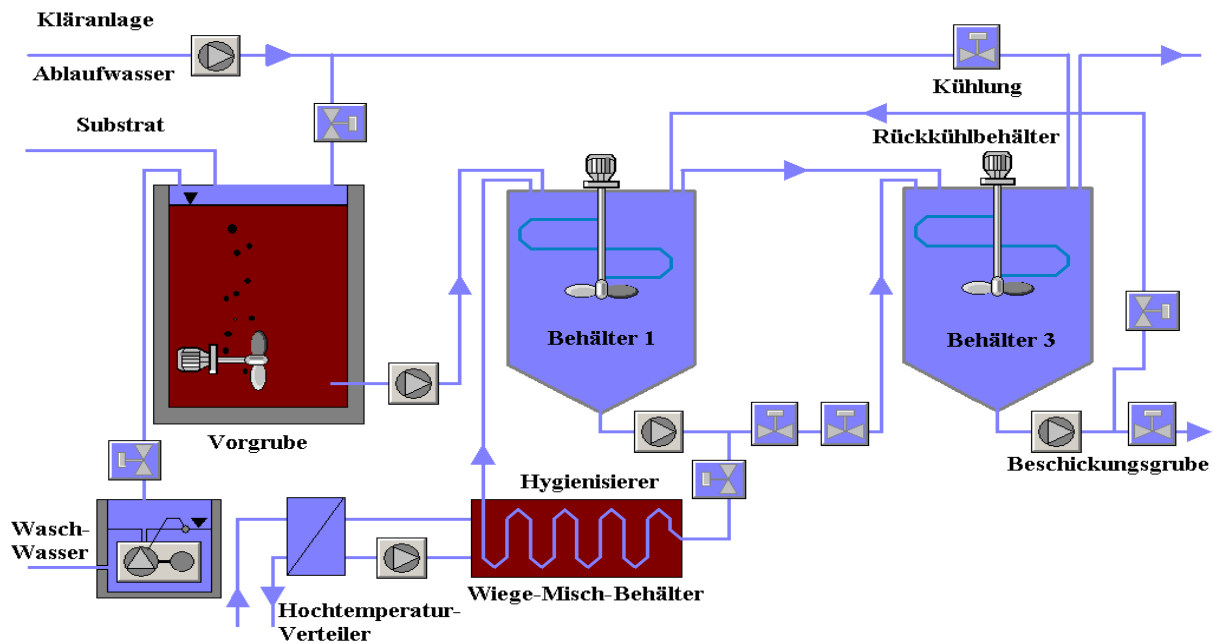


Abb. 2: Schematische Darstellung des Hygienisierungssystems der Biogasanlage

3.1.1.3 Beschreibung der Beschickungsgrube

Nach der Hygienisierung werden die Speisereste mit einer Pumpe in die Beschickungsgrube geleitet. Diese hat ein Volumen von 115 m^3 und dient ebenso wie die Vorgrube als Zwischen-Speicher. Ein Propellerrührwerk homogenisiert die hygienisierten Speisereste in regelmäßigen kurzen Intervallen, um eine Entmischung zu verhindern. Bei Vollast-Betrieb der Anlage reicht das hier vorgehaltene Volumen für etwa fünf Tage aus, so dass auch während des Wochenendes mit ausbleibender Materiallieferung oder bei Wartungsarbeiten an der Hygienisierungseinrichtung ein unterbrechungsfreier Betrieb gewährleistet ist.

3.1.1.4 Beschreibung der mesophilen Reaktoren

Von der Beschickungsgrube aus wird das Substrat durch eine Pumpe mit integrierter Mengenerfassung in die vier Reaktoren gefördert. Die vier Rohreaktoren sind 25 m lang, haben einen Durchmesser von 3 m und ein Volumen von 165 m^3 . In zwei von vier Reaktoren sind für die Probeentnahme im vorderen, mittleren und hinteren Bereich drei Tauchröhren eingebaut worden. In diese Tauchröhren konnte ein Gestänge eingebracht werden, an dem die Keimträger in zwei unterschiedlichen Höhen befestigt worden sind. Auf den Gestängen waren auf gleicher Höhe pH- und Temperatursensoren angebracht. Über eine automatische Messwerterfassung konnten die Daten abgelesen werden. Eine zentral angeordnete Rührwelle dient sowohl der Materialdurchmischung und der

Entgasung als auch der Erwärmung des Reaktorinhaltes, da sie im vorderen Drittel beheizt ist. Im hinteren Bereich des Reaktors gelangt das fermentierte Substrat über einen Dombereich durch ein Syphonsystem bei jeder Einspeisung von frischem Material im vorderen Bereich über das Gleichdruckprinzip in den Nachfermenter. Der Prozess der anaeroben Vergärung in den mesophilen Reaktoren dauerte 26 Tage.

Die Keimträgerversuche mit ausgewählten Testbakterien fanden im Reaktor 2 statt (siehe 3.1.2.2).

3.1.1.5 Beschreibung der Nachfermenter

Das aus den Reaktoren kommende Substrat wird für weitere 30 Tage im Nachfermenter ausgefäult. Dieser geschlossene Stahlbetonbehälter hat ein Gesamtvolumen von 1.000 m³, wovon 800 m³ als Substratraum und 200 m³ als Gasraum zur Verfügung stehen. Die Betriebstemperatur des Nachfermenters beträgt ca. 38 °C, er ist mit einer Wand- und Fußbodenheizung ausgestattet und an der Außenseite mit starker Wärmedämmung gegen Temperaturverluste geschützt.

3.1.2 Versuchsdurchführung

Um physikalische und chemische Einflussfaktoren auf das Überleben von seuchenhygienisch relevanten Mikroorganismen während des gesamten Behandlungsprozesses von Speiseabfällen testen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende bakteriologisch-virologischen Untersuchungen durchgeführt:

1. bakteriologisch-virologische Keimträgerversuche im **Hygienisierungsbehälter** bzw. während der Pasteurisierung
2. bakteriologische Keimträgerversuche im **mesophilen Reaktor** bei der anaeroben Vergärung von Speiseabfällen
3. hygienisch-bakteriologische Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („**Input-und Outputkontrolle**“).

Das Ziel der Keimträger-Untersuchungen lag in einem Nachweis der sicheren Hygienisierung der verwendeten Speiseabfälle durch die Bestimmung der Konzentration von Testorganismen während der Exposition im Hygienisierungsbehälter und mesophilen Reaktor, sowie in einer kontinuierlichen bakteriologischen Kontrolle der Substrate in dieser Anlage.

Parallel zu den Keimträgerversuchen und den „Input- und Outputkontrolle“ wurde der pH-Wert der Substrate ermittelt.

Die detaillierte Beschreibung über durchgeführten Untersuchungen befinden sich in den folgenden Kapiteln 3.1.2.1; 3.1.2.2 und 3.1.2.3.

3.1.2.1 Keimträgerversuche im Hygienisierungsbehälter

Für die Tenazitätsversuche während des Hygienisierungsprozesses wurden folgende Bakterien und Viren verwendet:

Bakterien:

- *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S⁻¹
- *Escherichia coli*³
- *Yersinia enterocolitica*⁵
- *Listeria monocytogenes*²
- *Campylobacter jejuni*⁴
- *Enterococcus faecalis*⁶

Viren:

- BPV (Bovines Parvovirus, Stamm Haden)⁷
- ECBO-Virus (*Picornaviridae*, Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan, Stamm LCR-4)⁸
- FCV (Felines Calicivirus, Stamm F9 VB 76)⁹

Zur Bestimmung der Keimkonzentrationen bzw. der Inaktivierung von ausgewählten Testorganismen während der Aufheizphase als auch der eigentlichen Hygienisierung bei 70 °C wurden jeweils fünf Volumenkeimträger mit den Testbakterien sowie drei mal zwei Sandwichkeimträger mit Testviren in den Hygienisierungsbehälter eingebracht. Die Herstellung der Volumen- und Sandwichkeimträger ist in den Kapiteln 3.1.3.3 und 3.1.5.2.2 beschrieben.

Zur Bestimmung der Ausgangskeimkonzentration wurde eine sog. Nullprobe, wie unter Punkt 3.1.3.3 und Punkt 3.1.5.2.4 beschrieben, untersucht. Die vorerwärmten Speiseabfälle wiesen Anfangstemperaturen zwischen Minimum 26,3 °C und Maximum 40,4 °C auf (siehe Pkt. 4.1.1 und 4.2.1). Um die Reduktion der in die Keimträger eingebrachten Mikroorganismen bestimmen zu können, wurde nach Erreichen von 50 °C, 60 °C bzw. 70 °C je ein Keimträger entnommen und im Labor untersucht. Die verbliebenen zwei Keimträger wurden in Abständen von 15 min nach Erreichen der zur Hygienisierung erforderlichen Temperatur von 70 °C entnommen. Die Keimkonzentration der ausgewählten Testbakterien wurde in fünf unabhängigen Versuchen an fünf verschiedenen Tagen durchgeführt. Die virologischen Untersuchungen wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt, wobei pro Versuchstag zwei Sandwichkeimträger für jedes Testvirus in den Hygienisierungsreaktor eingebracht wurden. Bei jedem Versuch wurde alle vier, zwei bzw. jede Minute die Temperatur gemessen, wodurch die Zeit bis zum Erreichen einer Temperatur von 50 °C, 60 °C sowie 70 °C ermittelt werden konnte. Nach dem Beginn der eigentlichen Hygienisierung, die bei 70 °C beginnt, wurden bis zum Ende der Hygienisierung alle 15 min Proben entnommen. Schwankungen während der Erhitzungsphase und eigentlichen Hygienisierung konnten ebenfalls protokolliert werden.

3.1.2.1.1 Einbringen und Entnahme der Keimträger

Die Keimträger wurden mit Kabelbindern an Eisenstangen befestigt. Aufgrund der starken Strömungen im Hygienisierungsbehälter konnten die Keimträger nicht an freihängenden Stangen eingebracht werden. Deshalb wurden die Eisenstangen innerhalb eines Käfigs in den Hygienisierungsbehälter eingebracht. Der Käfig hatte eine Größe von 200 x 30 x 10 cm.

Bei den Probeentnahmen, die bei 50 °C, 60 °C, 70 °C und 15 min nach dem Beginn sowie am Ende der Hygienisierung erfolgten, wurde je eine Stange aus dem Käfig entnommen.

Während der Keimträgerversuche im Hygienisierungsreaktor wurden die pH-Werte gemessen.

Die entnommenen Volumenkeimträger wurden vorsichtig mit sterilem Aqua dest. ab gespült und bis zur Aufarbeitung im Labor kühl gelagert.

Die Sandwichkeimträger mit den Testviren wurden nach der Entnahme mit Phosphat/Beladungspuffer ab gespült und ebenfalls bis zur weiteren Bearbeitung im Labor kaltgestellt.

3.1.2.1.2 Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der bakteriologischen und virologischen Untersuchungen während der Hygienisierung wurden als Medianwerte der fünf Versuche für die Bakterien und drei mal zwei für die untersuchten Viren dargestellt. Auf eine mathematische Modellierung des Inaktivierungskinetik wurde aus Grunde der Vereinfachung verzichtet. Die hier gewählte Darstellungsform ermöglicht eine praxisrelevante Abschätzung des jeweiligen Temperaturniveaus auf die Inaktivierung der Prüforganismen. Die Einzelergebnisse der durchgeführten bakteriologisch–virologischen Versuche sowie die pH-Werte sind im Anhang in den Tabellen A 1 bis A 3 aufgelistet.

3.1.2.2 Keimträgerversuche im mesophilen Reaktor 2

Für die Tenazitätsversuche während der anaeroben Vergärung im mesophilen Reaktor 2 wurden folgende seuchenhygienisch relevanten Testbakterien verwendet:

- *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S negativ
- *Escherichia coli*
- *Enterococcus faecalis*.

Um festzustellen, ob die Temperaturen im Substrat des ausgewählten Reaktors ausreichen, die Testbakterien zu inaktivieren und nach welcher Aufenthaltszeit dies erfolgt, wurden jeweils drei Volumenkeimträger mit Testbakterien in zwei verschiedene Ebenen des

Reaktors durch drei Tauchröhren eingebracht und nach 1, 7 und 14 d entnommen. Die obere Ebene befand sich auf ca. 2,70 m (30 cm im Substrat eingetaucht). Die untere Ebene befand sich ca. 1 m oberhalb des Reaktorbodens.

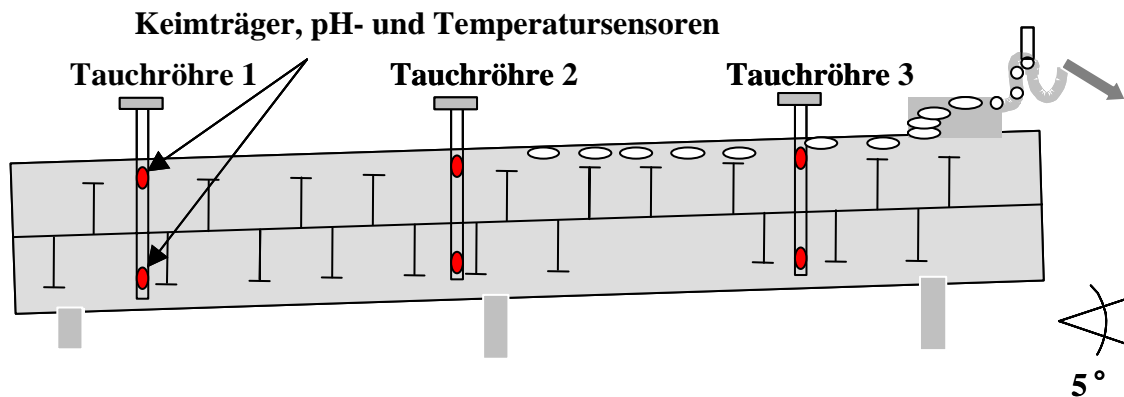


Abb. 3: Schematische Darstellung von Reaktor 2 (ADOLPH 2004)

Die Überlebensfähigkeit der verwendeten Testbakterien wurde in drei unabhängigen Versuchen an drei verschiedenen Tagen untersucht.

Als Kontrolle bzw. zur Bestimmung der Ausgangskeimkonzentration wurde beimpftes Substrat aus den Volumenkeimträgern am selben Tag entnommen und entsprechend (vgl. Pkt. 3.1.3.2 und 3.1.3.3) untersucht. Diese Proben wurden als sog. Nullproben bezeichnet.

3.1.2.2.1 Einbringen und Entnahme der Keimträger

Die Keimträger wurden mit Kabelbindern an Tauchstangen in zwei unterschiedlichen Höhen (Ebenen) neben den pH- und Temperatursensoren angebracht und danach durch die Tauchröhren in den Reaktor eingebracht. Pro Tauchröhre wurden 18 Keimträger verwendet, die wie folgt angebracht waren:

Ebene oben:	Ebene unten:
3 Keimträger mit <i>S. Senftenberg</i>	3 Keimträger mit <i>S. Senftenberg</i>
3 Keimträger mit <i>Escherichia coli</i>	3 Keimträger mit <i>Escherichia coli</i>
3 Keimträger mit <i>Enterococcus faecalis</i>	3 Keimträger mit <i>Enterococcus faecalis</i>

Insgesamt wurden 54 Volumenkeimträger pro Versuch verwendet.

Während der Keimträgerentnahmen wurden jeweils die Temperatur- und die pH-Werte in den drei Tauchröhren der zwei Ebenen protokolliert.

Nach einer vorgegebenen Aufenthaltszeit (1, 7 und 14 d) wurden die Keimträger jeweils aus dem Reaktor entnommen, mit Aqua dest. abgespült und bis zur Aufarbeitung im Labor kühl gelagert.

3.1.2.2.2 Darstellung der Ergebnisse

Aus den Einzelergebnissen der drei Versuche wurde der Medianwert je Tauchröhre und Ebene ermittelt und grafisch dargestellt. Auf eine mathematische Modellierung des Inaktivierungskinetik wurde aus Grunde der Vereinfachung verzichtet. Die hier gewählte Darstellungsform ermöglicht eine praxisrelevante Abschätzung des jeweiligen Temperaturniveaus auf die Inaktivierung der Prüforganismen. Die Einzelergebnisse der Tenazitätsversuche sowie die Medianwerte befinden sich im Anhang in den Tabellen A 4 bis A 9. In der Tabelle 5 sind die Temperatur- und pH-Mittelwerte in den drei Tauchröhren der zwei Ebenen dargestellt. Die detaillierten Werte sind im Anhang in Tabelle A 10 aufgeführt.

3.1.2.3 Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“)

Es wurden hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen der Substrate aus Biogasanlage zur Monovergärung von Speiseresten vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Vergärung durchgeführt. Im nachfolgenden wird diese Verfahren als „Input- und Outputkontrolle“ bezeichnet, wobei das Ausgangssubstrat der „Input“ und das behandelte Substrat der „Output“ ist. Die Untersuchungen wurden über eine Zeitspanne von sechs Monaten kontinuierlich durchgeführt. Dabei wurden kontinuierlich in Abständen von etwa 7 d Input- und Outputproben gezogen und auf ihren Gehalt an Salmonellen, Gesamtcoliforme, Fäkalcoliforme sowie Enterokokken untersucht.

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen lag darin, die Effektivität der in der Biogasanlage ablaufenden Prozesse (Hygienisierung und anaerobe Vergärung in den mesophilen Reaktoren) zu überprüfen.

Folgende Substrate wurden untersucht:

- nicht hygienisierte Speiseabfälle aus der Vorgrube
- hygienisierte Speiseabfälle aus der Beschickungsgrube
- Substrat aus dem Reaktor 1
- Substrat aus dem Reaktor 2
- Substrat aus dem Reaktor 3
- Substrat aus dem Reaktor 4
- Endprodukt aus dem Nachfermenter.

3.1.2.3.1 Probenentnahmen

Die Proben wurden mit einem speziell angefertigten Probenahmegerät entnommen (siehe folgende Abbildung 4). Ca. 1 l der entnommenen Probe wurde in sterile Plastikflaschen abgefüllt und bis zur weiteren Bearbeitung kühl gelagert.

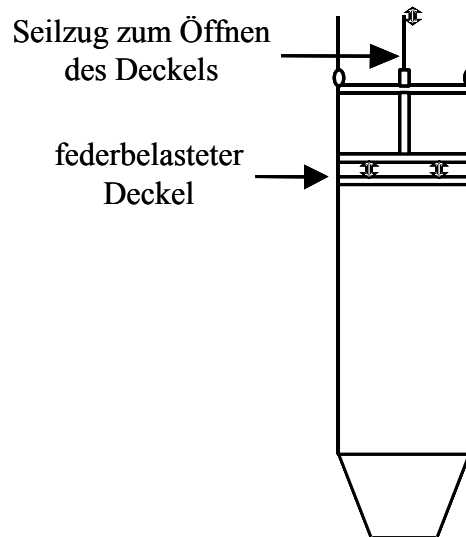


Abb. 4: Grafische Darstellung des Probenahmegerätes (ADOLPH 2004)

3.1.2.3.2 Darstellung der Ergebnisse

Die Konzentration von Testbakterien wurde anhand des MPN-Verfahrens ermittelt (siehe 3.1.3.4).

Die Ergebnisse der Salmonellenuntersuchungen wurden qualitativ als positiver oder negativer Nachweis des Vorkommens von *Salmonella* spp. in 50 g der Probe dargestellt.

Die Ergebnisse der Input- bzw. Outputproben werden als Minimal-, Maximal- und Medianwerte dargestellt, wobei für die grafische Darstellung der Ergebnisse der Medianwert verwendet wurde. Für die grafische Darstellung der ermittelten Konzentrationen von Enterokokken aus den Reaktoren 1 bis 4 (Pkt. 4.4.3) und aus dem Nachfermenter (Pkt. 4.4.4) wurden die Einzelwerte verwendet.

Auf eine mathematische Modellierung des Inaktivierungskinetik wurde aus Grunde der Vereinfachung verzichtet. Die hier gewählte Darstellungsform ermöglicht eine praxisrelevante Abschätzung des jeweiligen Temperaturniveaus auf die Inaktivierung der Prüforganismen.

In den dargestellten Tabellen (Pkt. 4.4.1 bis 4.4.4) wurden die pH-Werte der Proben als Minimal-, Maximal- und Mittelwerte dargestellt.

Die detaillierten Werte der untersuchten Proben sowie die einzelnen pH-Werte sind im Anhang in Tabellen A 11 bis A 18 aufgeführt.

3.1.3 Bakteriologische Methoden zu den Keimträger-Untersuchungen

Im Folgenden werden die bakteriologischen Arbeitsmethoden zur Herstellung und Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspensionen, die Befüllung und Beimpfung der Speiseabfälle in den Keimträgern sowie die verwendeten bakteriologischen Methoden zum Nachweis der Testbakterien aus beimpften Speiseresten der Keimträger beschrieben.

3.1.3.1 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Die Testbakterien wurden kulturell auf Standard-I-Agar¹⁰ angezüchtet und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Alle zwei Wochen wurde die Überalterung der Kolonien durch eine Passage vermindert. Mit einer ausgeglühten Öse wurden einige Kolonien von der Kulturen des Standard-I-Agars entnommen und in 50 ml Standard-I-Bouillon¹¹ überführt. Diese beimpften Suspensionen wurden bei 37 °C für 24 h inkubiert. Danach wurde die Keimzahl der vorbereiteten Bakteriensuspensionen mit dem Koch'schen-Oberflächen-Verfahren bestimmt. Für die Herstellung einer *Campylobacter jejuni*-Suspension wurde zunächst aus der Stammkultur die bei -80 °C gelagert war, eine benetzte Öse entnommen und in 9 ml Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon überführt (siehe 3.1.3.9) und unter mikroaerophilen Bedingungen 72 h bei 43 °C inkubiert.

Diese Keimsuspensionen dienen zur Beimpfung der vorbereiteten Keimträger.

3.1.3.2 Keimkonzentrationsbestimmung (Koch'sches-Oberflächen-Verfahren)

Diese Methode weist die Zahl der lebenden oder vermehrungsfähigen Mikroorganismen nach. Diese können unter günstigen Wachstumsverhältnissen in oder auf einem Agar Kolonien ausbilden. Nach der Inkubation wird die Anzahl der ausgewachsenen Kolonien und damit zugleich die Zahl der vermehrungsfähigen Mikroorganismen bestimmt. Dieses Ergebnis gilt als die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE).

Aus der vorbereiteten Bakteriensuspension wurde 1 ml in 9 ml sterile 0,9 %ige Kochsalz-Lösung¹² pipettiert. Nach Durchmischen des Inhaltes wurde 1 ml in ein neues Glas mit 0,9 %iger Kochsalzlösung dazugegeben. Dieses Verfahren wurde wiederholt, bis die erwartete Keimkonzentration vorlag. Von den letzten drei Verdünnungsstufen wurden jeweils 0,1 ml auf zwei Standard-I-Agar überführt und mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auswertung der gewachsenen Kolonien, wobei nur Platten mit Koloniezahlen zwischen 30 und 300 berücksichtigt wurden. Der ermittelte Wert wurde mit der jeweiligen Verdünnungsstufe multipliziert, um die Ausgangskonzentration der Bakteriensuspension zu bestimmen.

3.1.3.3 Herstellung und Beimpfung der Keimträger von Typ 1

Die Keimträger vom Typ 1 werden auch als „Volumenkeimträger“ (RAPP 1995) oder „Diffusiosprüfkörper“ bezeichnet. Der Keimträger dienen dazu, die zu untersuchenden Testbakterien dauerhaft zu fixieren, und weisen hinsichtlich der zu untersuchenden Testkeime ein inertes Verhalten auf. Sie ermöglichen es eine praxisrelevante Aussage über das Inaktivierungsgeschehen von Mikroorganismen in den untersuchten Substraten zu treffen ohne das behandelte Substrat kontaminiert wird, aber die exponierten Mikroorganismen trotzdem, ähnlich wie unter natürlichen Verhältnissen, in einer entsprechenden Matrix verteilt sind. Sie können mehrfach verwendet werden. Durch die Abgrenzung des Keimträgerinhaltes gegenüber dem den Keimträger umgebenden Außenmilieu durch Verwendung von Membranen entsprechend dimensionierter Porengröße, können die im Umgebungsmilieu des Keimträgers befindlichen, das Inaktivierungsgeschehen von Mikroorganismen mit beeinflussenden Stoffe, wie Schadgase und gelöste Stoffe, in den Keimträger diffundieren und so auf die Testorganismen einwirken, ohne dass die im Innern des Keimträgers befindlichen Krankheitserreger im direkten Kontakt zum Untersuchungssubstrat stehen. Dadurch wird vermieden, dass die zu untersuchenden Krankheitserreger aus dem Keimträger abgeschwemmt werden und so dazu geeignet sind, das Untersuchungssubstrat zu kontaminieren. Durch diesen Aufbau wird ein exaktes Messen des Absterbevorgangs im Innern des Keimträgers durch das MPN-Verfahren der überlebenden Testkeime möglich.

Als Befüllungssubstrat der Keimträger dienten Speiseabfälle aus der Biogasanlage. Um die Begleitflora zu inaktivieren, wurde das aus der Vorgrube entnommene Substrat im Wasserbad bei 70 °C 60 min erhitzt.

12 g des Substrates wurden in den Keimträger eingefüllt und mit 1,2 ml der entsprechenden Keimkonzentration, je nach Bakterium zwischen 10^7 - 10^9 KBE/ml (siehe 4.1) beimpft. Das Befüllungssubstrat hatte einen pH-Wert von 3,5 und wurde durch eine Zugabe von 20 mol NaOH¹³ auf einen neutralen pH-Wert von 7-7,5 gebracht. Die Keimträger wurden verschlossen, wobei ein Membranfilter¹⁴ (Porengröße 0,2 µm) mit einer Viton-Flachdichtung¹⁵ zwischen die zwei Filterunterstützungen eingesetzt und anschließend mit einem Verschlussring fest zugeschraubt. Die hierdurch beimpften Keimträger wurden am selben Tag einige Stunden später verwendet. Bis dahin wurden die Keimträger kühl gelagert.

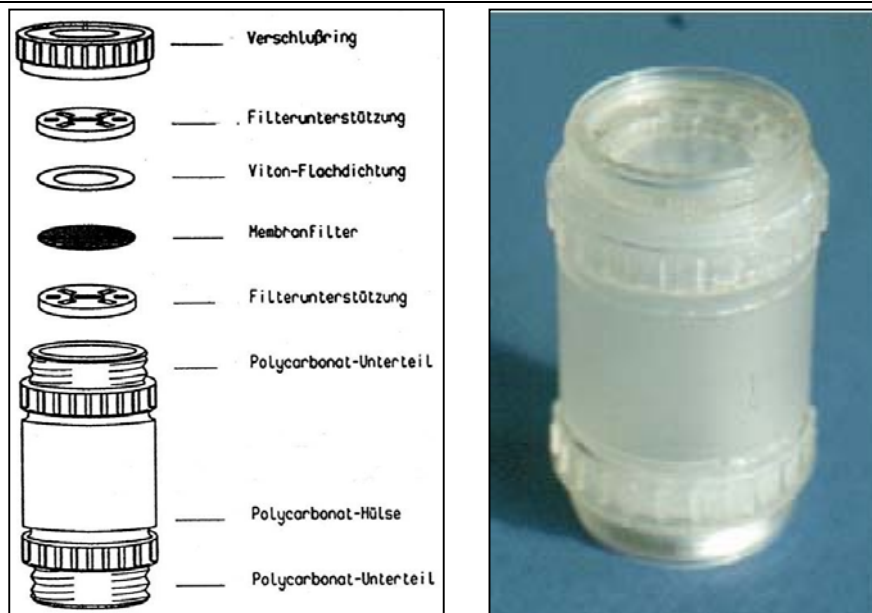


Abb. 5 : Grafische Darstellung eines Keimträgers Typ 1

3.1.3.4 Bestimmung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ („most probable number“, MPN)

Die *most-probable-number* ermöglicht eine grobe Schätzung der Keimkonzentration in der Probe. Nachdem die Hygienisierung sowie die Faulung erfolgt ist, wurden die Inhalte der Keimträger untersucht und die Anzahl der Keime mit dem MPN-Verfahren bestimmt. Eine Probe von 1 g wurde mit 9 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt, da bei der ersten Verdünnungsstufe eine arithmetische Verdünnungsreihe vorlag. 1 ml aus der Verdünnungsreihe wurde in drei parallele Ansätze der jeweils benötigten Bouillons überführt. Diese Ansätze wurden jeweils nach dem artspezifischen Verhalten inkubiert und danach auf die entsprechenden Selektivnährmedien ausgestrichen bzw. durch die spezifischen physikalisch-biochemischen Reaktionen bestimmt.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden drei aufeinander folgende Dezimalverdünnungsstufen verwendet, d. h. die drei höchsten positiven Verdünnungsstufen gewählt. Aus der Zahl der in ihnen nachgewiesenen Mikroorganismen ergab sich eine Zahlenkombination, der mit statistischen Methoden eine MPN-Zahl pro g/ml Probe zugeordnet werden kann.

Die Nachweisgrenze des ausgewählten Verfahrens liegt bei 10^1 KBE/ml, da jedoch die Auswertung des MPN-Verfahrens anhand der DE MAN-Tabelle erfolgt, die auch Werte $< 1,0 \times 10^1$ enthält (0,30 z. B.) können sich auch Ergebnisse im 10^0 Bereich ergeben.

Für die Auswertung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ gilt die MPN-Tabelle von DE MAN (1983).

3.1.3.5 Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Vorgehensweise

Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* erfolgte in folgenden vier Schritten:

- 1) Kultivierung der Bakterien in einem selektiven Voranreicherungsmedium
- 2) nachfolgende Anreicherung in einem Medium mit einer antibiotischen Ergänzung, die das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmt, doch das Wachstum von *Listeria monocytogenes* nicht beeinträchtigt
- 3) Gewinnung von Reinkulturen durch das Ausstreichen auf einem Selektivagar
- 4) morphologische und biochemische Identifizierung

Materialien

Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurden folgende Materialien benötigt:

- UVM-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon modifiziert¹⁶
- UVM-Supplement¹⁷
- PALCAM-*Listeria*-Selektiv-Agar nach VAN NETTEN et al. (1989)¹⁸
- PALCAM-*Listeria*-Supplement nach VAN NETTEN et al. (1989)¹⁹
- Columbia-Blutagar²⁰
- 0,9 %ige NaCl-Lösung
- destilliertes Wasser
- Katalasereaktion²¹

In der UVM (University of Vermont)-*Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon wurde *Listeria monocytogenes* durch ein 2-stufiges Anreicherungsverfahren gewonnen. Dabei fand eine Voranreicherung in UVM-Bouillon ohne Supplement sowie eine Anreicherung in UVM-Bouillon mit UVM-Supplement statt.

Beide Bouillons enthielten Nalidixinsäure, wobei eine Zugabe von Acriflavinhydrochlorid (UVM-Supplement) der UVM-Bouillon eine höhere Selektivität ermöglichte.

Palcam-Agar ist ein hoch selektiver Agar, der durch die zusammengesetzten Nährstoffsubstrate und eine dazugehörige antibiotische Ergänzung (PALCAM-*Listeria*-Supplement) ein gutes Wachstum von Listerien und eine Hemmung von gramnegativen und der meisten grampositiven Bakterien zur Folge hat. Die Komponenten Äsculin, Ammonium Eisen (III)-citrat, Mannit und Phenolrot ermöglichten eine differentialdiagnostische Aussage zum möglichen Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* (VAN NETTEN et al. 1989).

Zusammensetzung von PALCAM-*Listeria*-Supplement:

- Polymyxin B-Sulfat 5,0 mg/0,5 l
- Ceftazidim 10,0 mg/0,5 l
- Acriflavin 2,5 mg/0,5 l

Geräte

Folgende Geräte wurden benötigt:

- Reagenzgläser
- Reagenzglasständer
- Pipette (1 ml)
- Pipette (10 ml)
- Pipettenaufziehhilfe
- Impfösen
- Vortexer
- elektronische Waage
- Bunsenbrenner
- Bunsenbrenneranzünder
- Spatel
- Inkubator (37 °C)
- Inkubator (30 °C)
- Objektträger

Voranreicherung

Aus dem Keimträger Typ 1 ("Volumenkeimträger") wurde jeweils 1 g des zu untersuchenden Substrates in 9 ml 0,9 %ige sterile Kochsalzlösung abgewogen, womit die erste Verdünnungsstufe einer dekadischen Verdünnungsreihe angelegt wurde. Es folgten weitere 1:10-Verdünnungen bis zur erwarteten Ausgangskeimzahl. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 3 x 1 ml in 3 x 9 ml Voranreicherungsbouillon UVM abpipetiert und gut geschüttelt. Danach folgte eine Bebrütungszeit im Inkubator bei 30 °C für die Dauer von 24 h.

Anreicherung

Zur Anreicherung von *Listeria monocytogenes* wurden nach der Inkubationszeit aus jeder Verdünnungsstufe der UVM-Voranreicherungsbouillon 0,1 ml pro Verdünnungsstufe in 10 ml UVM-Anreicherungsbouillon mit UVM-Supplement überführt. Anschließend folgte eine 24stündige Bebrütung bei 30 °C.

Gewinnung von Reinkulturen

Die bebrütete UVM-Anreicherungsbouillon (mit UVM-Supplement) wurde fraktioniert auf PALCAM-Agar ausgestrichen und anschließend bei 37 °C für 24-48 h aerob inkubiert.

Morphologische und biochemische Identifizierung

Listeria monocytogenes hydrolysiert das Glucosid Äsculin in Glucose und Äsculetin. Letzteres bildet mit Eisen-(III)-Ionen einen olivgrünen bis schwarzen Komplex. Kleine grau-grüne Kolonien mit einem schwarz-braunen Hof wurden als *Listeria monocytogenes*-Kolonien identifiziert. Wuchsen die Kolonien sehr dicht zusammen, kam es zur einer schwarz-braunen Färbung des gesamten Nährbodens. In dem Fall wurden die Listeriaverdächtigen Kolonien von PALCAM-Agar entnommen und auf Blutagar im Direktausstrich überimpft. Es folgte eine 24stündige Inkubation bei 37 °C. Nach der Bebrütung wurden die gewachsenen Kolonien, die eine Betahämolyse zeigten biochemisch auf positive Katalasereaktion überprüft.

Tab. 1: Biochemische Charakteristika der Gattung *Listeria* (SEELIGER u. JONES 1986)

Charakteristika	Reaktion
Beweglichkeit (bei 20-25 °C)	+
Sauerstoffbedarf	fakultativ
Wachstum bei 35 °C	+
Katalase-Aktivität	+
Hydrogen-Sulfid-Produktion	-
Säurebildung aus Glucose	+
Methylrot-Reaktion	+
Voges-Proskauer-Reaktion	-
Indol-Bildung	-
Citrat-Verwertung	-
Harnstoff-Spaltung	-

Tab. 2: Biochemische Reaktionen von *Listeria monocytogenes* (LOVETT 1988)

Betahämolyse	+
Katalase	+
Nitratreduktion	-
Harnstoffabbau	-
Methylrot	+
Voges-Proskauer	+
TSIA	A ^a
SIM Beweglichkeit	+
Glucose	+
Äsculin	+
Maltose	+
Mannit	-
Rhamnose	+
Xylose	-

TSIA: Triple Sugar-Iron-Agar

^a Acid slant (LOVETT 1988)

Auswertung der Ergebnisse

Das Ergebnis wurde mit der Hilfe der DE MAN-Tabelle ausgewertet und als der Nachweis von *Listeria monocytogenes* in 1 ml der Probe angegeben.

3.1.3.6 Nachweis von *Yersinia enterocolitica*

Vorgehensweise

Der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* wurde in folgenden vier Stufen erbracht:

- 1) Kultivierung der Bakterien in einem nicht selektiven Voranreicherungsmedium
- 2) nachfolgende Anreicherung in einem Selektivmedium mit Antibiotikum, das das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmt und dadurch das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* fördert
- 3) Gewinnung von Reinkulturen durch das Ausstreichen auf einem Selektivagar
- 4) morphologische und serologische Identifikation

Materialien

Der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* erforderte folgende Materialien:

- gepuffertes Peptonwasser²²
- 0,9 %ige Kochsalzlösung
- Carbencillin²³
- Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT u. VASSILIADIS (RVS-Bouillon)²⁴
- Yersinia-Selektiv-Agar nach SCHIEMANN (CIN-Agar)²⁵
- Yersinia-Selektiv-Supplement (CIN)²⁶
- Standard-I-Agar
- monospezifisches Testserum „Anti-Yersinia enterocolitica O:3“²⁷

Zur Voranreicherung wurde gepuffertes Peptonwasser verwendet, um subletal geschädigte Yersinien zu reaktivieren. Die modifizierte RAPPAPORT-VASSILIADIS-Selektivbouillon, die mit dem Antibiotikum Carbencillin ergänzt wurde (2,5 mg/l), diente anschließend der selektiven Anreicherung (RAPP 1995).

CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)-Agar ist ein Selektivnährboden zur Isolierung von Yersinien.

Die zusammengesetzten Nährstoffe förderten das Wachstum von Yersinien, und die dazugehörige Ergänzung der Antibiotika hemmt die Begleitflora (BERINGER 1984).

Zusammensetzung von Yersinia-Selektiv-Supplement:

- Cefsulodin 7,5 mg/l
- Irgasan 2,0 mg/l
- Novobiocin 1,25 mg/l

Geräte

Folgende Geräte wurden benötigt:

- Reagenzgläser
- Reagenzglasstände
- Pipette (1 ml)
- Pipette (10 ml)
- Pipettenaufziehhilfe
- Impfösen
- Vortexer
- elektronische Waage
- Bunsenbrenner
- Bunsenbrenneranzünder
- Spatel
- Inkubator (37 °C)
- Inkubator (30 °C)
- Objektträger

Voranreicherung

1 g des zu untersuchenden Materials wurde mit 9 ml steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung vermischt und geschüttelt. Damit war die erste Verdünnungsstufe einer dekadischen Verdünnungsreihe angelegt. Es erfolgten weitere Verdünnungen bis zur erwarteten Keimzahl. Jeweils 3 x 1 ml aus jeder Verdünnungsstufe wurden in 3 x 9 ml gepuffertes Peptonwasser überimpft und gut vermengt. Im Anschluss daran wurden die Proben 24 h bei 30 °C bebrütet.

Anreicherung

Die zweite Anreicherungsstufe erfolgte mit Überimpfung von 0,1 ml aus jeder Verdünnungsstufe aus der Voranreicherung in 10 ml modifizierte RAPPAPORT-VASSILIADIS-Selektivbouillon. Nach der Überimpfung wurden die Proben bei 30 °C für 24 h bebrütet.

Gewinnung von Reinkulturen

Aus jeder Verdünnungsstufe der parallel angelegten Röhren wurden jeweils drei fraktioniert auf die bereitgelegten CIN-Agarplatten ausgestrichen und anschließend weitere 24 h bei 37 °C bebrütet.

Morphologische und serologische Identifikation

Yersinia enterocolitica-Kolonien präsentierten sich als kleine kugelförmige Kolonien, die eine dunkelrote Mitte und eine transparente Peripherie besaßen.

Da manche Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* ebenfalls auf CIN-Agar vorkommen können, wurden die verdächtigen Kolonien mit einem Drei-Ösen-Ausstrich auf Standard-I-Agar und CIN-Agar ausgestrichen, bei 37 °C für 24 h bebrütet und im Anschluss mit Hilfe der Objektträger-Agglutination getestet. Hierzu wurde ein monospezifisches Testserum Anti-*Yersinia enterocolitica* 0:3 verwendet. Aus einer verdächtigen Kolonie wurde wenig Bakterienmasse entnommen und auf einem dunklen Objektträger in einen Tropfen Testserum eingerieben. Im positiven Fall kam es nach 1 bis

20 Schwenkungen zu einer sichtbaren flockigen Agglutination. Eine milchig-trübe Suspension deutete eine negative Reaktion an.

Auswertung der Ergebnisse

Mit Hilfe der DE MAN-Tabelle wurde das ausgerechnete Ergebnis als der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* an 1 ml der Probe dargestellt.

3.1.3.7 Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W 775

Der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W 775 wird unter Pkt. 3.4.1.2 beschrieben. Im Gegensatz zu dem dort beschriebenen Verfahren wurde hier 1 g des zu untersuchenden Substrates aus dem Keimträger Typ 1 in 9 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung abgewogen, jedoch nicht bei 4 °C für 24 h geschüttelt, sondern sofort weiter verdünnt. Weitere Nachweisschritte wurden entsprechend Pkt. 3.2.1.4 durchgeführt, wobei zur Gewinnung von Reinkulturen der Selektivagar (BPLS) verwendet wurde.

Das Ergebnis wurde wie der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W 775 in 1 g der Probe dargestellt.

3.1.3.8 Nachweis von *Escherichia coli*

Die Methode zum quantitativen Nachweis von *Escherichia coli* findet sich im Abschnitt 3.2.2.2. Hier wurde 1 g der zu untersuchenden Probe in 9 ml 0,9 %ige Na-Cl-Lösung abgewogen und dekadisch verdünnt.

Das Ergebnis von *Escherichia coli* wurde mit Hilfe DE MAN-Tabelle ausgewertet und auf 1 ml der Probe umgerechnet.

3.1.3.9 Nachweis von *Campylobacter jejuni*

Vorgehensweise

Der Nachweis von *Campylobacter jejuni* fand in folgenden drei Schritten statt:

- 1) Kultivierung der Bakterien in einem Selektivmedium
- 2) nachfolgende Gewinnung von Reinkulturen unter mikroaerophilen Bedingungen
- 3) morphologische und biochemische Identifizierung der Kolonien

Materialien

Folgende Materialien wurden benötigt:

- Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon
- Nährbouillon Nr. 2²⁸
- Campylobacter-Selektiv-Supplement (Preston) (mod.) SR 204E²⁹
- Campylobacter-Anreicherungs-Supplement SR 084E³⁰

- Campylobacter-Selektivagar (Basis) nach SKIRROW³¹
- Anaerocult[®] C³²
- lysiertes Pferdeblut³³
- Cellulose-Nitrat-Filter (0,45 µm)³⁴
- 0,9 %ige NaCl-Lösung
- steriles destilliertes Wasser
- Cytochromoxydase³⁵
- Katalasereaktion

Vorbereitung der Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon

12,5 g der Nährbouillon Nr. 2 wurden in 475 ml Aqua dest. gelöst, 15 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Danach wurden die gelösten Inhalte je eines Röhrchens Campylobacter-Selektiv-Supplement (Preston) und Campylobacter-Anreicherungs-Supplement mit 25 ml lysiertem Pferdeblut zur Nährbouillon dazugegeben.

Zusammensetzung des Campylobacter-Selektiv-Supplements (Preston) pro Röhrchen (ausreichend für 500 ml Bouillon):

- Rifampicin (5 mg)
- Polymyxin B (2500 IE)
- Trimethoprim (5 mg)
- Amphotericin B (5 mg)

Zusammensetzung des Campylobacter-Anreicherungs-Supplements pro Röhrchen (ausreichend für 500 ml der Bouillon):

- Natriumpyruvat (0,125 g)
- Natriummetabisulfit (0,125 g)
- Eisen-(II)-sulfat (0,1255 g)

Campylobacter-Selektivagar ist ein nährstoffreicher Nährboden, der zusammen mit einer sauerstoffreduzierten und CO₂-angereicherten Gasatmosphäre das Wachstum von *Campylobacter jejuni* fördert.

Die als Campylobacter-Selektiv-Supplement (Preston) zugesetzten Ergänzungen hemmen die Begleitflora weitgehend.

Anaerocult[®] C dient zu Erzeugung einer sauerstoffreduzierten und CO₂-angereicherten Atmosphäre im 2,5 l-Anaerobiertopf mit ca. 8-10 Vol. % CO₂ und 5-7 Vol. % Sauerstoff.

Geräte

Für den Nachweis von *Campylobacter jejuni* wurden folgende Geräte benötigt:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| - Reagenzgläser | - Bunsenbrenneranzünder |
| - Reagenzglasständer | - Spatel |
| - Pipette (1 ml) | - Inkubator (37 °C) |
| - Pipette (10 ml) | - Inkubator (43 °C) |
| - Pipettenaufziehhilfe | - 2,5 l-Anaerobtopf |
| - Impfösen | - Schere |
| - Vortexer | - Pinzette |
| - Elektronische Waage | - Mikroskop |
| - Bunsenbrenner | - Objektträger |

Anreicherung

Zur Anreicherung von *Campylobacter jejuni* wurde 1 g der zu untersuchenden Probe in 9 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung abgewogen und gut durchgeschüttelt, so dass die erste Stufe einer dekadischen Verdünnung vorlag. Die Anzahl der weiteren Verdünnungsstufen variierte entsprechend der zur erwarteten Keimkonzentration des zu untersuchenden Substrates. Aus jeder entsprechenden Verdünnungsstufe wurde je 3 x 1 ml der Suspension entnommen und in die drei parallel angelegten Reagenzgläser mit je 9 ml Preston-Anreicherungsbouillon überimpft. Um die mikroaerophilen Bedingungen zu erreichen, wurden die Proben in einen Anaerobtopf unter Zugabe von einem Anaerocult® C-Beutel gestellt. Dieser Beutel wurde mit 6 ml Wasser befeuchtet. Es folgte die mikroaerophile Bebrütung über 48 h bei 43 °C.

Gewinnung von Reinkulturen

Aus jedem Röhrchen mit Preston-Anreicherungsbouillon wurde 0,1 ml entnommen und auf den Cellulose-Nitrat-Filtern, die den Agarplatten auflagen, mit Hilfe einer Pipette vorsichtig verteilt. Diese Agarplatten wurden 2 h mikroaerophil bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Filter mit einer sterilen Pinzette entfernt und weitere 48 h bei 43 °C mikroaerophil bebrütet.

Identifizierung der Kolonien

Die *Campylobacter jejuni*-Kolonien wurden durch die Beweglichkeit der gewachsenen Kolonien mit einem Mikroskop und durch den Cytochromoxydase- und Katalase-Test nachgewiesen.

Auswertung der Ergebnisse

Mit Hilfe der DE MAN-Tabelle wurde das Ergebnis ausgewertet und als Nachweis von *Campylobacter jejuni* in 1 ml der Probe dargestellt.

3.1.3.10 Nachweis von *Enterococcus faecalis*

Vorgehensweise

Der Nachweis von *Enterococcus faecalis* wurde in folgenden drei Schritten erbracht:

- 1) Kultivierung von Bakterien in einem selektiven Anreicherungsmedium
- 2) Gewinnung von Reinkulturen durch das Ausstreichen auf einem Selektivagar
- 3) morphologische und serologische Identifizierung der gewachsenen Kolonien

Materialien

Der Nachweis von *Enterococcus faecalis* erforderte folgende Materialien:

- 0,9 %ige Kochsalzlösung
- Azid-Glucose-Bouillon³⁶
- Kanamycin-Äsculin-Agar³⁷
- Standard-I-Agar
- Phadebact Strep D Test³⁸

Das Wachstum von *Enterococcus faecalis* sowie anderer Enterokokken wird durch die Zusammensetzung der Azid-Glucose-Bouillon gefördert, wobei die entsprechende Konzentration von Natriumazid (0,2 g/l) das Wachstum der Begleitflora, insbesondere von gramnegativen Bakterien, hemmt.

Tab. 3: Qualitätskontrolle des Nährbodens

Teststämme	Wachstum
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	gut
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	gut
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 8043	gut
<i>Streptococcus bovis</i> DSM 20065	mäßig / gut
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	kein / schwach
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	kein / schwach
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	kein / schwach

Kanamycin-Äsculin-Agar dient zur Isolierung, Differenzierung und Keimzahlbestimmung von Enterokokken in Nahrungsmitteln, Wasser und anderem Material nach MOSSEL et al. (1978).

Dieser Agar besitzt eine konstant hohe Selektivität auf Enterokokken. Während Kanamycin und Azid die Begleitflora weitgehend hemmen, können D-Enterococci, die eine sehr geringe Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen aufweisen, fast ungehindert wachsen.

Tab. 4: Qualitätskontrolle des Nährbodens mit Spiralplattenmethode

Teststämme	Wiederfindungsrate	Umschlag nach olivgrün-schwarz
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	> 70 %	+
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 8043	> 70 %	+
<i>Enterococcus durans</i> ATCC 11507	> 70 %	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	nicht limitiert	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	< 0,01 %	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	< 0,01 %	-

Geräte

Folgende Geräte wurden benötigt:

- Reagenzgläser
- Reagenzglasständer
- Pipette (1 ml)
- Pipette (10 ml)
- Pipettenaufziehhilfe
- Impfösen
- Vortexer
- elektronische Waage
- Bunsenbrenner
- Bunsenbrenneranzünder
- Spatel
- Inkubator (37 °C)

Anreicherung

1 g des zu untersuchenden Materials wurde in 9 ml sterile 0,9 %ige Kochsalzlösung abgewogen und gut geschüttelt. Damit war die erste Verdünnungsstufe einer dekadischen Verdünnungsreihe angelegt worden. Es folgten weitere 1:10-Verdünnungen bis zur erwarteten Keimzahl. Jeweils 3 x 1 ml aus jeder Verdünnungsstufe wurden in 3 x 9 ml Azid-Glucose-Bouillon überimpft und gut vermengt. Im Anschluss daran wurden die Proben bis zu 48 h bei 37 °C bebrütet. Eine Wachstumstrübung der Bouillon legte das Vorhandensein von *Enterococcus faecalis* nahe. Tritt keine Trübung auf, ist die Anwesenheit von Keimen auszuschließen.

Gewinnung von Reinkulturen

Zur Verifizierung des Enterococcus-Nachweises wurde aus jeder zu untersuchenden Verdünnungsstufe die vorliegenden geteilten Kanamycin-Äsculin-Azid-Agarplatten mit einem fraktionierten Ösenausstrich versehen und weitere 48 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Morphologische und serologische Identifikation

Enterococcus faecalis hydrolisiert im Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar das Glucosid Äsculin in Glucose und Äsculetin, das mit Eisen(III)-Ionen einen olivgrünen bis schwarzen Komplex mit einem dunklen Hof bildet.

Bei nicht eindeutig als Enterokokken zu erkennenden Kolonien erfolgte die Anzüchtung auf Standard-I-Agar. Es erfolgte eine 24 stündige Bebrütung bei 37 °C. Die gewachsenen Kolonien wurden danach serologisch im Agglutinationstest mit Phadebact Strep D Test identifiziert.

Auswertung der Ergebnisse

Das vorgelegte Ergebnis wurde mit Hilfe der DE MAN-Tabelle ausgewertet und als Nachweis von *Enterococcus faecalis* in 1 ml der Probe dargestellt.

3.1.4 Bakteriologische Methoden zu den Untersuchungen des nativen Substrates („Input- und Outputkontrolle“)

Im Folgenden werden die bakteriologischen Methoden zum Nachweis von Enterokokken, Gesamtcoliformen und Fäkalcoliformen, sowie Salmonellen dargestellt. Auch wird die Methode der parallel zu den bakteriologischen Untersuchungen durchgeführten pH-Messungen des Substrates beschrieben. Der pH-Wert wurde sowohl bei den bakteriologischen Untersuchungen des nativen Substrates als auch bei den Keimträgeruntersuchungen ermittelt.

3.1.4.1 Nachweis von *Enterococcus* spp. in 20 g Substrat

Die Methode zum quantitativen Nachweis von *Enterococcus* spp. wurde unter Pkt. 3.1.3.10 beschrieben.

Im Gegensatz zum Nachweis von *Enterococcus faecalis* wurden hier 20 g der zu untersuchenden Proben in 180 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung abgewogen und bei 4 °C für 24 h geschüttelt.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde durch das Verfahren der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ („most probable number“, MPN) erzielt.

Das Ergebnis wurde wie der Nachweis von *Enterococcus* spp. an 1 g der Probe dargestellt.

3.1.4.2 Nachweis von Gesamtcoliformen und Fäkalcoliformen in 20 g Substrat

Das Verfahren zum quantitativen Nachweis von gesamt- und fäkalcoliformen Bakterien wird nach der Methode von SCHINDLER (1991) durchgeführt. Das genaue Verfahren ist unter Pkt. 3.2.2.2 beschrieben (Makromethode).

Im Gegensatz zur Makromethode, bei der eine Anreicherungstemperatur von 44 °C Verwendung fand, wurde hier keine Modifizierung der Anreicherungstemperatur durchgeführt. Die untersuchten Proben wurden bei 37 °C in einer Zeitspanne von 24-48 h inkubiert.

Gesamtcoliforme sind durch Gasbildung im Probenansatz definiert.

Fäcalcoliforme sind durch Gasbildung und Fluoreszenz (MUG-Spaltung) sowie Indolbildung definiert.

Die Ergebnisse wurden durch das Verfahren der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ („most probable number“, MPN) gewonnen.

3.1.4.3 Nachweis von Salmonellen

Der Nachweis von *Salmonella* spp. ist im Abschnitt 3.2.1.6 beschrieben.

3.1.4.4 Bestimmung des pH-Wertes

20 g Probenmaterial wurden in 200 ml 0,01 molare CaCl-Lösung³⁹ gegeben. Die Probe wurde 18-20 h im Kühlraum bei 4 °C geschüttelt. Der pH-Wert wurde mit dem Microprocessor pH Meter (pH 535 Multical) bestimmt.

3.1.5 Virologische Methoden zu den Keimträger-Untersuchungen

Im Folgenden werden die virologischen Arbeitsmethoden für die Keimträgeruntersuchungen im Hygienisierungsbehälter detailliert beschrieben.

3.1.5.1 Verwendete Testviren

Im Rahmen der „direkten“ Prozessprüfung des Hygienisierungssystems der Biogasanlage wurden folgende Viren auf ihr Tenazitätsverhalten getestet:

- BPV (Bovines Parvovirus, Stamm Haden)⁴⁰
- ECBO-Virus (*Picornaviridae*, Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan, Stamm LCR-4)⁴¹
- FCV (Felines Calicivirus, Stamm F9 VB 76)⁴²

3.1.5.2 Vorgehensweise

Die virologischen Untersuchungen beinhalteten folgende Schritte:

- 1) Zellkultivierung
- 2) Herstellung der „Sandwich-Keimträger“ (Typ 2)
- 3) Elution der „Sandwich-Keimträger“ (Typ 2)
- 4) Virustitration
- 5) Auswertung der Ergebnisse

3.1.5.2.1 Zellkultivierung

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- BEL (bovine embryonale Lungenzellkulturen) für BPV
- MDBK, NBL-1 (permanente Rindernierenzellen) für ECBO-Virus
- CRFK (Katzennierenzellen) für FCV

Materialien und Geräte

Für die Zellkulturen wurde folgendes benötigt:

- Brutschrank (5 % CO₂-Atmosphäre, 37 °C)⁴³
- Inversmikroskop
- Zellkulturflaschen (250 ml , 75 cm²)⁴⁴
- Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)⁴⁵
- Fötale Kälberserum (FKS)⁴⁶
- Versen-Trypsin-Lösung⁴⁷
- Penicillin-G-Lösung (100 000 U/ml)⁴⁸
- Streptomycinsulfat-Lösung (256 mg/ml)⁴⁹
- Gentamycinsulfat-Lösung (50 mg/ml)⁵⁰
- Amphotericin-D-Lösung (250 µg/ml)⁵¹

Verfahren

Als Standardmedium wurde DMEM mit folgenden Zusätzen verwendet:

0,4 % Penicillin-G-Lösung, 0,4 % Streptomycinsulfat-Lösung, 0,4 % Gentamycinsulfat-Lösung, 0,8 % Amphotericin-Lösung und 5 % fötales Kälberserum.

Das Zellkulturmedium wurde von den Zellkulturflaschen abpipettiert und verworfen. Die Flaschen wurden anschließend mit 5 ml Versen-Trypsin-Lösung gespült. Danach fand eine Überschichtung der Zellen mit 1 ml Trypsin-Lösung statt. Nach 5-20 min Bebrütung wurden die abgelösten Zellen mit DMEM (5 % FKS) resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde eine neue Zellkulturflasche oder eine 96-well-Platte eingesät. Die neu angesetzten Zellkulturflaschen wurden auf ein Endvolumen von 20-25 ml aufgefüllt und im Brutschrank gelagert.

3.1.5.2.2 Herstellung der Keimträger von Typ 2

Die Keimträger vom Typ 2 dienen zur Exposition von Viren in biotechnologischen und thermischen Behandlungsprozessen, weil aufgrund der Durchlässigkeit der Membranfilter in den Keimträgern vom Typ 1 diese nicht verwendet werden können.

Materialien und Geräte

Es wurden folgende Materialien benötigt:

- Phosphat-/Beladungspuffer⁵²
- Filtrationsvorsatz⁵³
- Spritze (2 ml)
- Virosorb[®]-Membran (Durchmesser 15 mm)⁵⁴
- Dichtungsring⁵⁵
- Polycarbonatmembran (Porengröße 10 nm, Maße 1,5 x 1,5 cm)⁵⁶
- Glaskolben
- Plastischweißgerät
- Pinzette
- Petrischalen
- Zellstoff
- Virussuspension

Keimträger Herstellung

Die Viren adsorbieren an eine elektropositiv geladene Virosorb-Membran. Diese wird zwischen zwei Polycarbonatmembranen mit sehr geringer Porengröße eingeschlossen. So können einerseits Umwelteinflüsse auf das Virus wirken, ohne dass es zu einer Kontamination der Umwelt kommt. Andererseits ist eine leichte Wiederfindung des Virus möglich (TRAUB et al. 1986; SPILLMANN et al. 1987; PESARO et al. 1995).

Für die Beimpfung der Virosorb-Membran wurde zuerst die Virussuspension in Phosphat-Beladungspuffer 1:10 verdünnt. Die sterile Membran wurde mit einem Dichtungsring in den Filtrationsvorsatz eingeschraubt und an der Öffnung des Glaskolbens fixiert. 1 ml der entsprechenden Virussuspension wurde danach mit Hilfe einer Spritze durch den Filtervorsatz gedrückt. Mit einer sterilen Pinzette wurde die so beimpfte Membran entnommen und dicht zwischen zwei Polycarbonatmembranen eingeschweißt.

Bis zu ihrer Verwendung wurden die so hergestellten Keimträger Typ 2 bei 4 °C in Petrischalen mit feuchtem Zellstoff gelagert. Als Kontrolle der Virusbeaufschlagung wurde ein Keimträger (Nullprobe) pro Virus sofort eluiert.

3.1.5.2.3 Elution der Keimträger vom Typ 2

Materialien und Geräte

Zur Elution der Keimträger Typ 2 wurden folgende Materialien benötigt:

- Beef-Extrakt-Lösung⁵⁷
- Weißglasröhrchen mit Schraubdeckel (15 ml)
- Schere
- Pinzette

- Ultraschallbad
- Zentrifuge⁵⁸
- Eppendorf-Tubes (1,5 ml)

Verfahren

Nach den jeweiligen Probenentnahmen während des Hygienisierungsprozesses wurden die Keimträger Typ 2 mit Phosphat-/Beladungspuffer gespült und in Petrischalen mit feuchtem Zellstoff verbracht. Die Keimträger wurden gekühlt, ins Labor transportiert und weiter bearbeitet.

Die Weißglasröhrchen wurden mit 1 ml Beef-Extrakt-Lösung gefüllt. Die Polycarbonatmembran wurde mit der Schere aufgeschnitten, die Virosorb-Membran vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entnommen und in die Weißglasröhrchen überführt. Die Proben wurden dann im Eiswasser-Ultraschallbad für 5 min behandelt. Nach der Beschallung wurde die Suspension abgesaugt, in Eppendorf-Tubes überführt und bei 3 000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort weiter bearbeitet bzw. bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.1.5.2.4 Virustitration

Materialien und Geräte

Für das Einsäen der 96-well-Mikrotiterplatten und für die Titration der Viren wurden folgende Materialien verwendet:

- DMEM
- FKS
- 96-well-Mikrotiterplatte⁵⁹
- sterile Glasröhrchen
- Inversmikroskop
- Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂)

Verfahren

Die 96-well-Mikrotiterplatten wurden einen Tag vor der quantitativen Ermittlung mit einer geeigneten Zelllinie eingesät. Dazu wurden die Zellen, wie in Pkt 3.1.5.2.1 beschrieben, geteilt. Pro Kavität wurden 100 µl eingesät. Es wurden Glasröhrchen mit 1,8 ml DMEM mit 2 % FKS vorbereitet.

0,2 ml der Probe wurde in 1,8 ml DMEM überführt, so dass die erste Verdünnungsstufe einer dekadische Verdünnungsreihe vorlag. Die Verdünnungen wurden zwischen 10⁻⁶ und 10⁻⁸ durchgeführt, je nach zu erwartender Keimzahl. Das alte Medium der Mikrotiterplatte wurde verworfen. Nun wurden aus jeder Verdünnungsstufe je viermal 100 µl/Kavität auf

die 96-well-Mikrotiterplatte überführt. Die erste Reihe der Kavitäten wurde mit 100 µl Titrationsmedium ohne Virus beimpft und diente als Zellkontrolle. Die so beimpfte Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre bebrütet. Die erste Überprüfung auf zytopatische Effekte (CPE) unter dem Lichtmikroskop erfolgte in der Regel 48 h nach der Beimpfung, danach in zweitägigem Abstand bis zur letzten Kontrolle nach einer Woche.

3.1.5.2.5 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Virustiter erfolgte nach der Formel von Spearman und Kärber (MAHY u. KANGRO 1996) :

$$\text{Log KID}_{50} = X_0 - d/2 + d \sum r/n$$

X₀: dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnung mit Reaktionsrate 1,0 (alle positiv)

d: log₁₀ des Verdünnungsfaktors

r: Anzahl der Reagenten pro Stufe

n: Anzahl der Replikate pro Stufe

Der berechnete Virustiter bezieht sich auf den dekadischen Logarithmus der 50 %-igen kulturinfektiösen Dosis pro µl (log₁₀ KID 50/100 µl).

3.2 Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und *Escherichia coli* aus biologischem Material

3.2.1 Untersuchungen auf Salmonellen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei von der TC/308 Arbeitsgruppe „Charakterisierung von Schlämmen“ vorgeschlagenen CEN Methoden (ANON. 2002a) zum Nachweis von Salmonellen unter Verwendung von verschiedenen biologischen Substraten angewandt. Zusätzlich zu den drei Entwürfen der Nachweismethoden wurde die MPN-Standardmethode zur Quantifizierung von Salmonellen des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim durchgeführt (Methode 2).

Bei den Methoden 1- und 2 handelt sich um einen semiquantitativen Nachweis von Salmonellen, der infolge zweier verschiedener Verfahren die „wahrscheinlichste Keimzahl“ („most probable number“, MPN) ermittelt.

Methode 3 beschreibt ein Verfahren für den quantitativen Nachweis bzw. die Zählung der einzelnen Kolonien von Salmonellen auf einem geeigneten Nährboden.

Die Methode 4 beschreibt einen qualitativen Nachweis von *Salmonella* spp. in einer bestimmten Probemenge.

Die vorgeschlagenen Methoden, mit Ausnahme der Methode 4, wurden bisher vor allem zum Nachweis von Salmonellen aus Klärschlämmen angewandt, ihre Eignung für andere biologische Abfälle sollte in den vorliegenden Untersuchungen überprüft werden. Dazu wurden außer Klärschlamm zusätzlich Erde- und Gülleproben mit in die Untersuchungen aufgenommen.

Um festzustellen, bis zu welcher Konzentration Salmonellen im biologischen Material nachzuweisen sind und ob die vorgelegten Nachweisverfahren hinsichtlich der in den von der Arbeitsgruppe CT/318-CEN vorgeschlagenen Methoden verwendeten Materialien geeignet sind, wurden drei Substrate, in welchen Salmonellen unter natürlichen Bedingungen vorkommen können (Erde, Klärschlamm und Rindergülle), artifiziell mit drei verschiedenen Konzentrationen (10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/ml) von *Salmonella Senftenberg* H₂S positiv und negativ Suspensionen kontaminiert und anschließend auf ihren Gehalt an Salmonellen untersucht.

3.2.1.1 Beimpfung des Substrates

Für die Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen mit den vier verschiedenen Methoden wurden die drei Substrate: Erde, Rindergülle und Klärschlamm verwendet. Als Testkeime dienten *Salmonella Senftenberg* H₂S positiv⁶⁰ und *Salmonella Senftenberg* H₂S negativ. Nach der Herstellung der Bakteriensuspensionen (siehe 3.1.3.1) wurde die Konzentration der Testbakterien mit dem Koch'schen-Oberflächen-Verfahren (siehe 3.1.3.2) bestimmt. Vor der Beimpfung des Substrates wurden die zwei Bakteriensuspensionen zusammengemischt und dekadisch in 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt. Dabei wurde eine parallele Verdünnungsreihe angesetzt. Die ausgewählten Substrate Gülle und Klärschlamm wurden, um die nicht sporenbildende Begleitflora zu inaktivieren, im Wasserbad bei 70 °C für 60 min erhitzt. Die Erde wurde 72 h im Brutschrank bei 70 °C erhitzt. Für jede Konzentrationsstufe wurden 1.500 g des erhitzten Substrates abgewogen und mit 15 ml einer entsprechenden Mischung von NaCl und Salmonellen-Suspension beimpft. Der Klärschlamm und die Gülle wurden je in einer sterilen Flasche abgefüllt. Für die Vermischung der Bakteriensuspension mit Erde wurde ein Gefrierbeutel verwendet.

Die Beimpfung der Substrate fand im Verhältnis 1:100 statt.

Es kamen folgende Verdünnungsstufen zur Anwendung:

- 1) zur Erlangung einer Endkonzentration von 10^1 KBE/g in 1.500 g des Substrates wurden jeweils 7,5 ml aus den beiden parallel laufenden Konzentrationsstufen 10^3 verwendet
- 2) zur Erlangung einer Endkonzentration von 10^2 KBE/g in 1.500 g des Substrates wurden jeweils 7,5 ml aus den beiden parallel laufenden Konzentrationsstufen 10^4 verwendet

- 3) zur Erlangung einer Endkonzentration von 10^3 KBE/g in 1.500 g des Substrates wurden jeweils 7,5 ml aus den beiden parallel laufenden Konzentrationsstufen 10^5 verwendet

Nach anschließender guter Durchmischung der Proben erfolgten die Probenahmen nach 30 min. Aus jedem beimpften Substrat unterschiedlicher Konzentration wurden 4 x 10 Einzelproben zum Nachweis mit den vier verschiedenen Methoden aufgeteilt d. h. 40 Proben pro Substrat. In einem Durchgangsversuch wurden insgesamt 120 Proben untersucht.

Es wurden folgende Probemengen für die vier Methoden entnommen:

- Methode 1: 10 g
- Methode 2: 20 g
- Methode 3: 25 g
- Methode 4: 50 g

3.2.1.2 Darstellung der Ergebnisse

Die gewonnenen Einzelwerte der *Salmonella*-Untersuchungen wurden als Minimum-, Maximum- und Mittelwerte dargestellt, wobei für die statistische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse die Standardabweichung (SD) und das 95 %-Vertrauensintervall (95 % CI) berechnet wurden.

Die Einzelergebnisse der *Salmonella*-Untersuchungen sind im Anhang in den Tabellen A 19 bis A 30 aufgelistet.

3.2.1.3 Methode 1: Methode der Flüssiganreicherung in Selenit-Cystin-Bouillon in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium zur semi-quantitativen höchstwahrscheinlichsten Keimzahl von Salmonellen (MPN)

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis bzw. zur Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl von Salmonellen in biologischem Material.

Vorgehensweise

Der Nachweis von *Salmonella* spp. wurde in folgenden vier Stufen erbracht:

- 1) Kultivierung von Salmonellen in einem selektiven Voranreicherungsmedium
- 2) nachfolgende Anreicherung in einem Selektivmedium, welches das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmt und dadurch das Wachstum von Salmonellen fördert
- 3) Gewinnung von Reinkulturen durch das Ausstreichen auf zwei Selektivagars
- 4) morphologische und serologische Identifikation

Materialien

Der Nachweis von Salmonellen erforderte folgende Materialien:

- Trypton⁶¹
- Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon⁶²
- Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT u. VASSILIADIS (RVS-Bouillon)
- XLD (Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar)⁶³
- RAMBACH®-Agar⁶⁴
- Objektträger-Agglutinations-Kit⁶⁵

Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon dient zur Anreicherung von Salmonellen aus Stuhl, Lebensmitteln und anderen Materialien.

Selenit hemmt das Wachstum coliformer Bakterien und Enterokokken in den ersten sechs bis zwölf Stunden nach Beginn der Bebrütung. Danach nimmt die Hemmwirkung langsam ab. Salmonellen, *Proteus* und *Pseudomonas* spp. werden dagegen kaum gehemmt. Der Mechanismus der toxischen Wirkung von Selen auf Bakterien ist noch nicht vollständig geklärt; es wird jedoch vermutet, dass Selen mit Schwefel- oder Sulfhydryl-Gruppen in den Zellen reagiert. *Proteus* und *Pseudomonas* spp. scheinen dagegen resistent zu sein. Laktose wird dem Nährboden als fermentierbarer Zucker zugesetzt, um ein Ansteigen des pH-Wertes während der Bebrütung zu vermeiden. Ein Anstieg des pH-Wertes würde die Selektivität des Selenits vermindern. Der Effekt des Cystins liegt in seinem Reduktionsvermögen, das die Toxizität des Selens für Bakterien vermindert. Auch kann der Schwefel im Cystin auf manche bakterielle Schwefelverbindungen schonend wirken und sie damit in gewisser Weise vor dem selektiven Effekt des Selenits schützen.

RVS-Bouillon ist ein selektives Anreicherungsmedium zum Nachweis von Salmonellen. Die Selektivität dieser Bouillon wurde durch das Hinzufügen einer hochkonzentrierten Magnesiumchlorverbindung, des Färbemittels Malachitgrün und des Senkens des pH-Wertes erreicht. Salmonellen sind gegen osmotischen Druck beständiger und in der Lage, in hypertonischen Lösungen zu wachsen. Das Wachstum der intestinalen Bakterien wird in den hypertonischen Lösungen gehemmt.

XLD ist kein Selektivmedium, es erlaubt aber die Prüfung der Xylose-Laktose- und Saccharosefermentation und zeigt die daraus gebildete Säure durch den Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot nach Gelb an. Thiosulfat und Eisen-(III)-Salz zeigen Schwefelwasserstoff-Bildung durch Ausfällung schwarzen Eisensulfids in den Kolonien an. Citrat und Desoxycholat hemmen die grampositive Begleitflora.

RAMBACH[®]-Agar ist ein differentialdiagnostischer Nährboden zum Nachweis von Salmonellen (mit Ausnahme von *Salmonella Typhi* und *Salmonella Paratyphi*). Natriumdesoxycholat bewirkt eine Hemmung der grampositiven Begleitflora. Salmonellen können durch die Zugabe von Propylenglycol zum RAMBACH[®]-Agar eindeutig von anderen Bakterien unterschieden werden.

Geräte

Folgende Geräte wurden benötigt:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| - Reagenzgläser | - elektronische Waage |
| - Reagenzglasständer | - Bunsenbrenner |
| - Pipette (1 ml) | - Bunsenbrenneranzünder |
| - Pipette (10 ml) | - Spatel |
| - Pipettenaufziehhilfe | - Inkubator (37 °C) |
| - Impfösen | - Inkubator (43 °C) |
| - Vortexer | - Objektträger |

Voranreicherung

10 g des zu untersuchenden Materials wurden mit 90 ml Trypton vermischt, um ein Endvolumen von 100 ml zu erhalten, und anschließend gut geschüttelt. Es wurden drei Verdünnungsreihen angelegt. Eine Verdünnungsreihe bestand wiederum aus jeweils drei Reagenzgläsern mit einem entsprechenden Volumen der Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon:

- erste Verdünnungsreihe: 3 x 90 ml Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon wurden mit 3 x 10 ml der Trypton-Bakteriensuspension beimpft
- zweite Verdünnungsreihe: 3 x 10 ml Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon wurden mit 3 x 1 ml der Trypton-Bakteriensuspension beimpft
- dritte Verdünnungsreihe: 3 x 10 ml Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon wurden mit 3 x 0,1 ml der Trypton-Bakteriensuspension beimpft

Im Anschluss daran wurden die so beimpften Proben 20-22 h bei 37 °C bebrütet.

Anreicherung

Die zweite Anreicherungsstufe erfolgte mit Überimpfung von 0,1 ml aus jeder Verdünnungsstufe aus der Voranreicherung in 10 ml RAPPAPORT-VASSILIADIS-Selektivbouillon. Nach der Überimpfung wurden die Proben bei 43 °C für 20-22 h bebrütet.

Gewinnung von Reinkulturen

Aus jeder Verdünnungsstufe der parallel angelegten Röhren wurden jeweils drei fraktioniert auf die bereitgelegten RAMBACH®- und XLD-Agarplatten ausgestrichen und anschließend 20-22 h bei 37 ° C bebrütet.

Morphologische und serologische Identifikation

97-99 % der Salmonellen bilden auf RAMBACH®-Agar rote kugelförmige Kolonien. Ausgenommen hiervon sind *Salmonella Paratyphi* A und *Salmonella Typhi*, diese wachsen auf RAMBACH®-Agar in farblosen Kolonien.

Zur serologischen Bestätigung der Salmonellen wurden die schwarzen Bakterienkolonien vom XLD-Agar sowie die rosafarbenen Kolonien vom RAMBACH®-Agar abgenommen und mittels Objektträgeragglutination serologisch identifiziert. Hierzu wurde die Agglutination mit O-Faktorseren durchgeführt.

Da in dem vorliegenden Protokoll kein spezieller Agar zur Subkultivierung genannt ist, wurde für die vorliegenden Untersuchungen Standard-I-Agar angewandt.

Auswertung der Ergebnisse

Zur Bestimmung der höchstwahrscheinlichsten Keimzahl von Salmonellen (MPN) wurde die Anzahl der positiven Röhren in den drei Verdünnungsstufen berücksichtigt. Die wahrscheinliche Keimzahl setzte sich aus drei Nummern zusammen:

- die erste Nummer entsprach der Anzahl von positiven Röhren für das höhere Impfvolumen (10 ml) in der ersten Verdünnungsstufe
- die zweite Nummer entsprach der Anzahl von positiven Röhren für das Mittelimpfvolumen (1 ml) in der zweiten Verdünnungsstufe
- die dritte Nummer entsprach der Anzahl von positiven Röhren für das niedrigste Impfvolumen (0,1 ml) in der dritten Verdünnungsstufe

Der zuverlässigste MPN-Wert ist dann zu erhalten, wenn etwa 50 % der Röhren positiv bzw. negativ sind.

Für die Auswertung der höchstwahrscheinlichsten Keimzahl von Salmonellen gilt die MPN-Tabelle von DE MAN (1983). Das ausgerechnete Ergebnis wurde als Nachweis von *Salmonella* spp. in 1 g/ml der Probe dargestellt.

3.2.1.4 Methode 2: Methode der Flüssiganreicherung in Peptonwasser in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium zur semiquantitativen Bestimmung der höchstwahrscheinlichsten Keimzahl von Salmonellen (MPN)

Diese Methode beschreibt ein Verfahren für den quantitativen Nachweis (MPN-Verfahren) von Salmonellen aus Klärschlamm und anderen organischen Abfällen.

Vorgehensweise

Der quantitative Nachweis von Salmonellen wurde in folgenden vier Schritten erbracht:

- 1) Kultivierung der Bakterien in einem nicht selektiven Voranreicherungsmedium
- 2) nachfolgende Anreicherung in einem Selektivmedium, in dem das Wachstum von anderen Mikroorganismen gehemmt und dadurch das Wachstum von Salmonellen gefördert wurde
- 3) Gewinnung von Reinkulturen durch das Ausstreichen auf einem Selektivagar
- 4) morphologische und serologische Identifikation

Materialien

Der Nachweis von Salmonellen erforderte folgende Materialien:

- 0,9 %ige Kochsalzlösung
- gepuffertes Peptonwasser
- *Salmonella*-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT u. VASSILIADIS (RVS-Bouillon)
- BPLS-Agar (Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar)⁶⁶
- XLD (Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar)
- Standard-I-Agar
- Objektträger-Agglutinations-Kit

Peptonwasser ist ein nicht selektives Medium und wurde verwendet, um subletal geschädigte Salmonellen zu reaktivieren.

BPLS ist ein Selektivagar zur Isolierung von Salmonellen (mit Ausnahme von *Salmonella Typhi*) aus klinischem und biologischem Material sowie aus Lebensmitteln und aus Umweltproben. Der Nährboden enthält Laktose, deren Abbau zu Säure durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot nach Gelb angezeigt wurde. Im basischen Bereich wies er eine tiefrote Farbe auf. Die grampositive Begleitflora wie auch *Salmonella Typhi* und *Shigella* spp. wurden durch Brilliantgrün weitgehend unterdrückt. Eine reichhaltigere Nährgrundlage ermöglichte jedoch ein besseres *Salmonella*-Wachstum. Ein gleichzeitig stärkeres Wachstum der Begleitflora wurde durch einen erhöhten

Brillantgrüngehalt weitgehend verhindert. Da Salmonellen weder Lactose noch Saccharose abzubauen vermögen, ermöglicht der Saccharosegehalt - im Gegensatz zum BPLS-Agar - das Erkennen der Lactose-schwach-positiven bzw. Laktose-schwach-negativen, jedoch Saccharose-positiven Begleitflora.

Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Reagenzgläser
- Reagenzglasständer
- Pipette (1 ml)
- Pipette (10 ml)
- Pipettenaufziehhilfe
- Impfösen
- Vortexer
- elektronische Waage
- Bunsenbrenner
- Bunsenbrenneranzünder
- Spatel
- Inkubator (37 °C)
- Inkubator (43 °C)
- Objektträger

Voranreicherung

20 g des zu untersuchenden Substrates wurden in 180 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung abgewogen und bei 4 °C für 24 h geschüttelt, womit die erste Verdünnungsstufe einer dekadischen Verdünnungsreihe angelegt war. Anschließend wurden aus jeder Verdünnungsstufe jeweils 3 x 1 ml in 3 x 9 ml gepuffertes Peptonwasser pipettiert, geschüttelt und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die Anzahl der weiteren Verdünnungsstufen variierte entsprechend der erwarteten Keimzahl des zu untersuchenden Materials.

Anreicherung

Zur Anreicherung von Salmonellen wurden aus den ausgewählten Verdünnungsstufen jeweils 3 x 0,1 ml in je 3 x 10 ml RVS-Bouillon überimpft. Die Röhrchen wurden, um eine homogene Verteilung der Bakterien zu erhalten, gut geschüttelt und 24 h bei 43 °C bebrütet.

Gewinnung von Reinkulturen

Zur Verifizierung des *Salmonella*-Nachweises wurde aus jeder zu untersuchenden Verdünnungsstufe die vorliegenden geteilten BPLS- und XLD-Agarplatten mit einem fraktionierten Ösenausstrich versehen und weitere 24 h bei 37 °C bebrütet.

Morphologische und serologische Identifikation

Salmonellen präsentieren sich auf BPLS-Agar in hellrosa-farbigen Kolonien. Die salmonellaverdächtigen Kolonien wurden abgenommen und auf Standard-I-Agar mit einem Dreiösenausstrich überimpft. Es erfolgte eine erneute 24-stündige Bebrütung bei 37 °C.

Gewachsene Kolonien wurden danach serologisch mit Hilfe der Objektträgeragglutination mit O-Faktorsereen identifiziert. Eine grobe oder feinflockige Agglutination deutete eine positive Reaktion an.

Auswertung der Ergebnisse

Mit Hilfe der DE MAN-Tabelle wurde das Ergebnis in 1 g bzw. 1 ml der Probe ermittelt.

3.2.1.5 Methode 3: Membranfiltrationsmethode zur quantitativen Miterfassung vorgeschädigter Salmonellen

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum quantitativen Nachweis bzw. zur Zählung einzelner Kolonien von Salmonellen auf einem geeigneten selektiven Nährboden.

Vorgehensweise

Die quantitative Miterfassung von Salmonellen wurde in folgenden Stufen erbracht:

- 1) Kultivierung der Salmonellen in einem selektiven Anreicherungsmedium
- 2) nachfolgende Kultivierung der Bakterien durch die Verwendung eines geeigneten Filters auf einem selektiven Agar
- 3) morphologisch-biochemisch-serologische Identifizierung von Salmonellen

Materialien

Der Nachweis von *Salmonella* spp. benötigte folgende Materialien:

- Phosphate Buffered Saline (PBS)⁶⁷
- steriles, destilliertes Wasser
- Tetrathionat⁶⁸
- Novobiocin⁶⁹
- Jod⁷⁰
- Whatman®-Glasfaser-Mikrofilter (47 mm)⁷¹
- Cellulose-Nitrat-Filter (0,45 µm)
- RAMBACH®-Agar
- C₈ Esterase-Lösung⁷²
- Agglutinationskit
- API 20-Test⁷³

Zur Isolierung von Salmonellen aus biologischen Materialien wurde für die selektive Anreicherung Tetrathionat-Bouillon-Basis verwendet. Tetrathionat-reduzierende Salmonellen wachsen in dieser Bouillon sehr gut, während viele andere *Enterobacteriaceae* gehemmt werden. Bakterien der Proteus-Gruppe reduzieren Tetrathionat ebenfalls, wurden aber durch den Zusatz von Novobiocin (40 µg/ml) gehemmt. Aus Thiosulfat entsteht durch den

Jodzusatz (20 ml/l) im Nährboden Tetrathionat, welches Coliforme und andere Darmbakterien im Wachstum unterdrückt.

Geräte

Folgende Geräte wurden benötigt:

- Reagenzgläser
- Reagenzglasständer
- Polycarbonat Filter-Halter
- Sterilfiltrationsgerät⁷⁴
- Zentrifugenröhrchen (50 ml)⁷⁵
- 6-fach Absaugvorrichtung⁷⁶
- Pinzette
- Pipettenaufziehhilfe
- Pipette (10 ml)
- Pipette (50 ml)
- Vortexer
- Bunsenbrenner
- Bunsenbrenneranzünder
- Inkubator (37 °C)
- Lichtmikroskop
- Pinzette
- sterile Petrischalen

Anreicherung

25 g des zu untersuchenden Materials wurden abgewogen und mit 225 ml PBS gemischt und homogenisiert. Aus dieser homogenen verdünnten Probe wurden danach 50 ml abpipettiert und in einem Zentrifugenröhrchen für 1 min zentrifugiert (300 x g). Mit einer sterilen Pipette wurde der Überstand abpipettiert und mittels einem Whatman[®]-Glasfaser-Mikrofilter im Polycarbonat Filter-Halter aseptisch filtriert. 10 ml des Überstandes wurden anschließend mit 90 ml sterilem, destilliertem Wasser in einem 100 ml Glaskolben verdünnt. Damit war die erste Verdünnungsstufe angelegt. Nach dem gründlichen Schütteln wurden aus der ersten Verdünnungsstufe 10 ml des Filtrats entnommen und erneut in 90 ml destilliertes Wasser eingemischt. Die oben beschriebenen Verdünnungen wurden solange durchgeführt, bis die relevante Verdünnungsstufe erreicht war (in der vorliegenden Arbeit je nach Konzentration bis maximal 10^{-3}). Die Anzahl der Verdünnungen variiert entsprechend dem vorausgesetzten Salmonellenkontaminationsgrad des zu untersuchenden Materials. Die Verdünnungsstufen von 10^{-1} - 10^{-3} ermöglichen normalerweise die Anzahl der gewachsenen Kolonien von einem Kontaminationsgrad bis zu 10^5 KBE/ml. Höhere Salmonellenkonzentrationsgrade erfordern somit zusätzliche Verdünnungen des Filtrats.

Aus jeder Verdünnungsstufe wurden danach 10 ml mit je einer sterilen Pipette entnommen und durch den Cellulose-Nitrat-Filter mit Hilfe einer 6-fach Absaugvorrichtung filtriert. Der Cellulose-Nitrat-Filter wurde danach mit einer sterilen Pinzette entnommen und auf den sich in einer Petrischale befindenden und mit Tetrathionat gesättigten Whatman[®]-Glasfaser-Mikrofilter aufgelegt. Hierbei ist wichtig, dass keine Luftblasen zwischen den beiden Filtern entstehen. Die Proben wurden anschließend bei 37 °C für 20-22 h inkubiert.

Kultivierung der Bakterien

Nach der Bebrütungszeit wurde der Cellulose-Nitrat-Filter mittels steriler Pinzette von dem mit Tetrathionat imprägnierten Whatman[®]-Glasfaser-Mikrofilter entfernt und auf einen RAMBACH[®]-Agar aufgelegt. Im Anschluss wurden die RAMBACH[®]-Platten bei 37 °C für 24-48 h inkubiert. Es folgte mit Hilfe eines Stereolichtmikroskops die Auszählung der gewachsenen roten Kolonien. Mutmaßliche positive Kolonien können durch Besprühen des RAMBACH[®]-Agars mit 1 mg/ml 4-Methylumbelliferyl-Caprylate (C₈ Esterase-Lösung) bestätigt werden (MUCAP-Test). Die Bestätigung besteht in einer Fluoreszenz der *Salmonella*-Kolonien.

Weitere Bestätigungen können serologisch (O-Agglutination) oder biochemisch mit API 20 E-Test durchgeführt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine serologische Identifizierung der präsumptiven *Salmonella*-Kolonien durchgeführt.

Auswertung der Ergebnisse

Die Anzahl der Salmonellen pro g Feucht- oder Trockensubstanz kann mit Hilfe zweier Formeln errechnet werden, wobei in der vorliegenden Arbeit für die Auswertung der erzielten Ergebnisse die Formel 1 verwendet wurde.

Formel 1:

$$c = \frac{an}{bd}$$

- c:** Ausgangskonzentration von Salmonellen **b:** Verdünnungsfaktor der Verdünnungsstufe
a: filtriertes Volumen **d:** Anzahl der Kolonien auf der Membran
n: ursprünglicher Verdünnungsfaktor in PBS

Formel 2:

$$c = \frac{an}{bde} \times 100$$

- e:** Trockensubstanz

3.2.1.6 Methode 4: Methode der Flüssiganreicherung in Peptonwasser mit Novobiocin in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Medium zum qualitativen Nachweis des Vorkommens bzw. der Freiheit von Salmonellen in einer definierten Probenmenge

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum qualitativen Nachweis bzw. zur Prüfung auf Vorhandensein von Salmonellen in biologischem Material.

Die Vorgehensweise sowie Materialien und Geräte zum qualitativen Nachweis von Salmonellen sind unter Pkt. 3.2.1.4 beschrieben. Im Vergleich zum quantitativen Nachweis von *Salmonella* spp. (Methode 2) wurde hier die Voranreicherungsbouillon mit einer antibiotischen Ergänzung (Novobiocin) angewendet. 1 g Novobiocin wurde in 10 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst und durch Membranfilter (Porengröße 0,2 µm)⁷⁷ in ein steriles Reagenzglas filtriert. Aus dieser Suspension wurden danach 180 µl entnommen und mit 450 ml gepuffertem Peptonwasser nach der Sterilisation gemischt.

Voranreicherung

Zur Voranreicherung wurden 50 g der zu untersuchenden Probe in 450 ml gepuffertem Peptonwasser mit Novobiocin abgewogen und bei 37 °C unter ständigem Schütteln für 18-22 h bebrütet.

Anreicherung

Zur Anreicherung von *Salmonella* spp. wurde aus dem bebrüteten Peptonwasser 0,1 ml aus der Voranreicherung in 10 ml RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon überführt. Parallel dazu erfolgte die zweite Überimpfung von 0,1 ml aus der Voranreicherung in 10 ml RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon. Die auf diese Weise beimpften Proben wurden parallel bei 37 °C und 43 °C für 20-22 h inkubiert.

Gewinnung von Reinkulturen

Das bebrütete Selektivanreicherungsmedium wurde je mit zwei Drei-Ösenausstrichen auf die vorliegenden BPLS- und XLD-Agarplatten aufgebracht und bei 37 °C für 20-22 h weiter bebrütet.

Morphologische und serologische Identifikation

Verdächtige schwarze Bakterienkolonien vom XLD-Agar sowie hellrosafarbene Kolonien vom BPLS-Agar wurden mit einem Drei-Ösenaustrich auf Nähragar⁷⁸ aufgebracht und anschließend bei 37 °C für 20-22 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien mittels Objektträgeragglutination serologisch identifiziert. Es wurden O-Faktorseren verwendet.

Auswertung der Ergebnisse

Das Ergebnis wurde als positiver oder negativer Nachweis von *Salmonella* spp. in 50 g der Probe angegeben.

3.2.2 Untersuchungen auf *Escherichia coli*

Zum Nachweis von *Escherichia coli* aus biologischem Material wurden ebenfalls von der CT/308 Arbeitsgruppe „Charakterisierung von Schlämmen“ zwei vorgeschlagene Entwürfe der Nachweismethoden validiert (ANON. 2002b). Es handelte sich um zwei semiquantitative Methoden (Makro- und Mikromethode) zur Quantifizierung von *Escherichia coli*.

Das Ziel dieser Untersuchungen lag in einem Vergleich der Effizienz beider Methoden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Minimum- Maximum- und Medianwerte von *Escherichia coli* in verschiedenen biologischen Substraten ermittelt. Die Ergebnisse (siehe 4.5.3) wie auch das Verfahren der jeweiligen Methoden sollen eine Aussage treffen, welche Methode für den Nachweis von *Escherichia coli* geeigneter ist.

In einem Durchgangversuch wurden folgende vier Substrate untersucht:

Substrat:	Anzahl der untersuchten Proben:
Bioabfall	30
Rindergülle	30
Speiseabfälle	30
Klärschlamm	30

Insgesamt wurden 120 Proben untersucht.

3.2.2.1 Darstellung der Ergebnisse

Bei den *Escherichia coli*-Untersuchungen wurden aus den ermittelten Einzelwerten die Minimum-, Maximum- und Medianwerte dargestellt, wobei für die grafische Darstellung nur die Medianwerte verwendet wurden.

Die detaillierten Werte der *Escherichia coli*-Untersuchungen sind im Anhang in den Tabellen A 31 bis A 32 aufgeführt.

3.2.2.2 Quantitativer Nachweis zur Ermittlung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ (MPN) von *Escherichia coli* aus biologischem Substrat (Makromethode)

Diese Methode beschreibt ein Verfahren für den quantitativen Nachweis von *Escherichia coli* aus biologischen Substraten.

Vorgehensweise

Der Nachweis von *Escherichia coli* erfolgte in folgenden zwei Stufen:

- 1) Anreicherung in einem selektiven Medium
- 2) Ablesen des biochemischen Verhaltens

Materialien

Der Nachweis von *Escherichia coli* benötigte folgende Materialien:

- 0,9 %ige Kochsalzlösung
- Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon⁷⁹
- NaOH (1 M)
- KOVACS-Indolreagenz⁸⁰

Geräte

Folgende Geräte wurden benötigt:

- Reagenzgläser
- Gärröhrchen nach DURHAM
- Reagenzglasständer
- Pipette (10 ml)
- Pipettenaufziehhilfe
- Vortexer
- elektronische Waage
- Inkubator (44 °C)
- UV Lampe (366 nm)

Anreicherung

20 g des zu untersuchenden Substrates wurden in 180 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung abgewogen und bei 4 °C für 24 h geschüttelt. Aus der Lösung wurde 1 ml in 9 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung überführt, womit die erste Verdünnungsstufe einer dekadischen Verdünnungsreihe angelegt worden war. Die Anzahl der Verdünnungsstufen variierte entsprechend der erwarteten Keimkonzentration. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde danach 3 x 1 ml der Suspension in die drei parallel angelegten 9 ml Fluorocult-Laurylsulfat-Bouillon-Röhrchen überimpft. Um eine Gasbildung nachzuweisen, waren in den Reagenzgläsern DURHAM-Gärröhrchen eingebracht. Es erfolgte eine Inkubation bei 44 °C für eine Zeitspanne von 24-48 h.

AbleSEN des biochemischen Verhaltens

Der Nachweis von *Escherichia coli* setzt die folgenden drei biochemischen Reaktionen voraus:

- Gasbildung
- Fluoreszenz
- Indolbildung

Escherichia coli vergärt Lactose zu Säure und Gas. Als gasförmige Produkte bei der Lactose-Gärung treten bei *Escherichia coli* Wasserstoff und Kohlenstoff auf. Bei den positiven Proberöhrchen sammelt sich das Gas in den DURHAM-Röhrchen, so dass dieses aufsteigen kann.

Escherichia coli besitzt das Enzym β -D-Glucuronidase, welches einen sicheren Indikator für die Anwesenheit von *Escherichia coli* darstellt. Das Enzym 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) wird von β -D-Glucuronidase in die Glucuronsäure und in das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon gespalten. Die blaue Fluoreszenz zeigt sich unter alkalischen Bedingungen im UV-Licht bei 366 nm Wellenlänge. Um ein alkalisches Medium zu erreichen, wurden in jedes gaspositive Reagenzglas 0,5 ml NaOH hinzugegeben.

Zur Bestätigung des positiven Befundes wurden die gas- und fluoreszenzpositiven Glasröhrchen ca. 5 mm hoch mit KOVACS-Indolreagenz überschichtet. Positive Indol-Reaktionen zeigten eine kirschrote Färbung an der Suspensionsoberfläche, die 1-2 min nach der Zugabe sichtbar war.

Auswertung der Ergebnisse

Escherichia coli ist nachgewiesen, wenn die drei oben genannten Kriterien erfüllt sind. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der DE MAN-Tabelle ausgewertet und auf 1 ml bzw. 1 g der Probe umgerechnet.

3.2.2.3 Quantitativer Nachweis zur Ermittlung den „wahrscheinlichsten Keimzahl“ (MPN) von *Escherichia coli* aus biologischem Substrat (Mikromethode)

Diese Methode basiert auf ISO 9308-3 (ANON. 1998b) und beschreibt ein Verfahren für den quantitativen Nachweis von *Escherichia coli*.

Vorgehensweise

Das Miniaturverfahren zur Zählung von *Escherichia coli* erfolgt in folgenden zwei Stufen:

- 1) Anreicherung in einem selektiven Medium
- 2) Ablesen des biochemischen Verhaltens

Materialien

Zum Nachweis von *Escherichia coli* werden folgende Materialien benötigt:

- Tryptonlösung
- Spezielle Verdünnungslösung (22,5 g von synthetischem Meersalz, 10 ml Bromphenolblau in 1.000 ml dest. H₂O)
- BIO-RAD-Kit⁸¹

Geräte

Folgende Geräte werden benötigt:

- Reagenzgläser
- Reagenzglasständer
- Mehrkanalpipettus⁸²
- Pipette (10 ml)
- Pipettenaufziehhilfe
- Vortexer
- elektronische Waage
- Inkubator (44 °C)
- UV Lampe (366 nm)

Anreicherung

10 g des zu untersuchenden Materials wurde mit 90 ml Tryptonlösung gemischt und gut geschüttelt. Mit einer sterilen Pipette wurden 9 ml aus dieser Lösung entnommen und in das erste Reagenzglas mit 9 ml Verdünnungslösung überführt. Aus dieser Verdünnung wurde anschließend mit einer neuen sterilen Pipette 1 ml in das zweite Reagenzglas überführt. Die Anzahl der Verdünnungsstufen zum Animpfen variierte entsprechend des vermuteten Kontaminationsgrades des zu untersuchenden Materials (1/2 bis 1/200 000).

Der Inhalt des ersten Reagenzglases der Verdünnungsreihe wurde in eine leere, sterile Petrischale mit einem Durchmesser von 90 mm überführt. Für diese erste Verdünnungsstufe wurden im Anschluss mit Hilfe einer Mehrkanalpipette mit acht sterilen Spitzen 200 µl in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte verteilt. Für die nachfolgenden Verdünnungsstufen wurde in gleicher Weise verfahren, wobei zwischen jedem Verdünnungsschritt sowohl die Petrischale als auch die acht sterilen Spitzen gewechselt wurden.

Nach dem Animpfen wurden die Mikrotiterplatten bei einer Temperatur von 44 °C über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Jede Mikrotiterplatte wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und nach der Inkubation unter UV-Lampe untersucht.

Das Verfahren basiert auf dem Nachweis des bei *Escherichia coli* vorhandenen Enzyms β-Glucuronidase. Bei dem Trockensubstrat in den 96 Vertiefungen jeder Mikrotiterplatte handelt sich um MUG (4-Methyl-umbelliferyl-β-D-Glucuronid).

Ablezen des biochemischen Verhaltens

Vertiefungen, in denen nach Inkubation bei 44 °C ein Wachstum erkennbar war und die unter UV-Licht blau fluoreszierten, galten als positiv.

Auswertung der Ergebnisse

Für jede gewählte Verdünnungsstufe wurde die Anzahl der positiven Vertiefungen notiert, mit Hilfe der statistischen Tabelle (ANON. 2002b) ausgewertet und als Nachweis von *Escherichia coli* in 1 g bzw. ml Probe dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Bakteriologische Keimträger-Untersuchungen im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.1.1 Temperaturverlauf der Hygienisierung

Die gemessenen Temperaturverläufe in den fünf durchgeführten Hygienisierungsversuchen sind in der Abb.6 grafisch dargestellt. Die Hygienisierung von Speiseabfällen beginnt bei 70 °C und dauert 30 min. Eine Reduktion der in den Hygienisierungsbehälter eingebrachten Testbakterien ist auch bei niedrigeren Temperaturen zu erwarten. Aus diesem Grund wurden die beimpften Keimträger Typ 1 („Volumenkeimträger“) bei 50 °C, 60 °C und 70 °C während der Aufheizphase aus dem Hygienisierungsbehälter entnommen. Die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Erhitzung des Substrates und dem Beginn der eigentlichen Hygienisierung lag zwischen 57 min (Versuch 2) und 79 min (Versuch 3). 50 °C wurden nach einer Zeit von minimal 14 min erreicht (Versuch 2), während die maximale Zeit bei 24 min registriert wurde (Versuche 3 und 5). Das Erreichen von 60 °C wurde in einer Zeitspanne von Minimum 27 min (Versuch 2) bis Maximum 38 min (Versuch 3) festgestellt. Die letzten Zeitpunkte der Probenentnahme (am Ende der Hygienisierung) wurden zwischen 90 min (Versuch 2) und 108 min (Versuch 3) bestimmt. Die Zeitdauer der Hygienisierung bei den fünf durchgeführten Versuchen variierte zwischen minimal 29 min (Versuch 3) und maximal 33 min (Versuch 2).

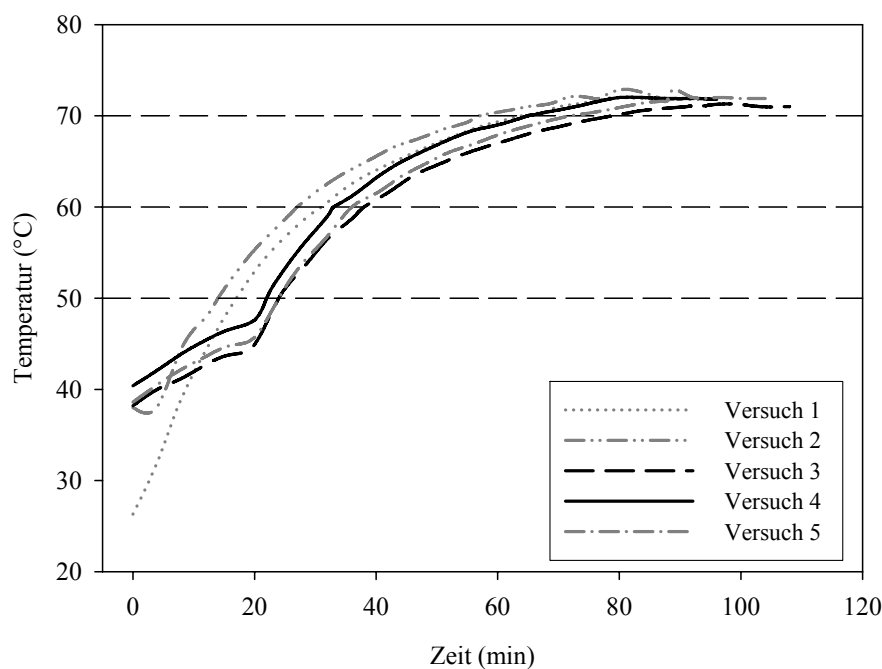


Abb. 6: Temperaturverlauf während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter

4.1.2 Einwirkungsdauer der Temperatur während der Hygienisierung

Das Säulendiagramm in Abb. 7 zeigt eine Übersicht über die Zeit- bzw. Einwirkungsdauer der physikalischen Einflüsse auf die Testbakterien zwischen den fünf Probenentnahmen vor und während des Hygienisierungsprozesses.

Die dargestellten Ergebnisse wurden aus den Mittelwerten der fünf unabhängigen Versuche evaluiert.

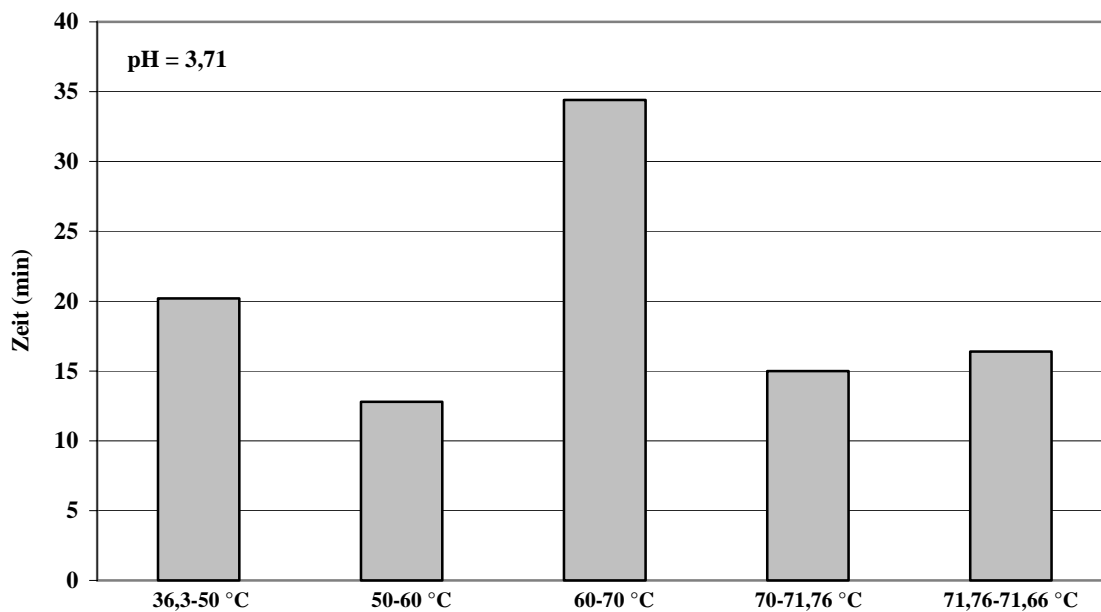


Abb. 7: Grafische Darstellung der Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenahmen im Hygienisierungsbehälter

Der Temperaturmittelwert der vorerwärmten Speiseabfälle aller Versuche betrug 36,3 °C. Die erste Probenentnahme erfolgte bei 50 °C, die nach 20,2 min erreicht worden war. Die zweite Probeentnahmetemperatur von 60 °C wurde bereits nach weiteren 12,8 min erreicht, dem kürzesten Zeitintervall aller fünf Probenentnahmen. Bis zum Erreichen von 70 °C wurden 34,4 min benötigt. 15 min nach Erreichen von 70 °C wurde eine weitere Probe entnommen, deren Temperaturmittelwert 71,76 °C betrug. Bis zum Ende der Hygienisierung nach durchschnittlich 16,4 min wurde noch ein Temperaturmittelwert von 71,66 °C ermittelt.

Die pH-Werte der fünf durchgeführten Versuche lagen zwischen minimal 3,4 und maximal 4,1, wobei der durchschnittliche pH-Wert 3,7 betrug.

4.1.3 Inaktivierung von *Listeria monocytogenes*

In Abb. 8 wird der zeitliche Verlauf der Inaktivierung von *Listeria monocytogenes* dargestellt. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 1 im Anhang zu entnehmen.

Die durch das MPN-Verfahren bestimmte Ausgangskeimzahl von *Listeria monocytogenes* lag durchschnittlich bei den Nullproben bei $4,3 \times 10^8$ KBE/ml. Nach Erreichen von $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde für die Dauer von 20,2 min eine Keimreduktion von 1/2 Zehnerpotenz ($9,3 \times 10^7$ KBE/ml) ermittelt. Bei der zweiten Probenentnahme bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Zahl um eine weitere Zehnerpotenz reduziert und der ermittelte Medianwert betrug $9,3 \times 10^6$ KBE/ml. Eine deutliche Keimreduktion um mehr als sechs Zehnerpotenzen wurde nach Erreichen von $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, dem Beginn der eigentlichen Hygienisierung, festgestellt bzw. die Quantifizierung des ausgewählten Testkeimes war nicht mehr möglich. Weiterhin konnte *Listeria monocytogenes* bei der vierten und fünften Probenentnahme, die bei $71,76\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $71,66\text{ }^{\circ}\text{C}$ stattfand, nicht mehr nachgewiesen werden.

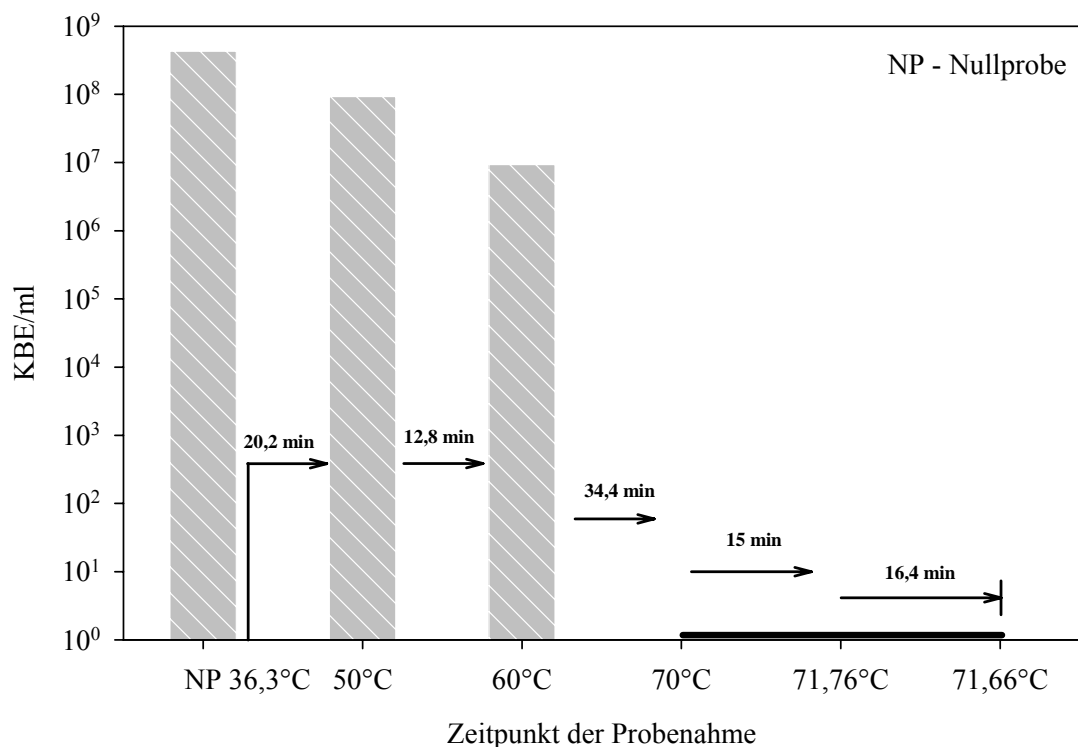


Abb. 8: Inaktivierung von *Listeria monocytogenes* während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.1.4 Inaktivierung von *Yersinia enterocolitica*

Das Säulendiagramm in Abb. 9 zeigt eine grafische Darstellung der Keimzahlreduktion von *Yersinia enterocolitica* während der Erhitzung des Materials. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 1 im Anhang ersichtlich.

Die durchschnittliche Ausgangskeimzahl von *Yersinia enterocolitica* lag bei $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Wie aus Abbildung 9 zu ersehen ist, zeigt die Keimzahl von *Yersinia enterocolitica* bei der ersten Probeentnahme, die bei 50 °C stattfand, eine Reduktion um eine Zehnerpotenz ($2,3 \times 10^7$ KBE/ml). Die ermittelte Anzahl an *Yersinia enterocolitica* bei der zweiten Probenentnahme bei 60 °C, die nach einer Zeitdauer von 12,8 min erfolgte, hatte sich um zwei Zehnerpotenzen reduziert und betrug $9,3 \times 10^5$ KBE/ml. Der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* war bei den folgenden drei Probenentnahmen bei 70 °C, 71,76 °C und 71,66 °C nicht mehr möglich.

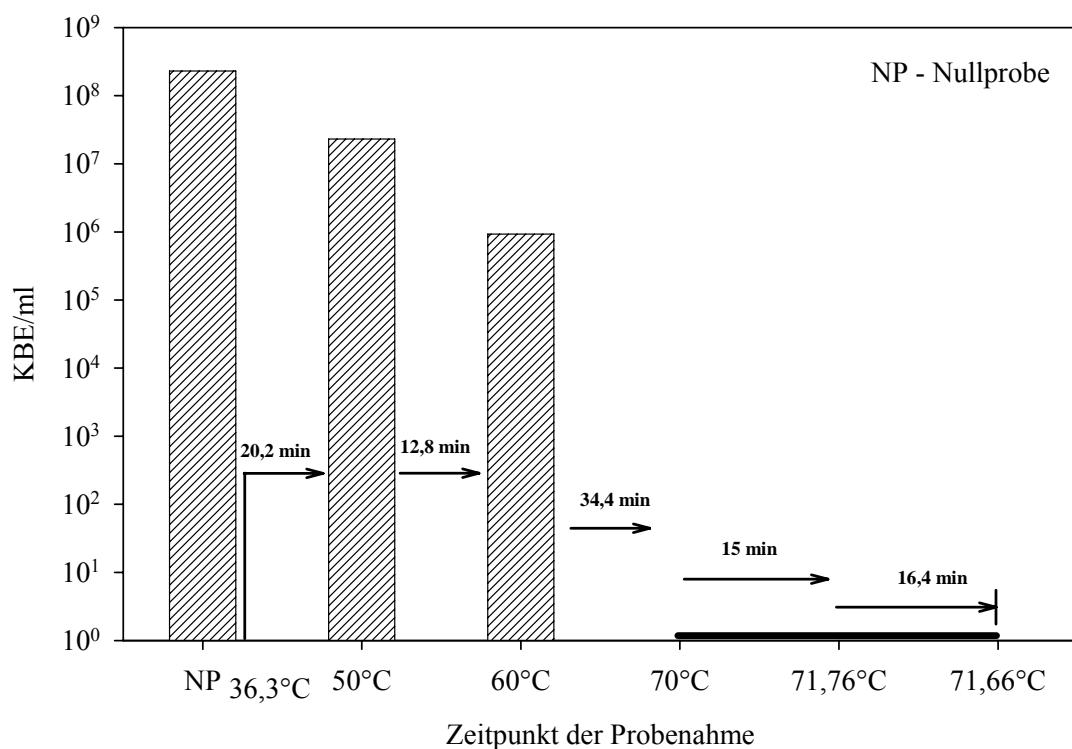


Abb. 9: Inaktivierung von *Yersinia enterocolitica* während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.1.5 Inaktivierung von *Salmonella Senftenberg* W 775

Das Säulendiagramm in Abb. 10 stellt die Reduktion von *Salmonella Senftenberg* W 775 während der Hygienisierung dar. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 1 im Anhang zu entnehmen.

Bis zur ersten Probenentnahme bei 50 °C nahm die Anzahl an *Salmonella Senftenberg* W 775 von $2,3 \times 10^9$ KBE/ml in der Nullprobe nicht ab. Zwischen der ersten und der zweiten Probenentnahme, nahm die Konzentration der Keime von $2,3 \times 10^9$ auf $4,3 \times 10^8$ KBE/ml ab. Bei der dritten, vierten und fünften Probenentnahme, die bei 70 °C, 71,76 °C und 71,66 °C stattfand, lag der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W 775 aus dem beimpften Substrat der Keimträger Typ 1 unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml.

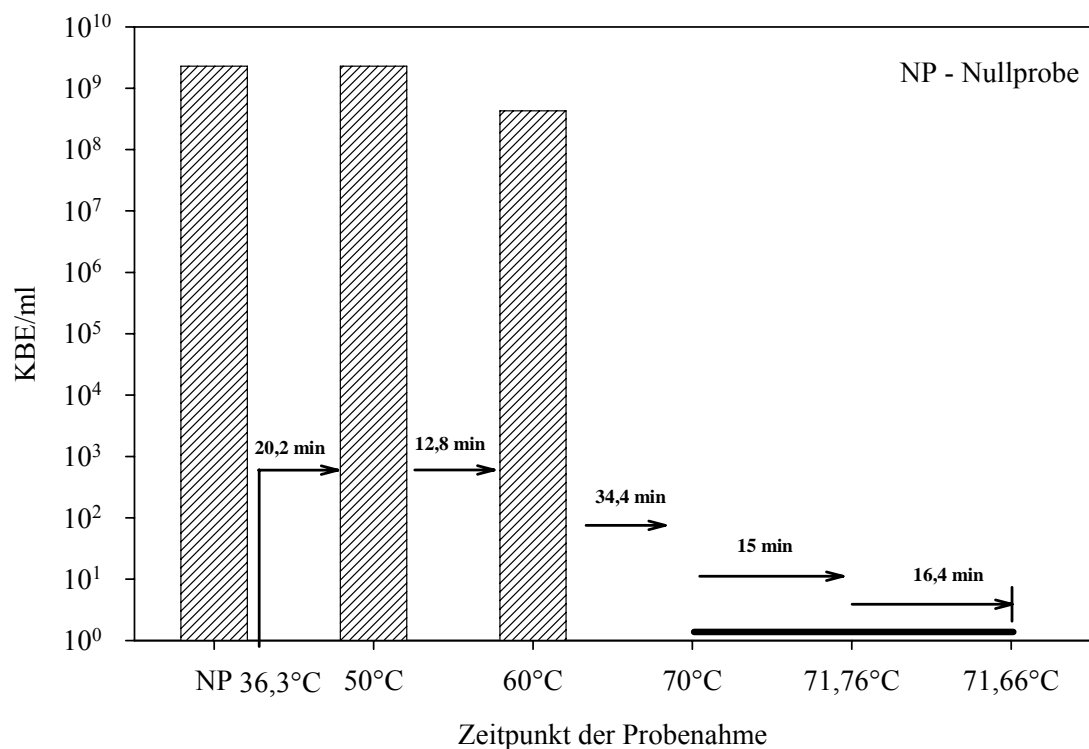


Abb. 10: Inaktivierung von *Salmonella Senftenberg* W 775 während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.1.6 Inaktivierung von *Escherichia coli*

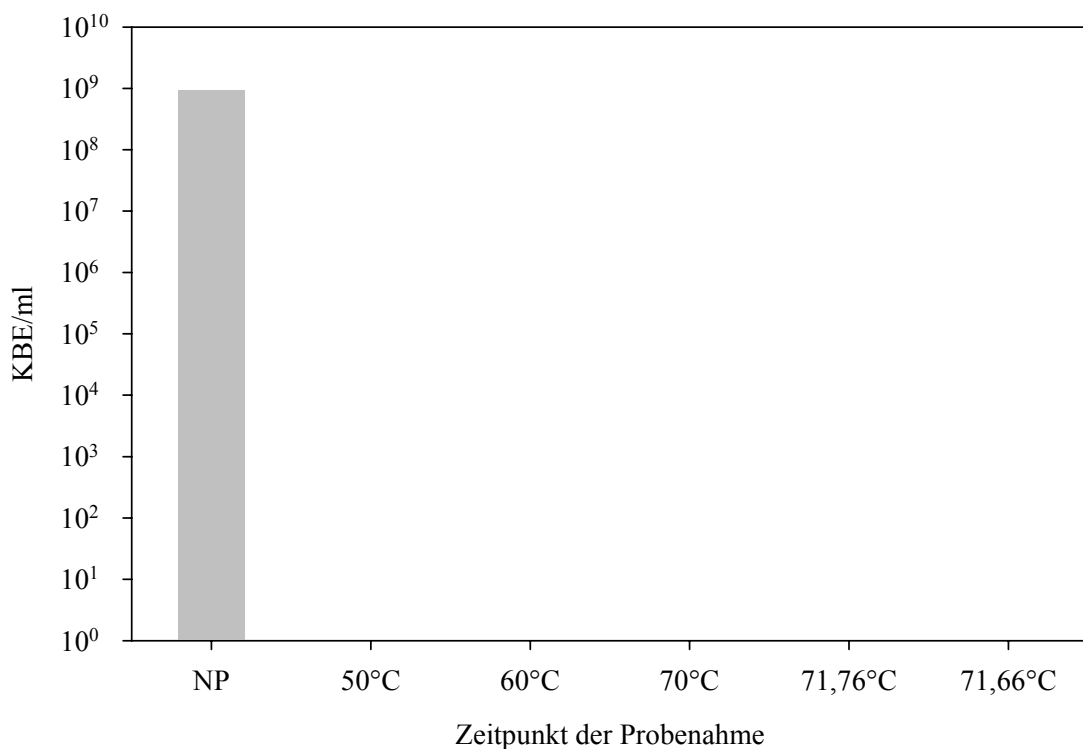
Das Säulendiagramm in Abb. 11 zeigt die Inaktivierung von *Escherichia coli* während der Hygienisierung. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 1 im Anhang zu entnehmen.

Die durchschnittlich ermittelte Ausgangskonzentration an *Escherichia coli* der fünf mitgeführten Nullproben lag bei $9,3 \times 10^8$ KBE/ml.

Escherichia coli wurde bis zur ersten Probenentnahme bei 50 °C nach 20,2 min, um eine Zehnerpotenz reduziert. Nach weiteren 12,8 min war eine Temperatur von 60 °C erreicht, bei der eine Abnahme um ca. eine Zehnerpotenz ($9,2 \times 10^6$ KBE/ml) nachgewiesen werden konnte.

Nach 34,4 min war eine Temperatur 70 °C erreicht, bei der eine deutliche Keimzahlreduktion von sieben Zehnerpotenzen festgestellt werden konnte.

Die Medianwerte der vierten und fünften Probenentnahme lagen unter der Nachweisgrenze von 10^1 /ml Substrat, d. h. der Nachweis von *Escherichia coli* war nicht mehr möglich.



4.1.7 Inaktivierung von *Campylobacter jejuni*

In Abb. 12 sind die Ergebnisse der Inaktivierung von *Campylobacter jejuni* grafisch dargestellt. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 1 im Anhang ersichtlich.

Die Konzentration von *Campylobacter jejuni* in der Nullprobe betrug $4,3 \times 10^7$ KBE/ml Substrat. Die erste Probenentnahme erfolgte nach 20,2 min, bei der eine Abnahme der Konzentration von *Campylobacter jejuni* auf $4,3 \times 10^6$ KBE/ml Substrat festgestellt werden konnte.

Bis zur nächsten Probenentnahme nach 12,8 min fand eine weitere Keimreduktion um eine Zehnerpotenz statt ($4,3 \times 10^5$ KBE/ml).

Nach Erreichen von 70 °C sowie bei den zwei folgenden Probenentnahme bei 71,76 °C und 71,66 °C waren alle Proben negativ.

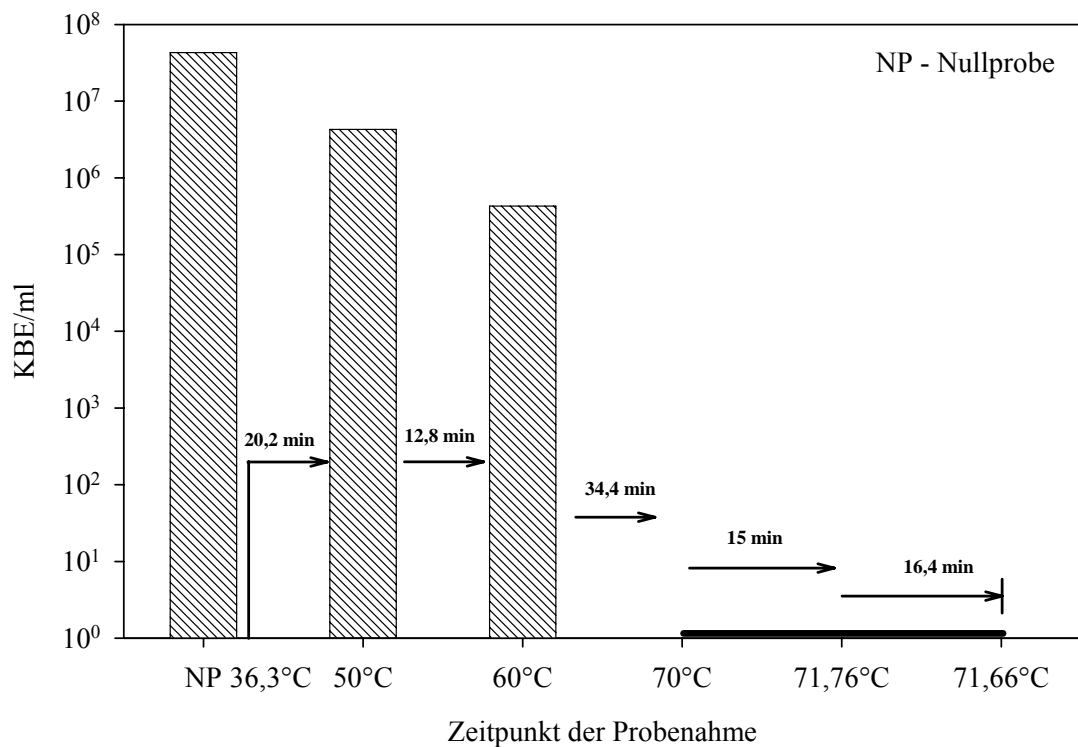


Abb. 12: Inaktivierung von *Campylobacter jejuni* während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.1.8 Inaktivierung von *Enterococcus faecalis*

Das Säulendiagramm in Abb. 13 stellt die Keimzahlreduktion von *Enterococcus faecalis* während der Hygienisierung dar. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 1 im Anhang zu entnehmen.

Der Medianwert der Konzentration an *Enterococcus faecalis* in der Nullprobe betrug $9,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Während der 20,2 min dauernden Temperaturerhöhung auf 50 °C, dem ersten Zeitpunkt der Entnahme, hat sich die Zahl der Keime nur geringfügig verändert. Auch nach Erreichen von 60 °C wurde keine Keimzahlreduktion nachgewiesen. Bei drei von fünf durchgeführten Versuchen war der Nachweis von *Enterococcus faecalis* am Beginn der eigentlichen Hygienisierung immer noch möglich und betrug $3,6 \times 10^0$ KBE/ml. Bei der vierten und fünften Probeentnahme, die bei 71,76 °C und 71,66 °C stattfand, war die Quantifizierung von *Enterococcus faecalis* nicht mehr möglich.

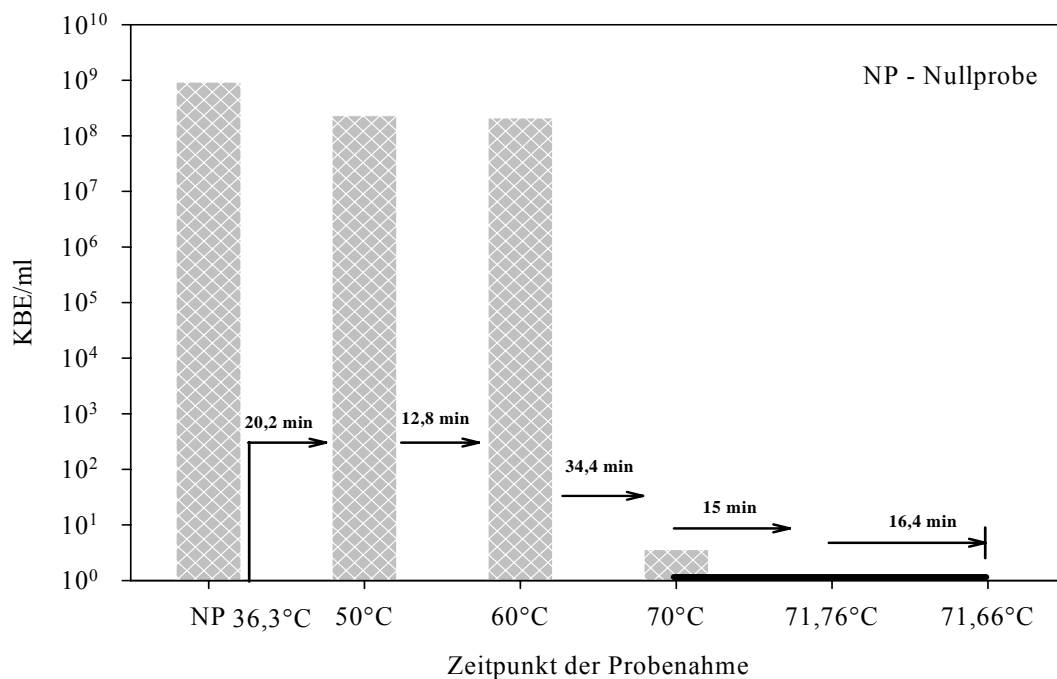


Abb. 13: Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsreaktor der Biogasanlage

4.1.9 Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Testbakterien

Wie aus Abb. 14 zu ersehen ist, waren schon zu Beginn der eigentlichen Hygienisierung alle untersuchten Testkeime, mit Ausnahme von *Enterococcus faecalis*, nicht mehr nachweisbar.

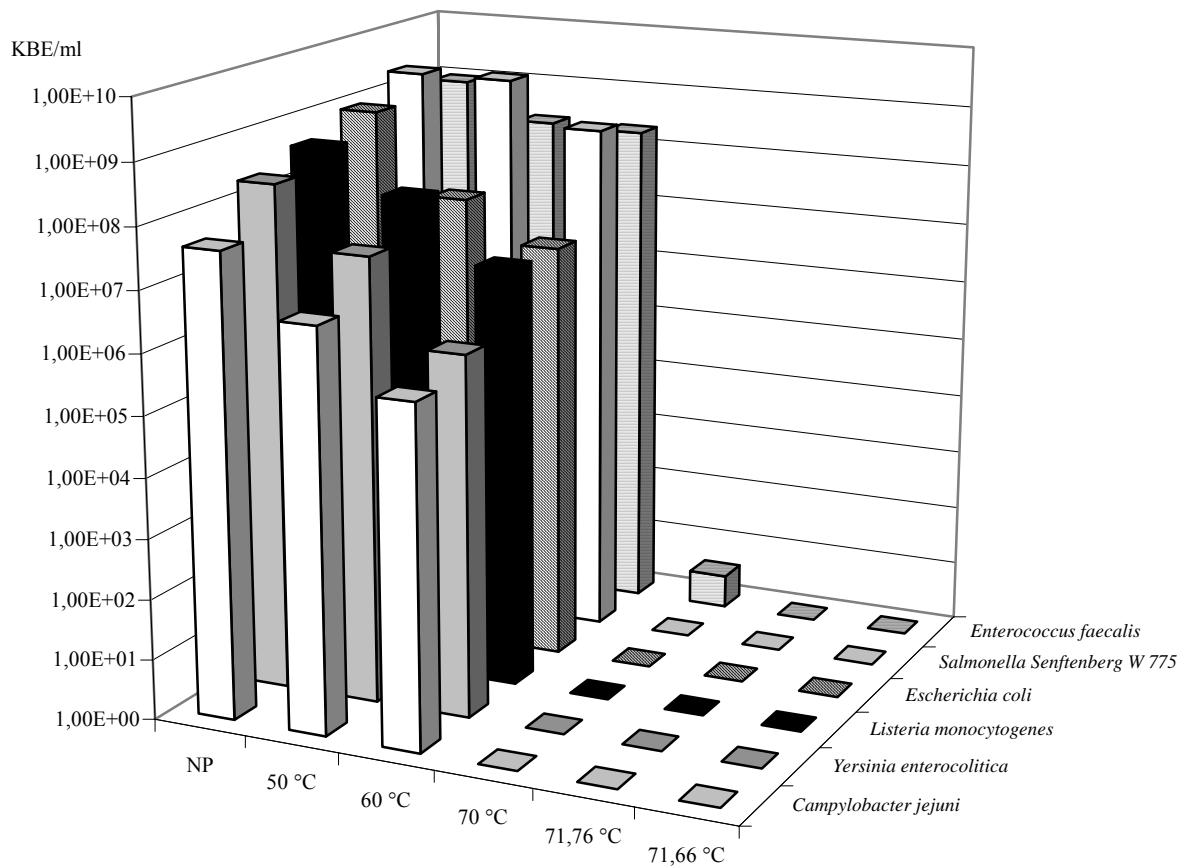


Abb. 14: Inaktivierung von verschiedenen Testbakterien während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.2 Virologische Keimträger-Untersuchungen im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.2.1 Temperaturverlauf der Hygienisierung

In Abb. 15 werden die Temperaturverläufe im Hygienisierungsbehälter bei den einzelnen Versuchen grafisch dargestellt.

Die Aufheizphase, d. h. bis zum Erreichen der Temperaturmarke von 70 °C, dauerte mindestens 72 min und längstens 98 min. Zeitpunkt der ersten Probenahme (50 °C) wurde nach minimal 24 min bzw. maximal 29 min erreicht. Die zweite Probenahme, die bei Erreichen von 60 °C stattfand, wurde zwischen minimal 32 min und maximal 45 min durchgeführt.

Die vierte Probenahme wurde 15 min nach dem Beginn der Hygienisierung d. h. ab dem Erreichen von 70 °C, durchgeführt. Am Ende des Hygienisierungsprozesses nach Minimum 104 min (Versuch 1) und Maximum 127 min (Versuch 2) fand die letzte Probenahme statt.

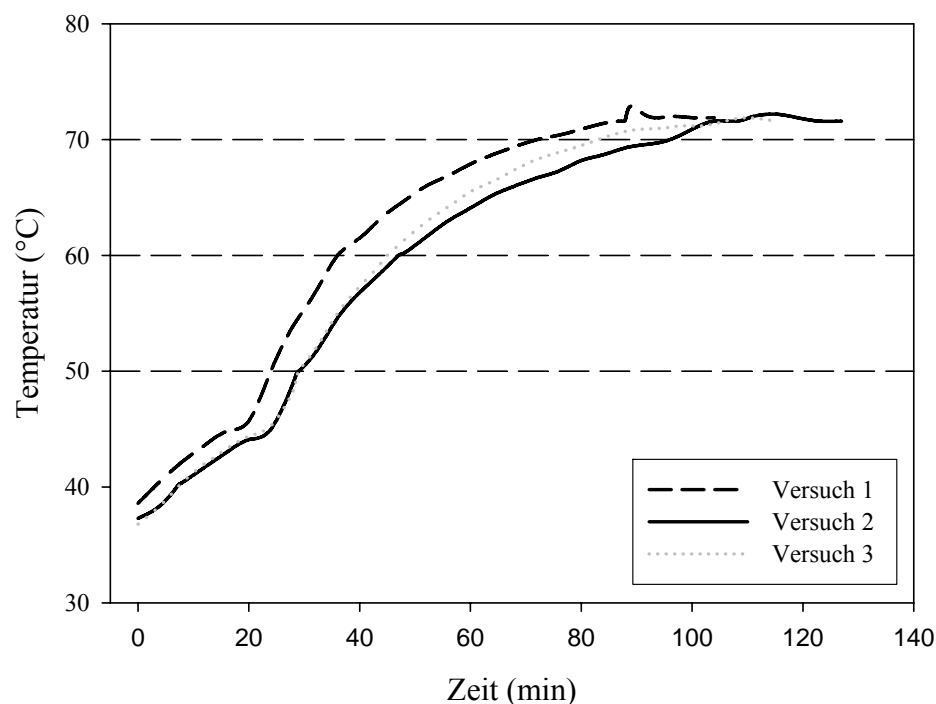


Abb. 15: Temperaturverlauf während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.2.2 Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenentnahmen

Die Probenentnahmen wurden bei 50 °C, 60 °C, 70 °C und 15 min nach Beginn sowie am Ende der Hygienisierung entsprechend den Ausführungen in Pkt. 3.2.1.1 durchgeführt.

Die folgende Abb. 16 stellt eine Übersicht über die Zeit bzw. Einwirkungsdauer der Temperatur auf alle drei Testviren zwischen den fünf Probenentnahmen dar.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte der drei unabhängigen Versuchen.

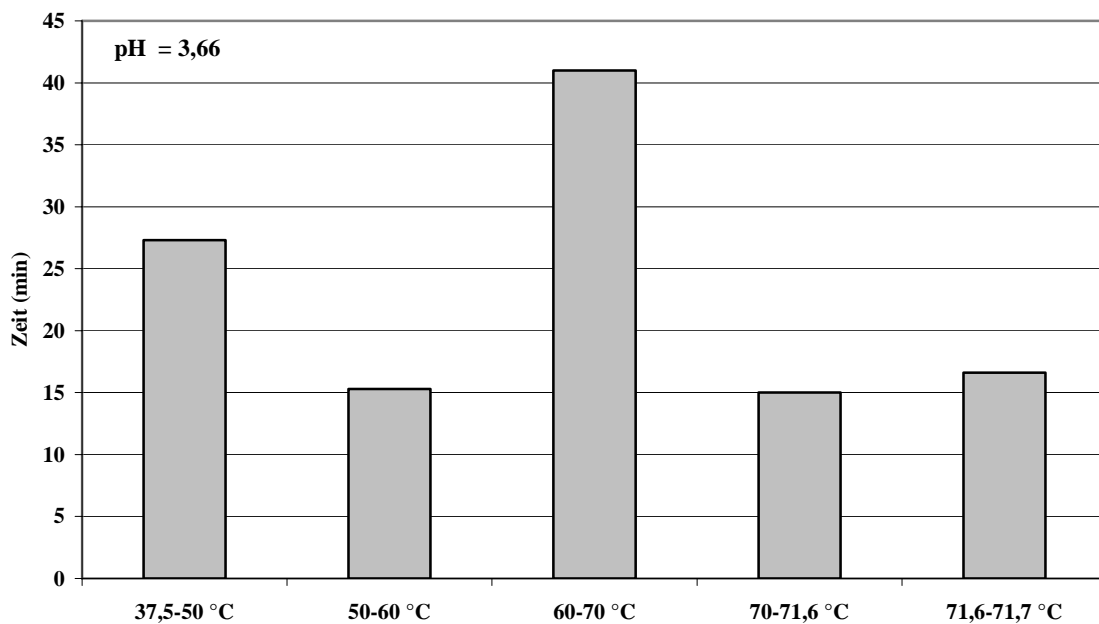


Abb. 16: Grafische Darstellung der Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenahmen im Hygienisierungsbehälter

Die zu behandelnden Speiseabfälle wurden mit einer mittleren Temperatur von 37,5 °C in den Hygienisierungsreaktor gepumpt. Der Zeitpunkt der ersten Probenahme bei 50 °C erfolgte nach 27,3 min. Der Zeitraum zwischen der ersten und zweiten Entnahme der Proben wurde in einem kürzeren Intervall erreicht und betrug 15 min. Der Beginn der eigentlichen Hygienisierung bei 70 °C wurde nach 41 min ermittelt. 15 min später wurde eine weitere Probe entnommen, deren Temperaturmittelwert 71,6 °C betrug. Die letzten Proben wurden nach 16,6 min am Ende der Hygienisierung gezogen, wobei der Temperaturdurchschnitt bei 71,7 °C lag.

Der durchschnittliche pH-Wert des Substrates im Hygienisierungsbehälter bei allen 3 Versuchen betrug 3,6. Minimale und maximale pH-Werte konnten bei 3,5 und 3,8 gemessen werden.

4.2.3 Inaktivierung von Felinem Calicivirus (FCV)

Die Abb. 17 zeigt die grafische Darstellung der Titerreduktion von FCV während des Hygienisierungsprozesses. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 3 im Anhang zu entnehmen.

Die Konzentration an FCV in den drei Nullproben betrug durchschnittlich 10^5 (KID₅₀/ml). Die erste Probenahme erfolgte nach 27,3 min, bei der eine Abnahme von FCV auf $10^{2,8}$ (KID₅₀/ml) festgestellt werden konnte. Bis zur nächsten Probenentnahme nach weiteren 15 min fand eine Keimreduktion um etwa drei Zehnerpotenzen (99,9 %) statt bzw. das Testvirus war eliminiert. Bei allen folgenden Probenahmen, die nach Erreichen von 70 °C, bei 71,6 °C und am Ende der Hygienisierung stattfanden, war der Nachweis von FCV nicht mehr möglich.

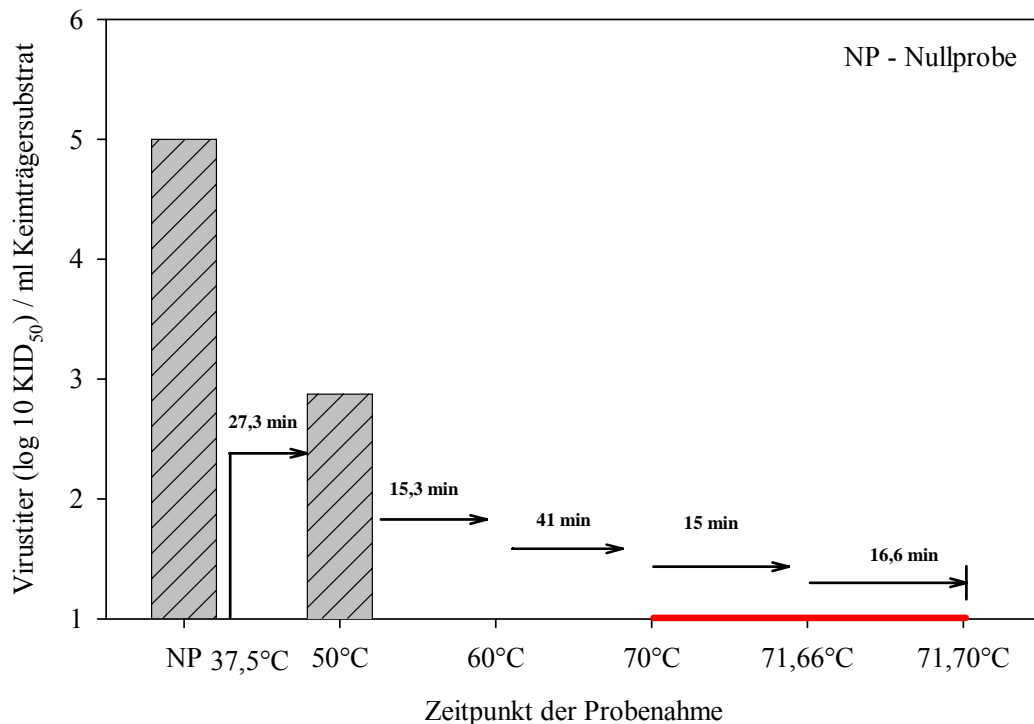


Abb. 17: Inaktivierung von Felinem Calicivirus während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.2.4 Inaktivierung von ECBO-Virus

Das Säulendiagramm in Abb. 18 stellt die Reduktion der Konzentration von ECBO-Virus während der Hygienisierung dar. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 3 im Anhang zu entnehmen.

Die ermittelte Ausgangskonzentration an ECBO-Virus der drei mitgeführten Nullproben lag bei durchschnittlich $10^{6,25}$ (KID₅₀/ml).

Das ECBO-Virus wurde bis zur ersten Probenentnahme bei 50 °C nach 27,3 min um eine halbe Zehnerpotenz reduziert ($10^{5,75}$ KID₅₀/ml). Nach weiteren 15,3 min war eine Temperatur von 60 °C erreicht, bei der eine Abnahme von 2,75 Zehnerpotenzen ($10^{3,00}$ KID₅₀/ml) nachgewiesen werden konnte.

Nach 41 min war eine Temperatur von 70 °C erreicht, bei welcher der Nachweis von ECBO-Virus nicht mehr möglich war.

Der Nachweis von ECBO-Virus bei der vierten und fünften Probenentnahme, bzw. beim Erreichen von 71,6 °C und 71,7 °C war ebenfalls nicht mehr möglich.

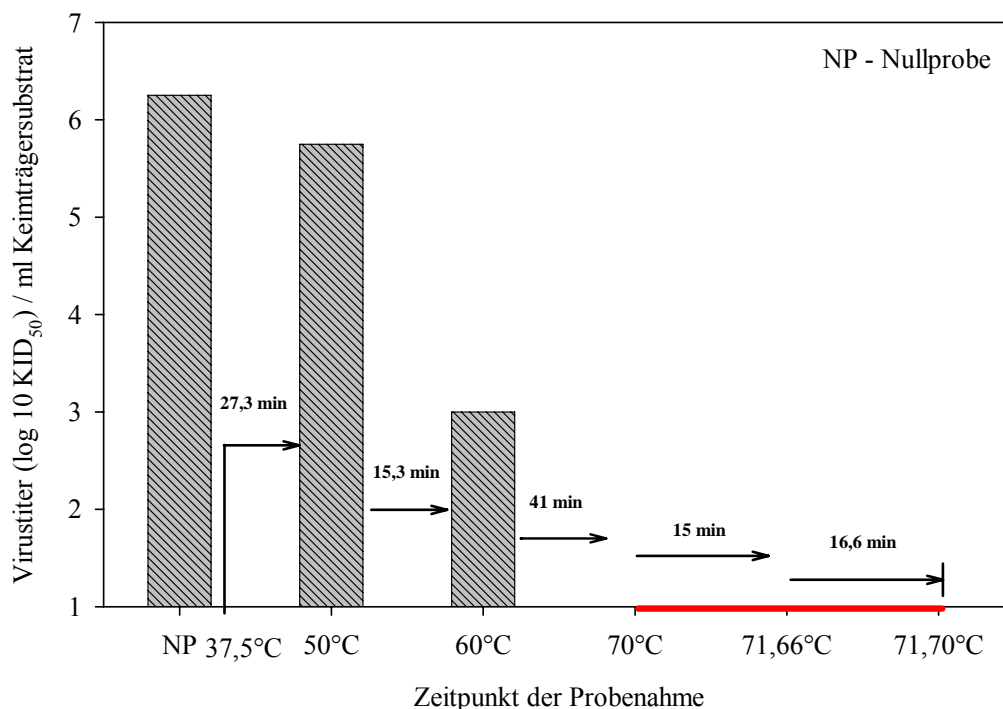


Abb. 18: Inaktivierung von ECBO-Virus während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.2.5 Inaktivierung von Bovinem Parvovirus (BPV)

Das Säulendiagramm in Abb. 18 stellt die Reduktion der Konzentration von BPV während der Hygienisierung dar. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle A 3 im Anhang zu entnehmen.

Die durchschnittliche Konzentration an BPV auf den Keimträgern Typ 2 der Nullproben betrug $10^{4,50}$ (KID₅₀/ml). Während der 27,3 min dauernden Temperaturerhöhung auf 50 °C, dem ersten Zeitpunkt der Entnahme, hat sich die Zahl des Virus nur geringfügig verändert ($10^{4,38}$ KID₅₀/ml). Nach Erreichen von 60 °C wurde eine Keimzahlreduktion von 1,3 Zehnerpotenzen festgestellt und der ermittelte Medianwert betrug $10^{3,00}$ (KID₅₀/ml). Bei zwei von drei durchgeführten Versuchen war der Nachweis von BPV bei Beginn der eigentlichen Hygienisierung möglich, wobei der ermittelte Medianwert $10^{2,0}$ KID₅₀/ml betrug. Nach Erreichen von 71,7 °C innerhalb von 15 min, betrug die ermittelte Viruskonzentration $10^{1,50}$ (KID₅₀/ml). Nach Beendigung des Hygienisierungsprozesses, beim Erreichen von 71,70 °C, war der Nachweis von BPV immer noch möglich ($10^{1,25}$ KID₅₀/ml). Die Aufheizphase sowie die vorgegebene Hygienisierung (70 °C/0,5 h) reichten nicht aus, um die Viruskonzentration von $10^{4,50}$ (KID₅₀/ml) zu inaktivieren. Allerdings fand eine Reduktion von BPV von knapp vier Zehnerpotenzen statt.

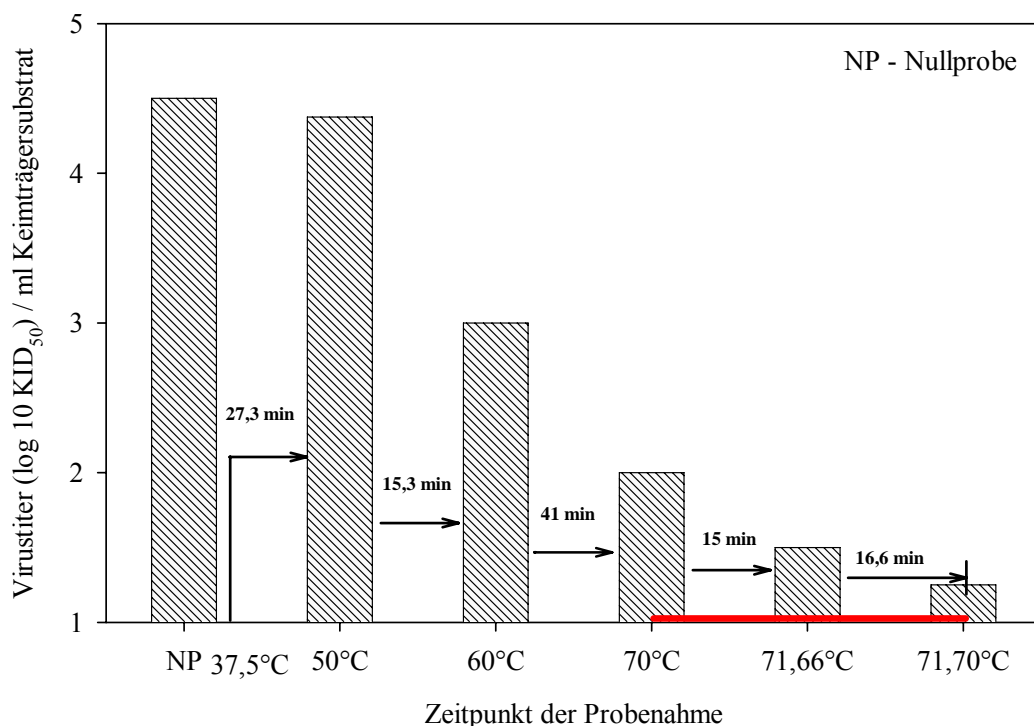


Abb. 19: Inaktivierung von Bovinem Parvovirus während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.2.6 Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Testviren

In Abb. 20 wird die Inaktivierung der verwendeten Testviren (FCV, ECBO-Virus, BPV) im Hygienisierungsbehälter vergleichend dargestellt.

Im Vergleich mit ECBO und FCV war der Nachweis von BPV bis zum Ende des Hygienisierungsprozesses immer noch möglich.

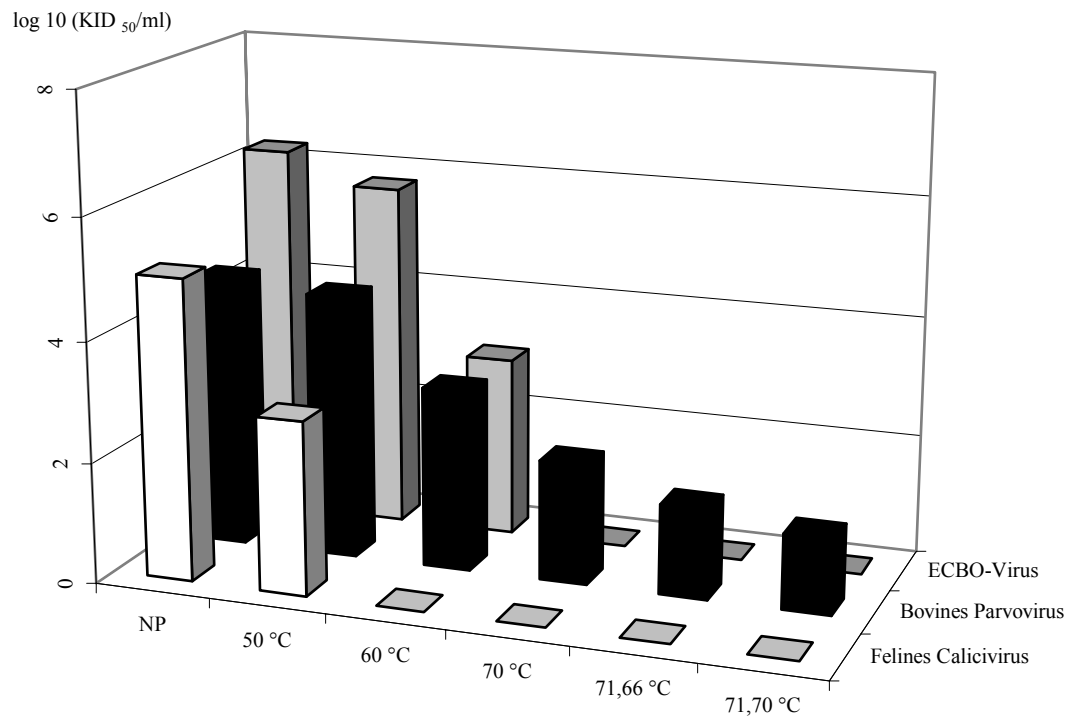


Abb. 20: Inaktivierung der verwendeten Testviren während der Erhitzung des Materials im Hygienisierungsbehälter der Biogasanlage

4.3 Bakteriologische Keimträgeruntersuchungen im mesophilen Reaktor der Biogasanlage

Für die bakteriologischen Keimträgeruntersuchungen während der anaeroben Vergärung im mesophilen Reaktor 2 wurden *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S negativ, *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* als seuchenhygienisch relevante Testbakterien verwendet.

Das Tenazitätsverhalten der verwendeten Testbakterien wurde in drei unabhängigen Versuchen an drei verschiedenen Tagen untersucht.

Es wurden jeweils drei Keimträger Typ 1 mit Testbakterien in zwei verschiedene Ebenen des Reaktors durch drei Tauchröhren eingebracht und nach 1, 7 und 14 d entnommen (siehe 3.1.2.2). Die obere Ebene befand sich auf ca. 2,70 m (30 cm im Substrat eingetaucht). Die untere Ebene befand sich ca. 1 m oberhalb des Reaktorbodens.

Zur Bestimmung der Ausgangskeimkonzentration wurde eine sog. Nullprobe für jedes Testbakterium pro Versuch untersucht. Aus den Einzelergebnissen der drei Versuche wurde der Medianwert je Tauchröhre und Ebene ermittelt und grafisch dargestellt. Die Einzelergebnisse sind aus Tabellen A 4 bis A 9 im Anhang ersichtlich.

Parallel zu den durchgeführten Untersuchungen wurden die Temperatur und pH-Werte in den drei Tauchröhren der zwei Ebenen ermittelt.

4.3.1 Temperatur und pH-Werte im mesophilen Reaktor

Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, lagen die Temperaturwerte der oberen Tauchröhre 1 in einem Bereich um 38 °C mit einem pH-Wert zwischen 7,2-7,3. In den Tauchröhren 2 und 3 waren die gemessenen Temperaturwerte etwa 1-2 °C höher als in der Tauchröhre 1, mit ebenfalls durchschnittlichen pH-Werten von 7,3.

Die gemessenen Temperaturwerte der unteren Ebene lagen in allen drei Tauchröhren in einem mesophilen Bereich von Minimum 39,0 °C (Tauchröhre 1) bis 40,0 °C (Tauchröhre 2 und 3). Die pH-Werte lagen in einem pH-neutralen Bereich zwischen 7,3 und 7,8.

Die ermittelten Werte sind in der Tabelle 5 als Mittelwerte dargestellt.

Tab. 5: Übersicht über Temperatur- und pH-Mittelwerte der 3 durchgeführten Versuche

Ebene	Probenahme (in Tagen)	Tauchröhre 1		Tauchröhre 2		Tauchröhre 3	
		°C	pH	°C	PH	°C	pH
Oben	1	38,7	7,2	39,6	7,5	40,0	7,3
	7	38,7	7,3	39,6	7,4	39,6	7,3
	14	38,3	7,3	40,0	7,4	40,0	7,3
Unten	1	39,0	7,3	40,0	7,3	39,7	7,3
	7	39,3	7,6	40,0	7,4	40,0	7,8
	14	39,0	7,4	40,0	7,2	40,0	7,3

4.3.2 Tauchröhre 1, Ebene oben

Wie aus Abb. 21 zu ersehen ist, kam es bei *Salmonella Senftenberg* W 775 innerhalb von 24 h bzw. bei der ersten Probenahme, zu einer Reduktion der Anzahl von einer Zehnerpotenz. Weiterhin war die Keimkonzentration nach einer Aufenthaltszeit von 7 Tagen um weitere sechs Zehnerpotenzen reduziert und betrug $3,6 \times 10^1$ KBE/ml Substrat. Der Nachweis des Testkeimes aus dem beimpften Substrat der Keimträger Typ 1 lag bei der letzten Probenentnahme, die 14 Tage nach dem Beginn des Versuches stattfand, unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat.

Innerhalb von 24 h nach Versuchsbeginn kam es bei *Enterococcus faecalis* nur zu einer geringfügigen Keimzahlreduktion von $4,3 \times 10^8$ auf $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Eine Senkung um eine Zehnerpotenz wurde bei der zweiten Probenentnahme, nach 7 Tagen, festgestellt. Der Testkeim war bis zu 14 Tage nachweisbar. Die ermittelte Konzentration betrug $1,5 \times 10^2$ KBE/ml.

Der Medianwert von *Escherichia coli* in den Nullproben ($3,8 \times 10^7$ KBE/ml Substrat) hat sich innerhalb von 24 h nur geringfügig verändert. Der weitere Inaktivierungsverlauf von *Escherichia coli* zeigt, dass die ermittelte Keimkonzentration bei der ersten Probenentnahme ($2,4 \times 10^7$ KBE/ml Substrat), nach einer Woche, um fünf Zehnerpotenzen reduziert war und noch $4,6 \times 10^2$ KBE/ml Substrat betrug. Ein Nachweis von *Escherichia coli* war nach zwei Wochen nicht mehr möglich.

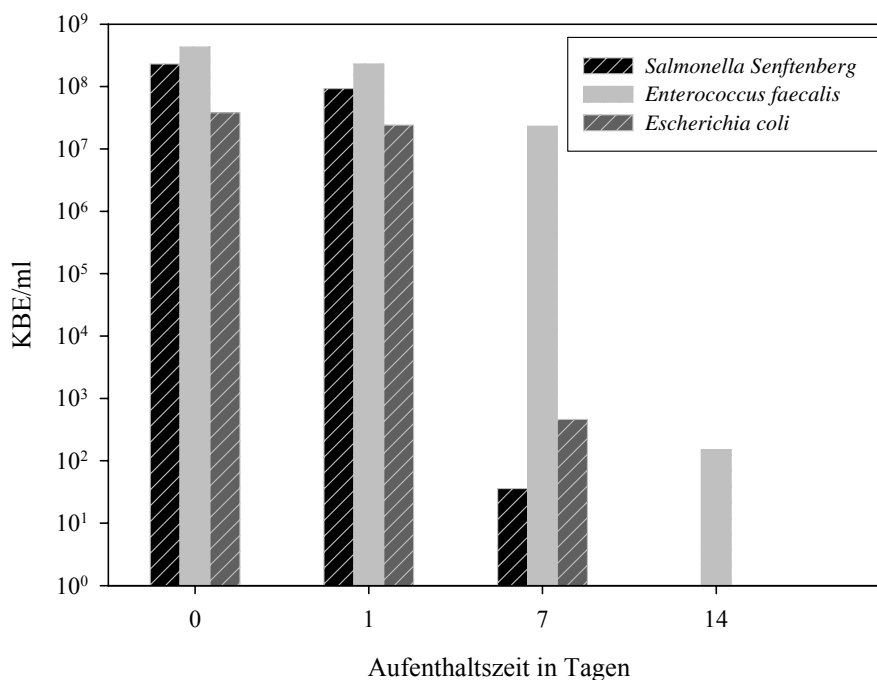


Abb. 21: Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 1, Ebene oben

4.3.3 Tauchröhre 1, Ebene unten

Der Medianwert der Nullproben von *Salmonella Senftenberg* W 775 lag bei $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Nach 24 h Aufenthaltszeit wurde diese Konzentration um eine Zehnerpotenz reduziert.

Im Gegensatz zum positiven Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W 775 im Falle der Keimträger Typ 1, die in der oberen Ebene der Tauchröhre 1 lagen, war der Testkeim nach einer Aufenthaltszeit von 7 Tagen nicht mehr nachweisbar. Der Nachweis des Testbakteriums aus den beimpften Keimträgern lag bei der letzten Probenentnahme ebenfalls unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat.

Die Keimzahlreduktion von *Enterococcus faecalis* war ähnlich der aus der oberen Ebene derselben Tauchröhre. Die ermittelte Ausgangskonzentration von $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat bei der ersten Probenahme wurde nach 1 Woche Aufenthaltszeit um eine Zehnerpotenz reduziert und betrug $1,1 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Der Nachweis war bis zum Versuchsende bzw. 14 Tage nach dem Beginn des Versuches möglich und lag bei $1,5 \times 10^2$ KBE/ml Substrat.

Die ermittelte Konzentration von *Escherichia coli* in den Nullproben ($3,8 \times 10^7$ KBE/ml Substrat) hat sich nach 24 h geringfügig verändert und betrug $2,4 \times 10^7$ KBE/ml Substrat. Während der Medianwert von *Escherichia coli* aus der oberen Ebene von $2,4 \times 10^7$ auf $4,2 \times 10^2$ KBE/ml reduziert wurde, wurde die Zahl der Testbakterien aus den Keimträgern, die in der unteren Ebene lagen, um sieben Zehnerpotenzen nach 7 Tagen reduziert bzw. die Zahl lag unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat.

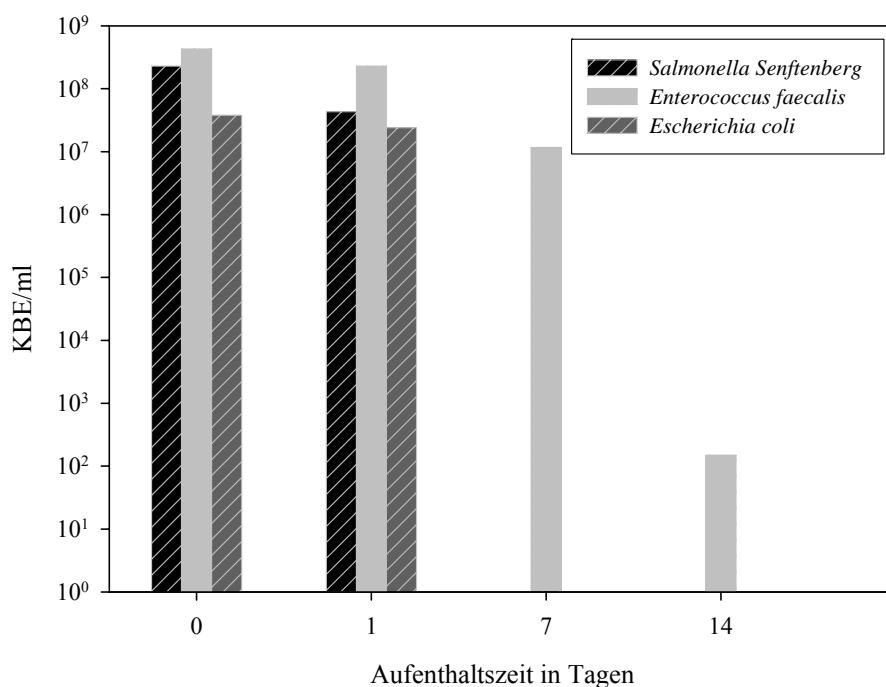


Abb. 22: Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 1, Ebene unten

4.3.4 Tauchröhre 2, Ebene oben

Die ermittelte Keimkonzentration von *Salmonella Senftenberg* W 775 der drei mitgeführten Nullproben betrug $4,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Innerhalb von 24 h wurde diese Ausgangskonzentration um eine Zehnerpotenz reduziert. In allen folgenden Probenentnahmen, die 7 und 14 Tage nach dem Einbringen der Keimträger stattfanden, war der Nachweis des ausgewählten Testbakteriums nicht mehr möglich.

Bei *Enterococcus faecalis* wurde nach der ersten Probenentnahme keine Keimzahlabnahme festgestellt. Die ermittelte Konzentration von $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat bei der ersten Probenahme sank nach einer Woche auf $4,3 \times 10^5$ KBE/ml Substrat. Eine weitere Reduktion um drei Zehnerpotenzen wurde nach insgesamt 14 Tagen, bei der letzten Probenentnahme festgestellt. Dieser ermittelte Medianwert betrug $4,3 \times 10^2$ KBE/ml Substrat.

Wie aus Abb. 23 zu ersehen ist, wurde bei *Escherichia coli* keine Keimzahländerung zwischen der Nullprobe und der ersten Probenentnahme ermittelt. Eine deutliche Reduktion der Anzahl um sieben Zehnerpotenzen wurde bei der zweiten Probenentnahme nach 7 Tagen festgestellt. Ebenso war der Nachweis nach der letzten Probenentnahme nicht mehr möglich.

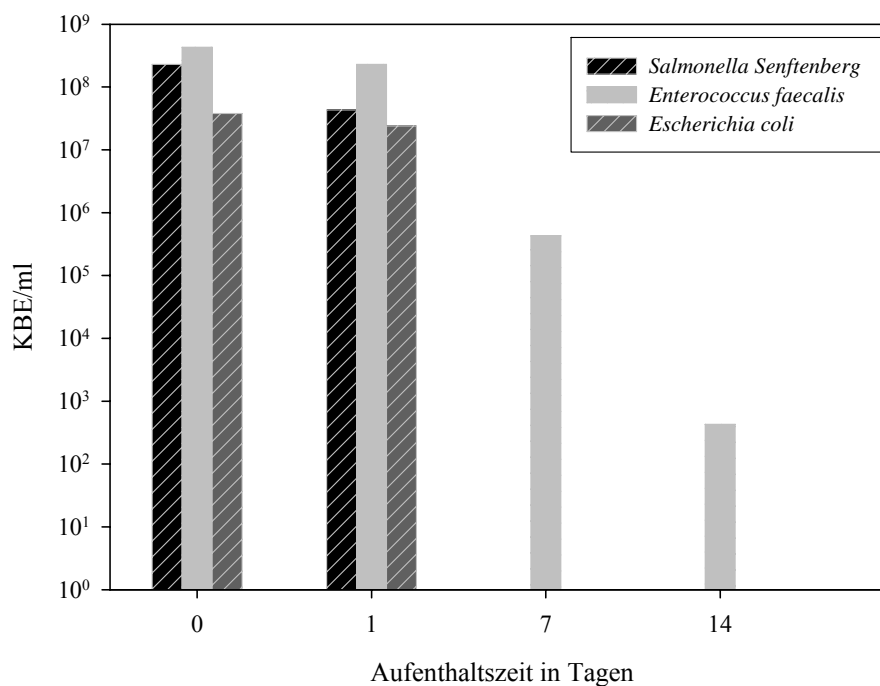


Abb. 23: Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 2, Ebene oben

4.3.5 Tauchröhre 2, Ebene unten

Die Abb. 24 zeigt den Inaktivierungsverlauf von *Salmonella Senftenberg* W 775. Der Testkeim war sieben Tage nach dem Einbringen in die Tauchröhre des Reaktors nicht mehr nachweisbar, d. h. es kam zu einer Keimzahlreduktion um sieben Zehnerpotenzen. Ebenso war der Nachweis des ausgewählten Testbakteriums nach 14 Tagen Aufenthaltszeit nicht mehr möglich.

24 h nach dem Einbringen von *Enterococcus faecalis* in den Reaktor 2 wurde keine Keimzahlreduktion festgestellt. Innerhalb einer Woche bzw. bei der zweiten Probenahme kam es bei dem Testkeim zu einer Keimreduktion von zwei Zehnerpotenzen und dieser ermittelte Medianwert betrug $2,1 \times 10^6$ KBE/ml Substrat. Nach zwei Wochen lag die durch das MPN-Verfahren bestimmte Keimkonzentration bei $9,3 \times 10^2$ KBE/ml Substrat.

Die bei den Nullproben ermittelte Ausgangskonzentration von *Escherichia coli* sank in einem Zeitraum von 24 h von ursprünglich $3,8 \times 10^7$ auf $2,4 \times 10^7$ KBE/ml Substrat. Nach einer Woche konnte bei *Escherichia coli* eine Keimzahlreduktion um mehr als sieben Zehnerpotenzen festgestellt werden bzw. der Nachweis lag unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat. Der Nachweis von *Escherichia coli* war ebenfalls bei der dritten Probenahme nach einer Aufenthaltszeit von 14 Tagen nicht mehr möglich.

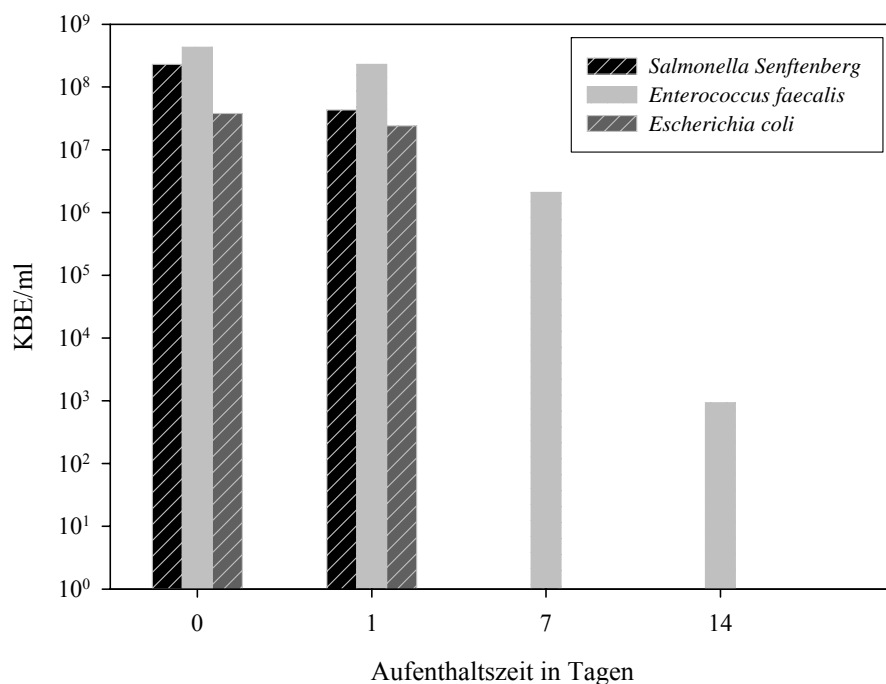


Abb. 24: Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 2, Ebene unten

4.3.6 Tauchröhre 3, Ebene oben

Eine Keimzahlreduktion um eine Zehnerpotenz wurde bei *Salmonella Senftenberg* W 755 24 h nach dem Einbringen der Keimträger Typ 1 („Volumenkeimträger“) in den Reaktor ermittelt. Bei den Proben, welche nach 7 und 14 Tagen Aufenthaltszeit untersucht wurden, lag der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W 755 unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat.

In einem Zeitraum von 24 h wurde keine Keimzahlreduktion von *Enterococcus faecalis* nachgewiesen. Nach 7 Tagen bzw. bei der zweiten Probenahme, betrug die ermittelte Keimkonzentration $1,5 \times 10^7$ KBE/ml Substrat, welche um weitere mehr als sieben Zehnerpotenzen nach insgesamt 14 Tagen Aufenthaltszeit reduziert wurde, d. h. die Keimkonzentration betrug $9,4 \times 10^0$ KBE/ml Substrat.

Bei den Ergebnissen von *Escherichia coli* zeigte sich ein ähnliches Bild, vergleichbar den Ergebnissen von *Salmonella Senftenberg* W 775. Das Testbakterium war nachweisbar bis zur zweiten Probenentnahme, die 7 Tage nach dem Einbringen den Keimträger Typ 1 stattfand. Bis zu diesem Punkt wurde die ermittelte Keimkonzentration von $2,7 \times 10^7$ KBE/ml bei der ersten Probenahme um sieben Zehnerpotenzen reduziert.

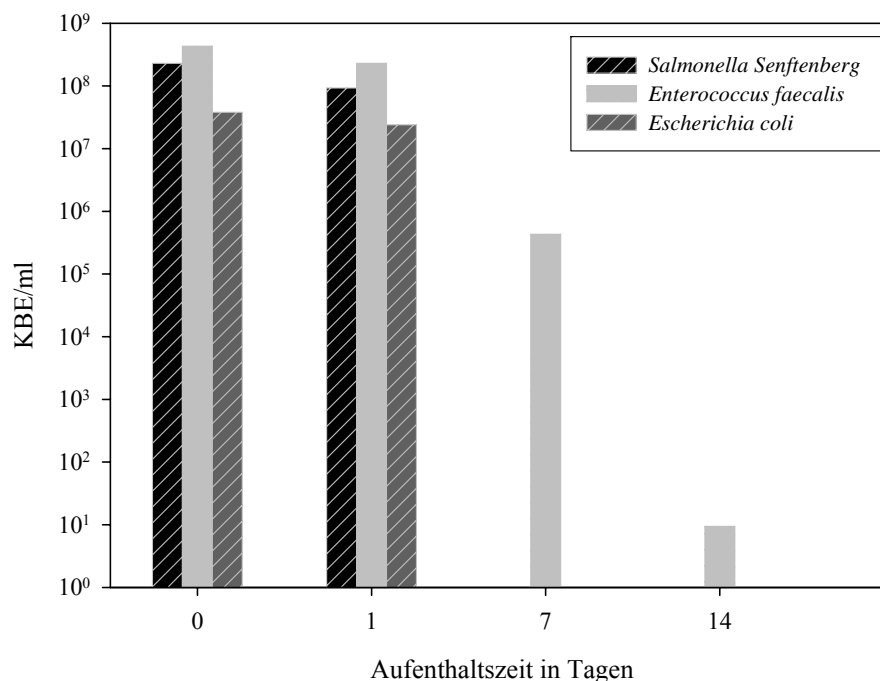


Abb. 25: Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 3, Ebene oben

4.3.7 Tauchröhre 3, Ebene unten

Wie der Abb. 26 zu entnehmen ist, konnte nach 24 h Aufenthaltszeit *Salmonella Senftenberg* W 775 mit einer Konzentration von $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat nachgewiesen werden. Bei den zwei folgenden Probenahmen nach 7 und 14 Tagen Aufenthaltszeit war der Nachweis dieses Keimes nicht mehr möglich.

Die bei den Nullproben ermittelte Ausgangskonzentration von *Enterococcus faecalis* sank in einem Zeitraum von 24 h von $4,3 \times 10^8$ auf $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Eine deutlichere Reduktion um zwei Zehnerpotenzen war nach einer Woche zu erkennen. Zwei Wochen nach Versuchsbeginn sank die Konzentration um acht Zehnerpotenzen. Die ermittelte Konzentration lag bei $9,2 \times 10^0$ KBE/ml Substrat. Die dritte Probenentnahme führte zu Ergebnissen, die denen aus der oberen Ebene der Tauchröhre 3 ähnelten.

Wie in Abb. 26 zu sehen ist, wurde bei *Escherichia coli* nur eine geringfügige Konzentrationsänderung zwischen der Nullprobe und der ersten Probenentnahme festgestellt.

Escherichia coli konnte eine Woche nach dem Einbringen der KeimträgerTyp 1 in den Reaktor nicht mehr nachgewiesen werden. Dabei kam es zu einer Senkung von mehr als sieben Zehnerpotenzen. Ebenfalls war der Nachweis von dem ausgewählten Testbakterium nach einer Aufenthaltszeit von 14 Tagen nicht mehr möglich.

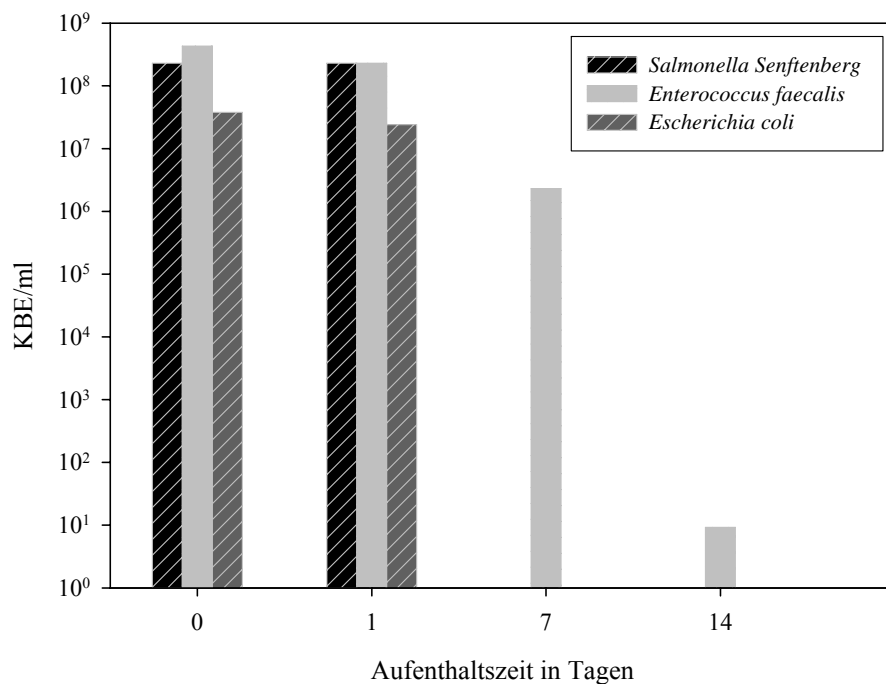


Abb. 26: Inaktivierungsverlauf der Testbakterien, Reaktor 2, Tauchröhre 3, Ebene unten

4.4 Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“)

4.4.1 Vorgrube

In allen untersuchten Speiseabfallproben aus der Vorgrube konnten Enterokokken nachgewiesen werden, wobei große Schwankungen zu beobachten waren. Die nachgewiesene Keimkonzentration variierte zwischen minimal $1,4 \times 10^1$ und maximal $2,3 \times 10^8$ KBE/ml Substrat. Wie aus Abb. 27 bzw. Tabelle 6 zu ersehen ist, betrug der Medianwert des Gehaltes an Enterokokken aller untersuchten Proben $4,6 \times 10^6$ KBE/ml Substrat. Der Medianwert der Gesamtcoliformen bzw. Fäkalcoliformen betrug $2,3 \times 10^1$ KBE/ml Substrat. In allen 25 untersuchten Proben konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden.

Der durchschnittliche pH-Wert betrug 3,7 wo hingegen ein Minimalwert von 3,4 und ein Maximalwert von 3,9 gemessen wurde.

Tab. 6: Konzentrationen der untersuchten Bakterien in den Speiseabfällen aus der Vorgrube (Angaben in KBE/ml)

Untersuchte Parameter	Median Mittelwert (pH)	Maximalwert	Minimalwert	Anzahl der Proben
Gesamtcoliforme	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^8$	$< 10^1$	25
Fäkalcoliforme	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^8$	$< 10^1$	25
Enterokokken	$4,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$1,4 \times 10^1$	25
Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	25
PH	3,7	3,9	3,4	25

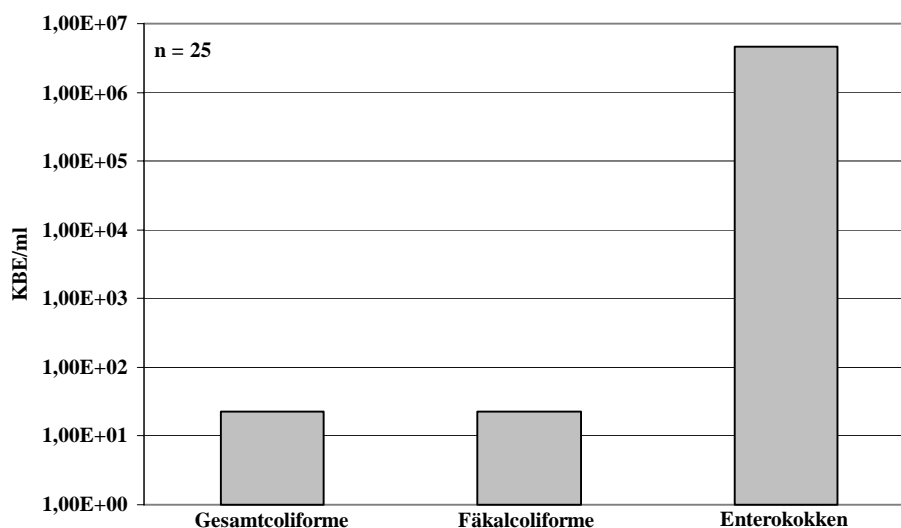


Abb. 27: Durchschnittliche Konzentrationen der untersuchten Bakterien in den Speiseabfällen aus der Vorgrube

4.4.2 Beschickungsgrube

Aus der Tabelle 7 wird ersichtlich, dass die Medianwerte aller untersuchten Bakterien aus der Beschickungsgrube nach der Hygienisierung unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml lagen. In 12 von insgesamt 25 untersuchten Proben waren Enterokokken nachweisbar, wobei die ermittelten Keimkonzentrationen zwischen $3,6 \times 10^0$ und $9,3 \times 10^1$ KBE/ml Substrat lagen.

In keiner der 25 untersuchten Proben wurden Salmonellen nachgewiesen.

Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, bewegten sich die ermittelten pH-Werte immer im sauren Bereich zwischen minimal 3,4 und maximal 4,1. Der durchschnittliche pH-Wert lag bei 3,7.

Tab. 7: Konzentrationen der untersuchten Bakterien der hygienisierten Speiseabfälle aus der Beschickungsgrube (Angaben in KBE/ml)

Untersuchte Parameter	Median Mittelwert (pH)	Maximalwert	Minimalwert	Anzahl der Proben
Gesamtcoliforme	$< 10^1$	$9,2 \times 10^0$	$< 10^1$	25
Fäkalcoliforme	$< 10^1$	$7,2 \times 10^0$	$< 10^1$	25
Enterokokken	$< 10^1$	$9,3 \times 10^1$	$< 10^1$	25
Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	25
PH	3,7	4,1	3,4	25

n. n.: nicht nachweisbar

4.4.3 Reaktoren 1–4

Wie aus Tabelle 8 zu ersehen ist, lagen die Medianwerte der Gesamt- und Fäkalcoliformen in den Reaktoren 1 bis 4 unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat. Diese heterogene Bakteriengruppe konnte in einer Zeitspanne von 11 Wochen nach dem Beginn der Untersuchung nachgewiesen werden. Ab diesem Zeitpunkt wurden Gesamt- und Fäkalcoliforme nicht mehr nachgewiesen. Die ermittelten Keimkonzentrationen in 25 positiven von insgesamt 100 untersuchten Proben lagen zwischen minimal $0,30 \times 10^1$ und maximal $3,8 \times 10^2$ KBE/ml (siehe Tabelle 8).

In allen 100 untersuchten Proben konnten Enterokokken nachgewiesen werden. Die ermittelte Keimkonzentration lag zwischen minimal $3,0 \times 10^0$ bis maximal $2,3 \times 10^5$ KBE/ml Substrat. Die durchschnittlichen Konzentrationen in den vier Reaktoren bewegten sich zwischen $2,3 \times 10^2$ KBE/ml Substrat und $9,3 \times 10^2$ KBE/ml Substrat. Wie aus den Abbildungen 25 bis 28 zu ersehen ist, stieg die Konzentration an Enterokokken ab dem 19.11.2002 bis zum Ende der Untersuchungen am 11.02.03 (nach 3,5 Monaten) um zwei Zehnerpotenzen an.

In allen untersuchten Proben der Reaktoren wurden keine Salmonellen nachgewiesen.

Es wurden keine Unterschiede zwischen den Keimgehalten und den pH-Werten in den Substraten der vier Reaktoren festgestellt.

Die gemessenen pH-Werte bewegten sich in einem neutralen bis leicht alkalischen Bereich zwischen minimal 6,5 und maximal 8,2.

In der Tabelle 8 sind die Median-, Maximal- und Minimalwerte der untersuchten Proben aus den Reaktoren 1 bis 4 dargestellt.

Tab. 8: Gehalte an Gesamt- und Fäkalcoliformen sowie Enterokokken im Substrat aus den vier mesophilen Reaktoren der Biogasanlage (Angaben in KBE/ml)

Reaktor	Untersuchte Parameter	Median Mittelwert (pH)	Maximum	Minimum	Anzahl der Proben
1	Gesamtcoliforme	$< 10^1$	$2,3 \times 10^3$	$< 10^1$	25
	Fäkalcoliforme	$< 10^1$	$2,3 \times 10^3$	$< 10^1$	25
	Enterokokken	$9,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^5$	$6,1 \times 10^0$	25
	Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	25
	pH	7,6	8,0	6,8	25
2	Gesamtcoliforme	$< 10^1$	$1,5 \times 10^3$	$< 10^1$	25
	Fäkalcoliforme	$< 10^1$	$1,5 \times 10^3$	$< 10^1$	25
	Enterokokken	$2,7 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^0$	25
	Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	25
	pH	7,7	8,2	6,5	25
3	Gesamtcoliforme	$< 10^1$	$2,3 \times 10^2$	$< 10^1$	25
	Fäkalcoliforme	$< 10^1$	$2,3 \times 10^2$	$< 10^1$	25
	Enterokokken	$7,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$	$7,4 \times 10^0$	25
	Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	25
	PH	7,6	7,9	6,5	25
4	Gesamtcoliforme	$< 10^1$	$3,8 \times 10^2$	$< 10^1$	25
	Fäkalcoliforme	$< 10^1$	$3,8 \times 10^2$	$< 10^1$	25
	Enterokokken	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$	$6,1 \times 10^1$	25
	Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	25
	PH	7,7	8,1	7,0	25

n. n.: nicht nachweisbar

Die vier folgenden Abbildungen zeigen die ermittelten Konzentrationen an Enterokokken der Substrate aus den vier mesophilen Reaktoren.

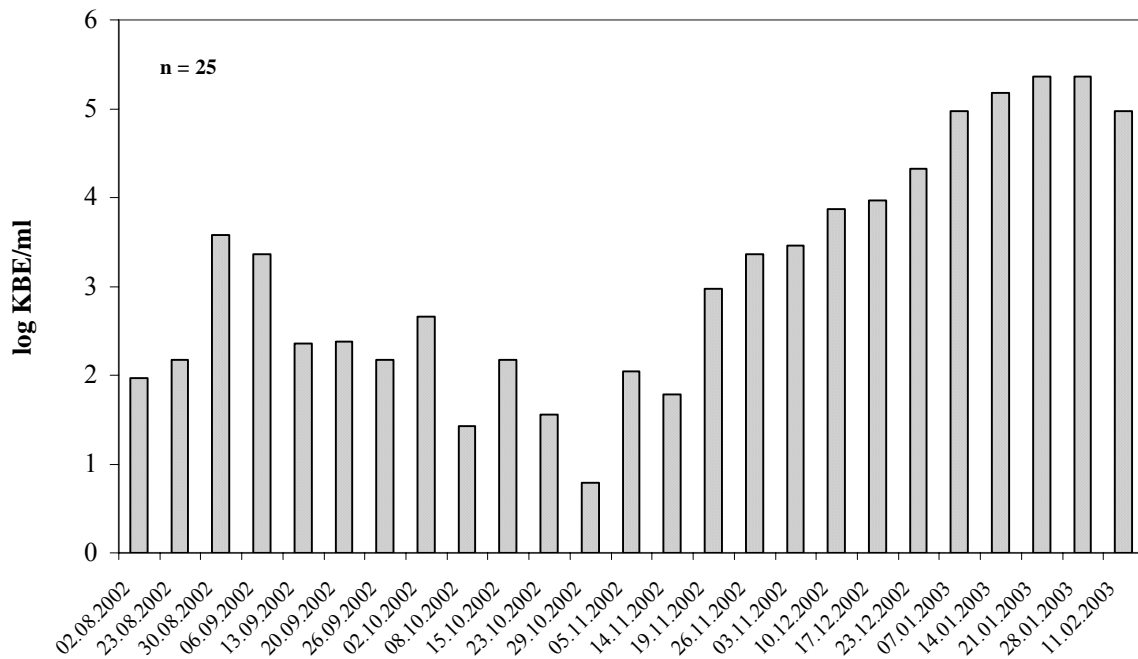


Abb. 28: Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 1

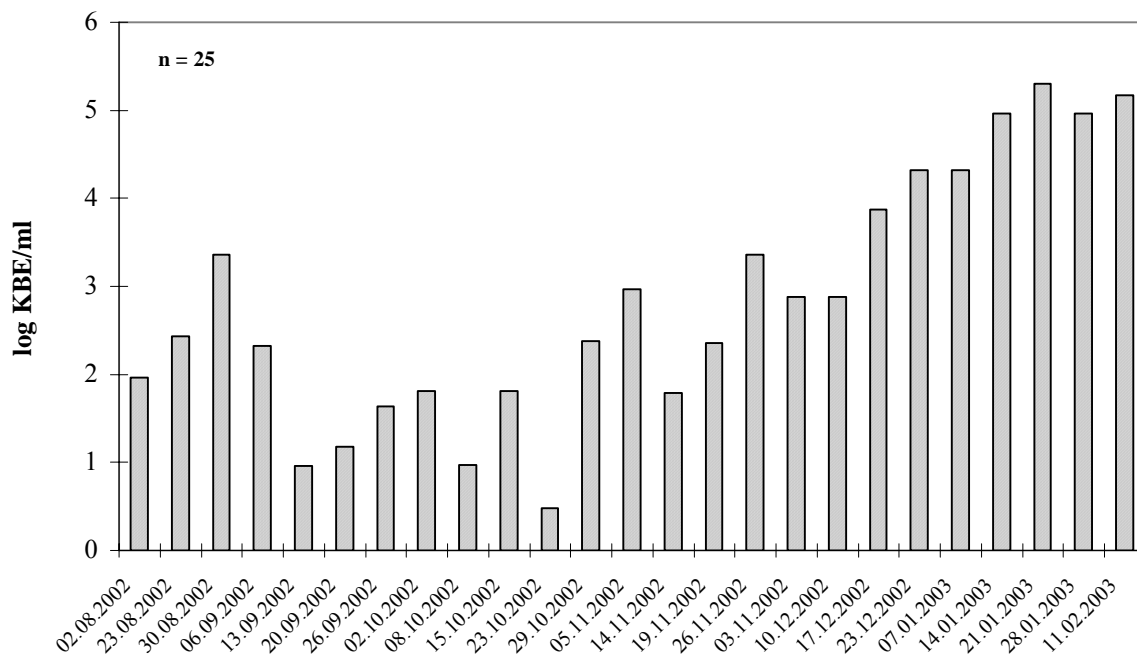


Abb. 29: Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 2

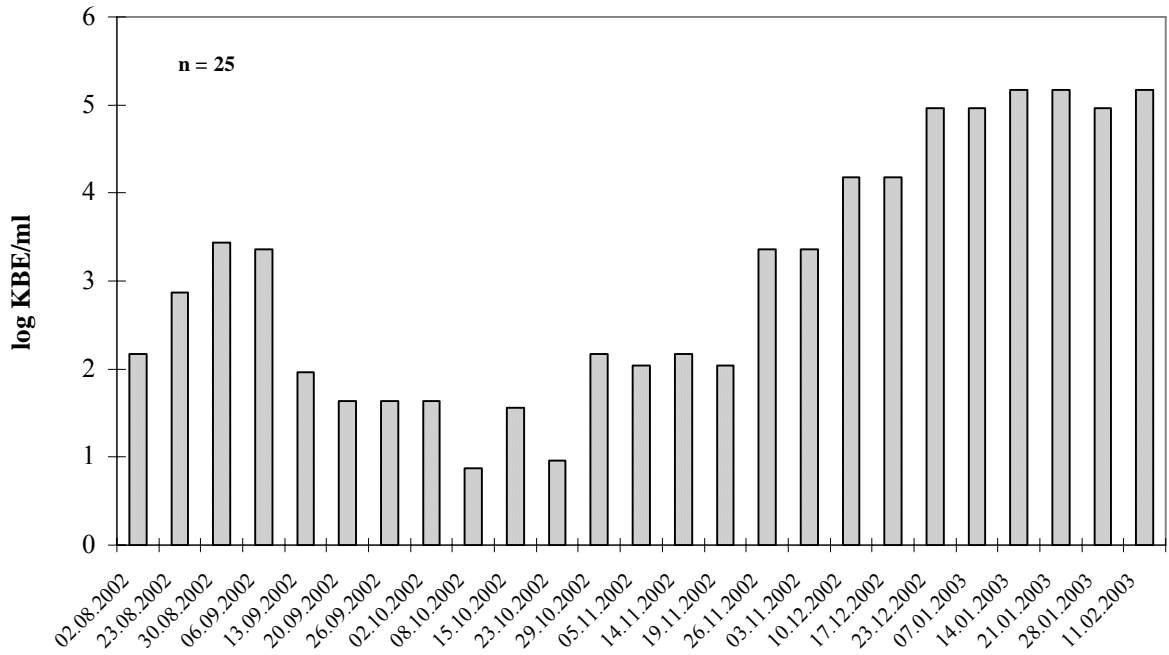


Abb. 30: Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 3

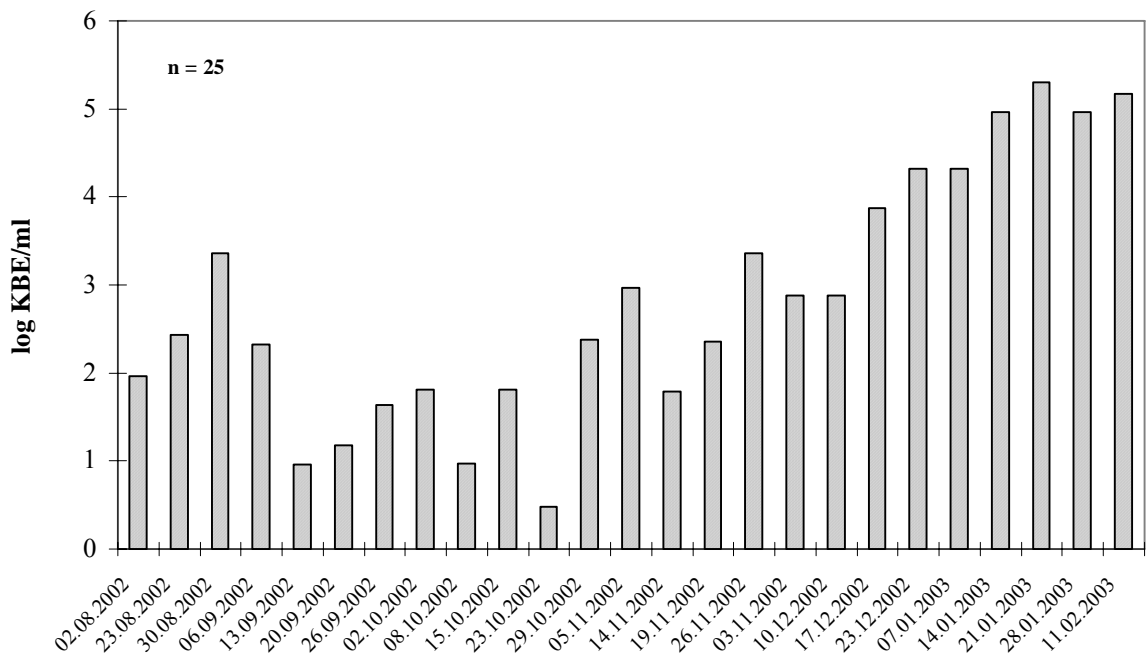


Abb. 31: Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus Reaktor 4

In der folgenden Abb. 32 wurden die Medianwerte der Enterokokken aus den 4 Reaktoren der Biogasanlage vergleichend dargestellt.

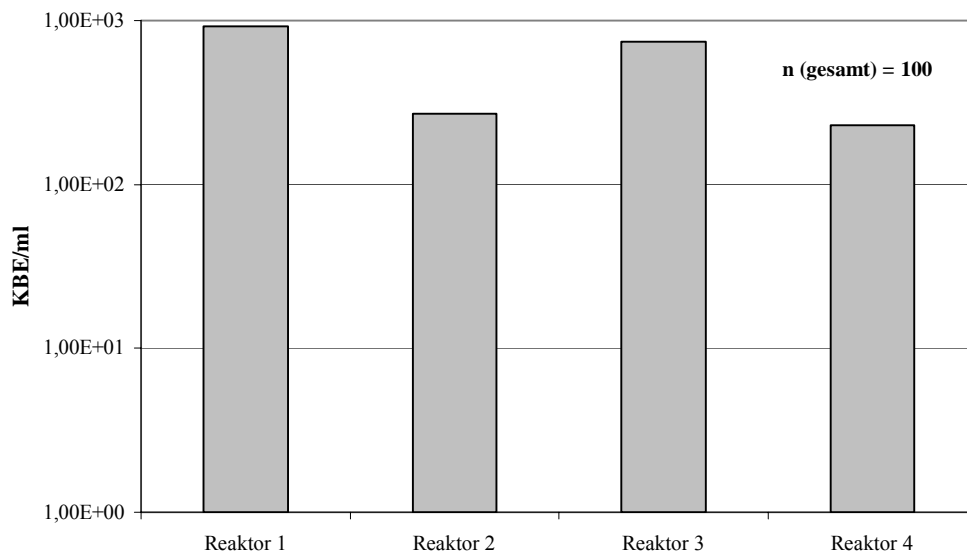


Abb. 32: Durchschnittliche Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus den vier Reaktoren

4.4.4 Nachfermenter

Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen des Endproduktes (Outputproben) aus dem Nachfermenter der zu untersuchenden Biogasanlage.

Tab. 9: Keimkonzentrationen der untersuchten Bakterien aus dem Substrat des Nachfermenters (Angaben in KBE/ml)

Untersuchte Parameter	Median Mittelwert (pH)	Maximalwert	Minimalwert	Anzahl der Proben
Gesamtcoliforme	$< 10^1$	$3,6 \times 10^1$	$< 10^1$	19
Fäkalcoliforme	$< 10^1$	$3,6 \times 10^1$	$< 10^1$	19
Enterokokken	$2,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$	$< 10^1$	19
Salmonellen	n. n.	n. n.	n. n.	19
PH	7,9	8,3	7,7	19

n. n.: nicht nachweisbar

Die ersten Substratproben aus dem Nachfermenter wurden am 26.09.2002 gezogen. Im Zeitraum vom 02.08.2002 (Beginn der Probenentnahmen) bis 26.09.2002 waren die

Probeentnahmen nicht möglich, da nicht genügend Endprodukt im Nachfermenter vorhanden war.

In 2 von insgesamt 19 untersuchten Proben konnten Gesamtcoliforme und Fäkalcoliforme nachgewiesen werden. Der ermittelte Maximalwert betrug $3,6 \times 10^1$ KBE/ml Substrat, wobei der Medianwert unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml Substrat lag.

Wie aus Abb. 33 zu ersehen ist, lag in den ersten neun untersuchten Proben bzw. bis zum 26.11.02 der Nachweis von Enterokokken zwischen minimal $<1,0 \times 10^1$ und maximal $9,4 \times 10^1$ KBE/ml Substrat. Ab diesem Zeitpunkt, d. h. ab der zehnten Probenahme stieg die Keimzahl um 2 bis 4 Zehnerpotenzen an. Die höchste nachgewiesene Anzahl von Enterokokken lag bei $2,4 \times 10^4$ KBE/ml Substrat, wobei der ermittelte Medianwert $2,3 \times 10^2$ KBE/ml Substrat betrug.

Der pH-Mittelwert betrug 7,9, die min. und max. Werte lagen bei 7,7 und 8,3.

Salmonellen wurden in allen 19 untersuchten Outputproben nicht nachgewiesen.

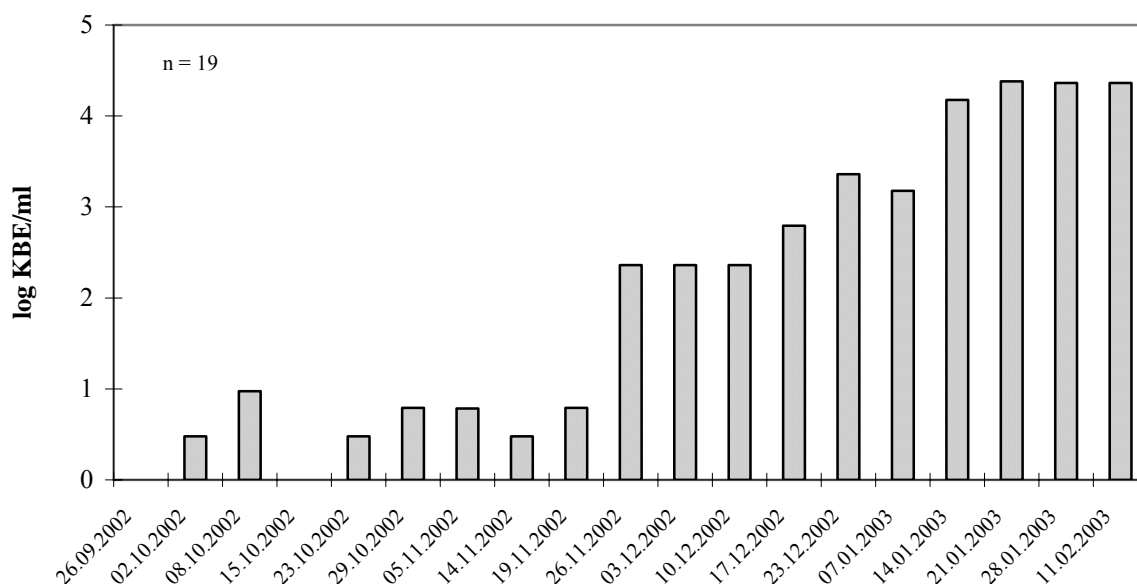


Abb. 33: Ermittelte Konzentrationen an Enterokokken im Substrat aus dem Nachfermenter

In folgender Abb. 34 sind die Gehalte der Gesamtcoliformen, Fäkalcoliformen, Enterokokken und Salmonellen grafisch dargestellt.

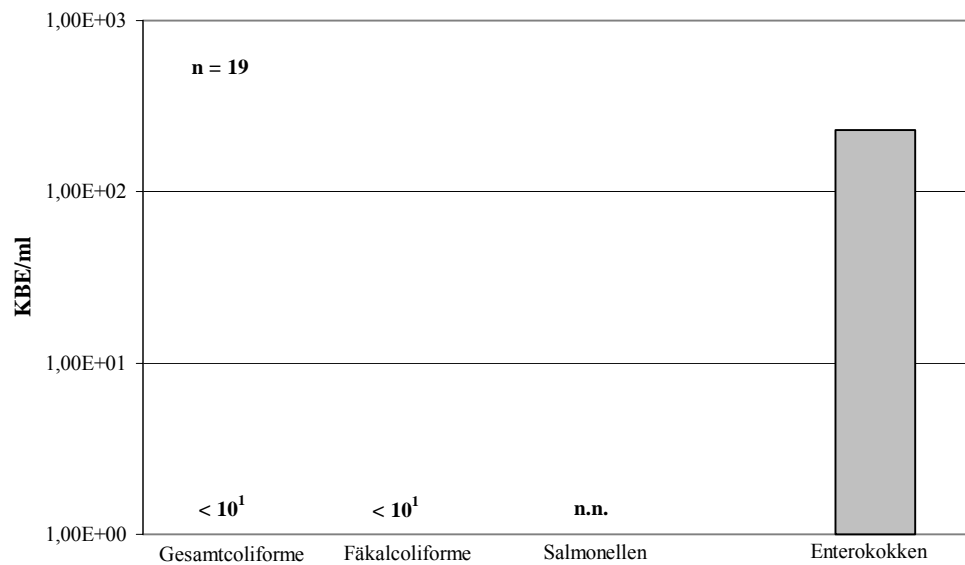


Abb. 34: Durchschnittliche Konzentrationen der untersuchten Bakterien des Substrates aus dem Nachfermenter

4.5 Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und *Escherichia coli* aus biologischen Substraten

4.5.1 Salmonellenuntersuchungen

4.5.1.1 Erdproben

Das folgende Kapitel beschreibt die Ergebnisse der *Salmonella*-Untersuchungen der Erdproben mit vier verschiedenen Nachweismethoden. In der folgenden Tabelle 10 sind die Minimum-, Maximum- und Mittelwerte von 120 untersuchten Proben dargestellt. Die Einzelergebnisse sind im Anhang in den Tabellen A 19 bis A 22 aufgelistet.

Tab. 10: Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von *Salmonella Senftenberg* in Erdproben (Angaben in KBE/g)

Kontaminationsgrad	Verwendete Methode	Anzahl der Proben	Errechnete Werte		
			Minimum	Maximum	Mittelwert
10 ¹ KBE/g	Methode 1	10	2,1 x 10 ¹	>2,4 x 10 ²	9,7 x 10 ¹
	Methode 2	10	9,2 x 10 ⁰	4,3 x 10 ¹	3,0 x 10 ¹
	Methode 3	10	1,0 x 10 ¹	8,0 x 10 ¹	3,9 x 10 ¹
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19 43 °C/10 x O:19		
10 ² KBE/g	Methode 1	10	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²
	Methode 2	10	2,3 x 10 ²	9,3 x 10 ²	5,4 x 10 ²
	Methode 3	10	n. n.	2,4 x 10 ²	1,4 x 10 ²
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19 43 °C/10 x O:19		
10 ³ KBE/g	Methode 1	10	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²
	Methode 2	10	2,3 x 10 ³	9,3 x 10 ³	5,2 x 10 ³
	Methode 3	10	1,1 x 10 ³	3,7 x 10 ³	2,7 x 10 ³
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19 43 °C/10 x O:19		

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

O:19: serologische Identifizierung mit O-Faktorseren

Kontaminationsgrad 10¹ KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

In den zehn untersuchten Proben des Substrates, das mit der Salmonellensuspension von 10¹ KBE/ml kontaminiert war und mit Methode 1 untersucht wurde, konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden: Die Minimal- und Maximalwerte lagen zwischen 2,1 x 10¹ KBE/g und >2,4 x 10² KBE/g, wobei der Mittelwert 9,7 x 10¹ KBE/g betrug.

Bei der Nachweismethode 2 konnten ebenfalls in allen zehn untersuchten Proben Salmonellen nachgewiesen werden. Der minimale Wert lag bei $9,2 \times 10^0$ KBE/g, der maximale bei $4,3 \times 10^1$ KBE/g und der errechnete Mittelwert betrug $3,0 \times 10^1$ KBE/g.

Mit der Methode 3 wurden in allen zehn untersuchten Proben Salmonellen nachgewiesen. Der ermittelte Mittelwert lag bei $3,9 \times 10^1$ KBE/g, wobei die Minimum- und Maximumwerte zwischen $1,0 \times 10^1$ KBE/g und $8,0 \times 10^1$ KBE/g lagen.

Kontaminationsgrad 10^2 KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Dieser Wert war zugleich der errechnete Minimum-, Maximum- und Mittelwert. Obgleich die Vorgehensweise der oben geschilderten Methode (siehe 3.2.1.3) entsprach, war eine genaue Berechnung nicht möglich.

Bei Methode 2 betrug der Minimalwert der zehn untersuchten Proben $2,3 \times 10^2$ KBE/g, wobei der Maximum- und der Mittelwert bei $9,3 \times 10^2$ KBE/g bzw. bei $5,4 \times 10^2$ KBE/g lag.

Bei Methode 3 betrug der Mittelwert $1,4 \times 10^2$ KBE/g. Bei einer der zehn untersuchten Proben war der Nachweis von Salmonellen nicht möglich, wobei der maximale Wert bei $2,4 \times 10^2$ KBE/g lag.

Kontaminationsgrad 10^3 KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Tabelle 10 demonstriert, dass die durch Methode 2 ermittelten Werte zwischen minimal $2,3 \times 10^3$ KBE/g und maximal $9,3 \times 10^3$ KBE/g lagen. Die ermittelte durchschnittliche Konzentration von *Salmonella Senftenberg* lag bei $5,2 \times 10^3$ KBE/g. Wie bei Methode 2 lagen die Ergebnisse der Salmonellenuntersuchungen mit Hilfe Methode 3 in einem Bereich von 10^3 KBE/g. Der Mittelwert betrug $2,7 \times 10^3$ KBE/g, Minimum und Maximum lagen bei $1,1 \times 10^3$ KBE/g bzw. $3,7 \times 10^3$ KBE/g.

Kontaminationsgrad 10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/g (Methode 4)

Bei allen 30 untersuchten Proben, die mit drei verschiedenen Konzentrationen beimpft waren (10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/g), konnte das Vorhandensein von *Salmonella Senftenberg* sowohl bei 37 °C als auch bei 43 °C auf beiden verwendeten Agarplatten (XLD und BPLS) morphologisch und serologisch nachgewiesen werden.

4.5.1.2 Gülleproben

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der Untersuchungen von 120 artifiziell kontaminierten Gülleproben mit vier verschiedenen Nachweismethoden beschrieben. In der folgenden Tabelle 11 sind die Minimum-, Maximum- und Mittelwerte von 120 untersuchten Proben dargestellt. Die Einzelergebnisse sind im Anhang in den Tabellen A 23 bis A 26 ersichtlich.

Tab. 11: Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von *Salmonella Senftenberg* in Gülleproben (Angaben in KBE/g)

Kontaminationsgrad	Verwendete Methode	Anzahl der Proben	Errechnete Werte		
			Minimum	Maximum	Mittelwert
10 ¹ KBE/g	Methode 1	10	2,4 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	6,9 x 10 ¹
	Methode 2	10	1,5 x 10 ¹	9,3 x 10 ¹	3,1 x 10 ¹
	Methode 3	10	n. n.	3,0 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19		43 °C/10 x O:19
10 ² KBE/g	Methode 1	10	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²
	Methode 2	10	1,5 x 10 ²	4,3 x 10 ²	2,7 x 10 ²
	Methode 3	10	2,1 x 10 ²	6,5 x 10 ²	3,8 x 10 ²
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19		43 °C/10 x O:19
10 ³ KBE/g	Methode 1	10	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²
	Methode 2	10	2,3 x 10 ³	7,5 x 10 ³	4,0 x 10 ³
	Methode 3	10	2,1 x 10 ³	5,7 x 10 ³	4,0 x 10 ³
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19		43 °C/10 x O:19

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

O:19: serologische Identifizierung mit O-Faktorseren

Kontaminationsgrad 10¹ KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Folgende Ergebnisse wurden bei Methode 1 ermittelt: Der Mittelwert von 10 untersuchten Proben betrug 6,9 x 10¹ KBE/g, wobei das Minimum und das Maximum bei 2,4 x 10¹ KBE/g bzw. 1,1 x 10² KBE/g lagen.

In allen zehn untersuchten Proben konnten Salmonellen nach Voranreicherung in Pepton bzw. nach Anreicherung in RAPPAPORT-VASSILIADIS-Selektivbouillon und XLD- bzw. BPLS-Platten (Methode 2) nachgewiesen werden. Der ermittelte Mittelwert lag bei 3,1 x 10¹ KBE/g, Minimum und Maximum bei 1,5 x 10¹ KBE/g bzw. 9,3 x 10¹ KBE/g.

Bei Methode 3 war in einer von insgesamt zehn untersuchten Proben der Nachweis nicht möglich. Der maximale Wert lag bei $3,0 \times 10^1$ KBE/g und der Mittelwert bei $1,5 \times 10^1$ KBE/g.

Kontaminationsgrad 10^2 KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Wie bei den Untersuchungen der Erdproben (Konzentration 10^2 und 10^3 KBE/g) war auch bei den Gülleproben eine genaue Quantifizierung durch Methode 1 nicht möglich. Die ermittelten Minimal-, Maximal- und Mittelwerte lagen bei allen 20 untersuchten Proben bei $>2,4 \times 10^2$ KBE/g.

Bei den Methoden 2 und 3 konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden: Nach der Voranreicherung in Pepton bzw. Anreicherung in RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon und Kultivierung auf XLD- und BPLS-Platten (Methode 2) lagen die Ergebnisse bei $1,5 \times 10^2$ KBE/g (Minimum), $4,3 \times 10^2$ KBE/g (Maximum) und $2,7 \times 10^2$ KBE/g (Mittelwert). Der minimale Wert der gezählten Salmonellenkolonien auf RAMBACH[®]-Agar (Methode 3) betrug $2,1 \times 10^2$ KBE/g, wobei Maximal- und Mittelwert $6,5 \times 10^2$ KBE/g bzw. $3,8 \times 10^2$ KBE/g betragen.

Kontaminationsgrad 10^3 KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Die Wiedergewinnung von Salmonellen bei einer Konzentration von 10^3 KBE/g der beimpften Gülleproben, die mit Methode 1 untersucht wurden, lagen bei allen 20 untersuchten Proben bei $>2,4 \times 10^2$ KBE/g.

In den zehn untersuchten Proben, die mit Methode 2 untersucht wurden, lagen die gewonnenen Konzentrationen in einem Bereich von 10^3 KBE/g. Dabei lag der Mittelwert bei einer Schwankungsbreite von $2,3 \times 10^3$ KBE/g (Minimum) und $7,5 \times 10^3$ KBE/g (Maximum) bei $4,0 \times 10^3$ KBE/g.

Durch Anwendung des Tetrathionates und des RAMBACH[®]-Agars (Methode 3) wurde in allen zehn untersuchten Proben eine Konzentration von 10^3 KBE/g ermittelt. Der durchschnittliche Wert lag bei $4,0 \times 10^3$ KBE/g, das Minimum und das Maximum bei $2,1 \times 10^3$ KBE/g bzw. $5,7 \times 10^3$ KBE/g.

Kontaminationsgrad 10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/g (Methode 4)

Aus den beimpften Substraten (Kontaminationsgrad 10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/g) konnten in allen 30 untersuchten Proben bei 37 °C und 43 °C Salmonellen wieder reisoliert werden.

4.5.1.3 Klärschlammproben

Das folgende Kapitel beschreibt die Ergebnisse der *Salmonella*-Untersuchungen von Klärschlammproben mit vier angewandten Methoden. In der folgenden Tabelle 12 sind die Minimum-, Maximum- und Mittelwerte von 120 untersuchten Proben dargestellt. Die Einzelergebnisse der sind im Anhang in den Tabellen A 27 bis A 30 aufgelistet.

Tab. 12: Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von *Salmonella Senftenberg* in Klärschlammproben (Angaben in KBE/g)

Kontaminationsgrad	Verwendete Methode	Anzahl der Proben	Errechnete Werte		
			Minimum	Maximum	Mittelwert
10 ¹ KBE/g	Methode 1	10	2,4 x 10 ¹	9,3 x 10 ¹	4,8 x 10 ¹
	Methode 2	10	9,2 x 10 ⁰	9,3 x 10 ¹	3,8 x 10 ¹
	Methode 3	10	1,0 x 10 ¹	4,0 x 10 ¹	1,5 x 10 ¹
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19		43 °C/10 x O:19
10 ² KBE/g	Methode 1	10	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²
	Methode 2	10	9,3 x 10 ¹	4,6 x 10 ²	2,9 x 10 ²
	Methode 3	10	3,0 x 10 ¹	2,8 x 10 ²	1,4 x 10 ²
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19		43 °C/10 x O:19
10 ³ KBE/g	Methode 1	10	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²	>2,4 x 10 ²
	Methode 2	10	4,3 x 10 ²	9,3 x 10 ³	3,2 x 10 ³
	Methode 3	10	5,0 x 10 ²	2,0 x 10 ³	1,1 x 10 ³
	Methode 4	10	37 °C/10 x O:19		43 °C/10 x O:19

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

O:19: serologische Identifizierung mit O-Faktorseren

Kontaminationsgrad 10¹ KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Die gewonnenen *Salmonella*-Konzentrationen im Klärschlamm, der mit einer Konzentration von 10¹ KBE/g beimpft war, lagen bei allen 3 quantitativen Methoden in einem durchschnittlichen Bereich von 10¹ KBE/g; bei Methode 1 4,8 x 10¹ KBE/g, bei Methode 2 3,8 x 10¹ KBE/g und bei Methode 3 1,5 x 10¹ KBE/g, wobei die minimalen Werte geringe Unterschiede in der Anzahl zeigten. Bei Methode 1 lag das Minimum bei 2,4 x 10¹ KBE/g, bei Methode 3 1,0 x 10¹ KBE/g, während das gewonnene Minimum der Proben, die mit Methode 2 untersucht wurden, 9,2 x 10⁰ KBE/g betrug. Der maximale Wert bei Methode 1 lag bei 9,3 x 10¹ KBE/g und entsprach damit dem von Methode 2. Bei Methode 3 betrug der maximale Wert 4,0 x 10¹ KBE/g.

Kontaminationsgrad 10^2 KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Bei einem Kontaminationsgrad von 10^2 KBE/g und 10^3 KBE/g war bei Methode 1 eine strikte Auswertung durch das vorgeschriebene MPN-Verfahren (siehe 3.2.1.3) nicht möglich. Auffallend ist, dass dieses Verfahren bei höheren Kontaminationsgraden als 10^1 KBE/g bei allen untersuchten Substraten die gleichen Ergebnisse lieferte ($>2,4 \times 10^2$ KBE/g).

Bei Methode 2 wurden folgende Ergebnisse ermittelt: Der Mittelwert der Salmonellenzahlen lag bei $2,9 \times 10^2$ KBE/g, wobei das Minimum und das Maximum bei $9,3 \times 10^1$ KBE/g bzw. $4,6 \times 10^2$ KBE/g lagen.

Tabelle 12 zeigt, dass die durch Methode 3 gewonnenen Werte zwischen minimal $3,0 \times 10^1$ KBE/g und maximal $2,8 \times 10^2$ KBE/g lagen. Der ermittelte Mittelwert betrug $1,4 \times 10^2$ KBE/g.

Kontaminationsgrad 10^3 KBE/g (Methode 1, 2 und 3)

Abweichend vom Kontaminationsgrad von 10^3 KBE/g enthielten bei Methode 2 zwei der zehn untersuchten Proben eine Konzentration von $4,3 \times 10^2$ KBE/g (Minimum) bzw. $7,2 \times 10^2$ KBE/g. Der Mittelwert betrug $3,2 \times 10^3$ KBE/g und der maximale Wert lag bei $9,3 \times 10^3$ KBE/g.

Vier von zehn Klärschlammproben, die mit Methode 3 untersucht worden waren, wichen ebenfalls vom Kontaminationsgrad ab (siehe Tabelle A 29). Dabei lag der Minimumwert der Salmonellen bei $5,0 \times 10^2$ KBE/g, während das Maximum $2,0 \times 10^3$ KBE/g betrug. Der Mittelwert lag jedoch bei der Konzentration von 10^3 KBE/g bzw. $1,1 \times 10^3$ KBE/g.

Kontaminationsgrad 10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/g (Methode 4)

Der qualitative Nachweis von *Salmonella Senftenberg* in 50 g Probe wurde in allen 30 untersuchten Proben sowohl bei allen 3 Kontaminationsgraden als auch bei 37 °C und bei 43 °C morphologisch und serologisch bestätigt.

4.5.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse

4.5.2.1 Erdproben

Bei Methode 1 wurden die Standardabweichung (SD) und das 95 % Vertrauensintervall (95 % CI) für die Kontaminationsgrade 10^2 und 10^3 KBE/g nicht berechnet, da diese Werte größer als $>2,4 \times 10^2$ KBE/g (der maximale Wert der De MAN-MPN Tabelle) waren, und damit zu ungenau sind, um sie in die Berechnung miteinzubeziehen.

Tab. 13: Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Erdproben
(Angaben in KBE/g)

KG	Verwendete Methode	Anzahl der Proben	Mittelwert	SD	95 % CI
10^1 KBE/g	Methode 1	10	$9,7 \times 10^1$	$9,92 \times 10^1$	$9,7 \times 10^1 \pm 6,15 \times 10^1$
	Methode 2	10	$3,0 \times 10^1$	$1,35 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1 \pm 1,50 \times 10^1$
	Methode 3	10	$3,9 \times 10^1$	$2,23 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1 \pm 1,38 \times 10^1$
10^2 KBE/g	Methode 1	10	$>2,4 \times 10^2$	n. d.	n. d.
	Methode 2	10	$5,4 \times 10^2$	$2,81 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2 \pm 2,96 \times 10^2$
	Methode 3	10	$1,4 \times 10^2$	$7,30 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2 \pm 4,53 \times 10^1$
10^3 KBE/g	Methode 1	10	$>2,4 \times 10^2$	n. d.	n. d.
	Methode 2	10	$5,2 \times 10^3$	$2,96 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3 \pm 3,09 \times 10^3$
	Methode 3	10	$2,7 \times 10^3$	$8,11 \times 10^2$	$2,7 \times 10^3 \pm 5,03 \times 10^2$

KG: Kontaminationsgrad

SD: Standardabweichung

95 % CI: 95 % Vertrauensintervall

n. d.: nicht durchgeführt

KBE: koloniebildende Einheiten

Bei einem Kontaminationsgrad von 10^1 KBE/g ergaben sich folgende Resultate: Die Ergebnisse der 10 Proben, die mit Methode 2 untersucht wurden, zeigten die geringste Standardabweichung und hatten das kleinste 95 % Vertrauensintervall (siehe Tab. 13). Vergleichbar gute Ergebnisse ergaben sich auch mit Methode 3. Die Ergebnisse mit der größten Schwankungsbreite, verdeutlicht durch die größte Standardabweichung und das größte 95 % Vertrauensintervall, lieferte Methode 1.

Bei den Proben, die mit einer Konzentration von 10^2 KBE/ml beimpft wurden, lieferte Methode 3 die genauesten Werte mit der geringsten Standardabweichung und dem kleinsten 95 % Vertrauensintervall. Diese Methode beruht auf Zählung von Einzelkolonien und ist dadurch zumindest theoretisch genauer als die Methoden 1 und 2, die beide auf dem MPN-Verfahren beruhen. Methode 2 lieferte Ergebnisse, mit einem Mittelwert von

$5,4 \times 10^2$ KBE/g und einer Standardabweichung von $2,81 \times 10^2$ KBE/ml. Das 95 % Vertrauensintervall für Methode 2 ist mit $\pm 2,96 \times 10^2$ um dem Mittelwert von $5,4 \times 10^2$ KBE/ml deutlich höher als für Methode 3, und daher scheinbar weniger genau als Methode 3.

Bei einem Kontaminationsgrad von 10^3 KBE/g wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Die Werte der 10 Proben, die mit Methode 3 untersucht wurden, zeigten die geringste Standardabweichung und hatten das kleinste 95 % Vertrauensintervall (siehe Tab. 13).

Bei Methode 2 ist das 95 % Vertrauensintervall mit $\pm 3,09 \times 10^3$ um den Mittelwert von $5,2 \times 10^3$ KBE/ml deutlich höher als bei Methode 3 und liefert daher weniger robuste Daten als Methode 3.

4.5.2.2 Gülleproben

Da die Ergebnisse bei Methode 1 (Kontaminationsgrad 10^2 und 10^3 KBE/g) größer als $2,4 \times 10^2$ KBE/g (der maximale Wert der De MAN-MPN Tabelle) waren, wurden bei dieser Methode die Standardabweichung (SD) sowie das 95 % Vertrauensintervall (95 % CI) nicht berechnet.

Tab. 14: Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Gülleproben
(Angaben in KBE/g)

KG	Verwendete Methode	Anzahl der Proben	Mittelwert	SD	95 % CI
10^1 KBE/g	Methode 1	10	$6,9 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$	$6,9 \times 10^1 \pm 1,86 \times 10^1$
	Methode 2	10	$3,1 \times 10^1$	$2,39 \times 10^1$	$3,1 \times 10^1 \pm 1,48 \times 10^1$
	Methode 3	10	$1,5 \times 10^1$	$8,50 \times 10^0$	$1,5 \times 10^1 \pm 5,27 \times 10^0$
10^2 KBE/g	Methode 1	10	$>2,4 \times 10^2$	n. d.	n. d.
	Methode 2	10	$2,7 \times 10^2$	$1,13 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2 \pm 7,02 \times 10^1$
	Methode 3	10	$3,8 \times 10^2$	$1,63 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2 \pm 1,01 \times 10^2$
10^3 KBE/g	Methode 1	10	$>2,4 \times 10^2$	n. d.	n. d.
	Methode 2	10	$4,0 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3 \pm 9,57 \times 10^2$
	Methode 3	10	$4,0 \times 10^3$	$1,11 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3 \pm 6,89 \times 10^2$

KG: Kontaminationsgrad

SD: Standardabweichung

95 % CI: 95 % Vertrauensintervall

n. d.: nicht durchgeführt

KBE: koloniebildende Einheiten

Bei einem Kontaminationsgrad von 10^1 KBE/g ergaben sich aus den beimpften Gülleproben folgende Resultate: Die Ergebnisse, die mit der Methode 1 gewonnen wurden,

zeigten die größte Standardabweichung und das größte 95 % Vertrauensintervall. Im Gegensatz zur Methode 1, lieferte Methode 3 die genauesten Werte, und auch die geringste Standardabweichung und das kleinste 95 % Vertrauensintervall. Bei Methode 2 sind die Standardabweichung mit $2,39 \times 10^1$ KBE/ml und 95 % Vertrauensintervall mit $\pm 1,48 \times 10^1$ um den Mittelwert von $3,1 \times 10^1$ KBE/ml höher als bei Methode 3.

Bei den Proben, die mit einer Konzentration von 10^2 KBE/ml beimpft wurden, zeigten die Werte, die mit Methode 2 und 3 gewonnen wurden vergleichbar gute Ergebnisse. Die jeweiligen Standardabweichungen lagen in einem Bereich von 10^2 KBE/g ($1,13 \times 10^2$ KBE/g bei Methode 2 und $1,63 \times 10^2$ KBE/g bei Methode 3). Im Gegensatz zur Standardabweichung der beiden Methoden, war das 95 % Vertrauensintervall mit $\pm 1,01 \times 10^2$ um den Mittelwert von $3,8 \times 10^2$ KBE/g bei Methode 3 deutlich höher als bei Methode 2 ($2,7 \times 10^2 \pm 7,02 \times 10^1$).

Bei den Proben, die mit einer Konzentration von 10^3 KBE/ml beimpft wurden, zeigten die mit Methode 3 gewonnenen Ergebnisse eine geringere Standardabweichung und hatten ein kleineres 95 % Vertrauensintervall als bei Methode 2 (siehe Tabelle 14).

4.5.2.3 Klärschlammproben

Die Standardabweichung (SD) und das 95 % Vertrauensintervall (95 % CI) wurden bei Methode 1 für die Kontaminationsgrade 10^2 und 10^3 KBE/g nicht berechnet, da die Werte größer als $2,4 \times 10^2$ KBE/g (der maximale Wert der MPN Tabelle) waren.

Tab. 15: Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Klärschlammproben
(Angaben in KBE/g)

KG	Verwendete Methode	Anzahl der Proben	Mittelwert	SD	95 % CI
10^1 KBE/g	Methode 1	10	$4,8 \times 10^1$	$1,71 \times 10^1$	$4,8 \times 10^1 \pm 1,06 \times 10^1$
	Methode 2	10	$3,8 \times 10^1$	$2,27 \times 10^1$	$3,8 \times 10^1 \pm 1,41 \times 10^1$
	Methode 3	10	$1,5 \times 10^1$	$9,72 \times 10^0$	$1,5 \times 10^1 \pm 6,02 \times 10^0$
10^2 KBE/g	Methode 1	10	$>2,4 \times 10^2$	n. d.	n. d.
	Methode 2	10	$2,9 \times 10^2$	$1,45 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2 \pm 8,96 \times 10^1$
	Methode 3	10	$1,4 \times 10^2$	$8,69 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2 \pm 5,39 \times 10^1$
10^3 KBE/g	Methode 1	10	$>2,4 \times 10^2$	n. d.	n. d.
	Methode 2	10	$3,2 \times 10^3$	$2,54 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3 \pm 1,58 \times 10^3$
	Methode 3	10	$1,1 \times 10^3$	$5,30 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3 \pm 3,29 \times 10^2$

KG: Kontaminationsgrad

n. d.: nicht durchgeführt

SD: Standardabweichung

KBE: koloniebildende Einheiten

95 % CI: 95 % Vertrauensintervall

Bei einem Kontaminationsgrad von 10^1 KBE/g ergaben sich folgende Resultate: Die Ergebnisse der 10 Proben, die mit Methode 3 untersucht wurden, zeigten die geringste Standardabweichung und hatten das kleinste 95 % Vertrauensintervall (siehe Tab. 15).

Vergleichbare Ergebnisse lieferten Methode 1 und 2, die beide auf einem MPN-Verfahren beruhen. Methode 2 lieferte Ergebnisse, mit einem Mittelwert von $3,8 \times 10^1$ KBE/g und einer Standardabweichung von $2,27 \times 10^1$ KBE/g, die etwas größer war als bei Methode 1 mit $1,71 \times 10^1$ KBE/g. Das 95 % Vertrauensintervall für Methode 2 ($\pm 1,41 \times 10^1$ um den Mittelwert von $5,4 \times 10^2$ KBE/g) war ebenfalls etwas größer als bei Methode 1 ($\pm 1,06 \times 10^1$ um den Mittelwert von $4,8 \times 10^1$ KBE/g).

Bei den Proben, die mit einer Konzentration von 10^2 KBE/ml beimpft wurden, zeigten die mit Methode 3 gewonnenen Ergebnisse eine geringere Standardabweichung ($8,69 \times 10^1$ KBE/g) als bei Methode 2 ($1,45 \times 10^2$ KBE/g), wobei das 95 % Vertrauensintervall der beiden Methoden in einem vergleichbaren Bereich von 10^1 KBE/g lag (siehe Tabelle 15).

Bei den Proben, die mit einer Konzentration von 10^3 KBE/ml beimpft wurden, lieferte Methode 3 die genauesten Werte, veranschaulicht durch die geringste Standardabweichung und das kleinste 95 % Vertrauensintervall. Methode 2 lieferte Ergebnisse, mit einem Mittelwert von $3,2 \times 10^3$ KBE/g und einer Standardabweichung von $2,54 \times 10^3$ KBE/ml. Das 95 % Vertrauensintervall für Methode 2 ist mit $\pm 1,58 \times 10^3$ um den Mittelwert von $3,2 \times 10^3$ KBE/g deutlich höher als bei Methode 3.

4.5.3 *Escherichia coli*-Untersuchungen

Das folgende Kapitel beschreibt die Ergebnisse der *Escherichia coli*-Untersuchungen von 30 Bioabfall-, 30 Klärschlamm-, 30 Gülle- und 30 Speiseabfallproben mit zwei unterschiedlichen MPN-Methoden.

Eine Zusammenfassung der gesamten Ergebnisse findet sich in der folgenden Tabelle 16.

Die Einzelergebnisse der *Escherichia coli*-Untersuchungen sind im Anhang in den Tabellen A 31 bis A 32 aufgelistet.

Tab. 16: Zusammenfassende Ergebnisse der Untersuchungen zum Nachweis von *Escherichia coli* aus vier verschiedenen Substraten mit zwei unterschiedlichen MPN-Methoden

Herkunft der untersuchten Proben	Errechnete Werte (in KBE/ml)	Makromethode	Mikromethode
Bioabfall (n=30)	Minimum	$9,2 \times 10^0$	$3,7 \times 10^1$
	Maximum	$2,3 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$
	Median	$4,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$
Klärschlamm (n=30)	Minimum	$2,3 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
	Maximum	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
	Median	$1,5 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$
Gülle (n=30)	Minimum	$2,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
	Maximum	$1,5 \times 10^6$	$5,8 \times 10^4$
	Median	$4,3 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$
Speiseabfälle (n=30)	Minimum	$1,5 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$
	Maximum	$4,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
	Median	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$

KBE: koloniebildende Einheiten

n: Anzahl der untersuchten Proben

4.5.3.1 Bioabfallproben

In allen 30 untersuchten Bioabfallproben wurde *Escherichia coli* quantitativ nachgewiesen. Die *Escherichia coli*-Medianwerte, die mit der Makro- und der Mikromethode gewonnen wurden, wiesen eine Differenz um mehr als eine Zehnerpotenz auf, d. h. der Medianwert der Makromethode lag bei $4,3 \times 10^4$ KBE/ml, der der Mikromethode bei $3,3 \times 10^3$ KBE/ml. Die minimalen Werte lagen bei $9,2 \times 10^0$ KBE/ml bei der Makromethode und bei $3,7 \times 10^1$ KBE/ml bei der Mikromethode. Im Vergleich zur Makromethode, bei der das Maximum bei $2,3 \times 10^6$ KBE/ml lag, betrug die höchste gewonnene Keimzahl bei der Mikromethode $5,6 \times 10^5$ KBE/ml.

4.5.3.2 Klärschlammproben

In allen 30 untersuchten Klärschlammproben konnte *Escherichia coli* nachgewiesen werden. In der Tabelle 16 sind die ermittelten Minimal-, Maximal- und Medianwerte der beiden Methoden zum Nachweis von *Escherichia coli* aus dem Klärschlamm dargestellt.

Wie aus Tabelle 16 zu entnehmen ist, betrug die gewonnenen Mittelwerte bei der Makromethode $1,5 \times 10^3$ KBE/ml und $5,2 \times 10^2$ KBE/ml bei der Mikromethode. Während die minimalen Werte in einem Bereich von 10^2 KBE/ml lagen, $2,3 \times 10^2$ KBE/ml bei der Makromethode und $2,0 \times 10^2$ KBE/ml bei der Mikromethode, zeigten die ermittelten maximalen Werte einen Unterschied von einer Zehnerpotenz. So betrug das Maximum der Makromethode $2,3 \times 10^4$ KBE/ml, während es bei der Mikromethode bei $2,1 \times 10^3$ KBE/ml lag.

4.5.3.3 Gülleproben

Wie bei den bakteriologischen Untersuchungen zum Vorkommen von *Escherichia coli* in Bioabfall und in Klärschlamm wurden auch hier 30 Proben vergleichend mit zwei fluoreszenzoptischen Methoden untersucht.

Im Vergleich zum Nachweis von *Escherichia coli* aus Bioabfall und Klärschlamm, bei denen die Medianwerte jeweils differierten, lag hier der Medianwert bei den vergleichenden Methoden im Bereich von 10^4 KBE/ml; $4,3 \times 10^4$ KBE/ml bei der Makromethode und $3,5 \times 10^4$ KBE/ml bei der Mikromethode.

Die ermittelten Maximumwerte der 30 untersuchten Proben betrug bei der Makromethode $1,5 \times 10^6$ KBE/ml und $5,8 \times 10^4$ KBE/ml bei der Mikromethode. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied von fast zwei Zehnerpotenzen. Die Keimzahlen für *Escherichia coli* lagen im Minimum bei $2,3 \times 10^4$ KBE/ml (Makromethode) und bei $1,2 \times 10^4$ KBE/ml (Mikromethode). Dabei wurde ein geringfügiger Unterschied zwischen diesen beiden gewonnenen Werten ermittelt.

4.5.3.4 Speiseabfallproben

In allen 30 untersuchten Proben aus nicht hygienisierten Speiseabfällen einer Biogasanlage wurde *Escherichia coli* quantitativ nachgewiesen. Die durch das MPN-Verfahren errechneten Keimzahlen von *Escherichia coli*, die mit den zwei quantitativen Methoden ermittelt wurden, sind zusammenfassend in der Tabelle 16 dargestellt.

Bei einer Schwankungsbreite von Minimum $1,5 \times 10^3$ KBE/ml bis Maximum $4,3 \times 10^4$ KBE/ml betrug der Medianwert der 30 untersuchten Proben, die mit der Makromethode untersucht wurden, $2,2 \times 10^4$ KBE/ml. Bei den bakteriologischen Untersuchungen der Speiseabfallproben mit der Mikromethode lag der ermittelte Medianwert bei $2,3 \times 10^3$ KBE/ml bzw. betrug er eine Zehnerpotenz weniger als beim

Medianwert der Makromethode. Der Maximalwert lag bei der Mikromethode im gleichen Bereich wie bei der Makromethode und betrug $1,6 \times 10^4$ KBE/ml. Dabei wies der Minimalwert im Vergleich zur Makromethode eine Differenz von einer Zehnerpotenz auf und lag bei $8,0 \times 10^2$ KBE/ml.

5 Diskussion

5.1 Anmerkung zu den Keimträgerversuchen

Um einen realistischen Inaktivierungsverlauf von Testorganismen während des Hygienisierungsprozesses und dem Prozess der anaeroben Vergärung von Speiseabfällen ermitteln zu können, müssen die zu untersuchenden Mikroorganismen so optimal wie möglich an das in der Biogasanlage vorhandene Milieu angepasst werden.

Dies kann am besten durch Einbringen der zu untersuchenden Mikroorganismen in das Fermentersubstrat erzielt werden. Nach dem Einbringen der Mikroorganismen werden in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen und auf ihren Gehalt an vermehrungsfähigen Mikroorganismen untersucht. Dies erweist sich in der Praxis allerdings als problematisch. Als Hauptproblem bei der direkten Kontamination von Fermenterinhalt gilt die mögliche Weiterverbreitung von u. a. pathogenen Mikroorganismen in der Umwelt. Im mesophilen Faulprozess der Anaerobreaktoren kann zwar eine Reduktion an Pathogenen, nicht jedoch eine Inaktivierung erreicht werden (STRAUCH 1981; BENDIXEN 1998; EDER 2001; STAFFA 2003). Als zweites Problem erweist sich die große Menge an herzustellender Suspension und die homogene Verteilung in der Biogasanlage. Diese Problematik wird auch von anderen Autoren beschrieben (HOFERER 2001; KNIE et al. 2001). Außerdem werden manche untersuchten Bakterien wie z. B. *Listeria monocytogenes* sehr leicht in ihrem Wachstum von anderen Bakterien gehemmt, was den Nachweis erschwert. Weiterhin ist zu beachten, dass manche Mikroorganismen wie z. B. *Enterococcus faecalis* nach dem Einmischen in das Substrat durch kulturellen Nachweis nicht mehr von nativen Enterokokken unterschieden werden können (BÖHM 2003). Wegen der oben genannten Schwierigkeiten wurden von verschiedenen Autoren geeignete Keimträger etabliert (SPIELMANN et al. 1987; PESARO et al. 1995; RAPP 1995) und durch BRAUMILLER (2000), MOSS (2000) und HOFERER (2001) weiterentwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Systeme für die Tenazitätsversuche angewandt:

- a) beim Keimträger Typ 1 (Volumenkeimträger) nach RAPP (1995) werden die ausgewählten Bakterien bereits vor der Einbringung in den Reaktor und Hygienisierungsbehälter mit dem entsprechenden Substrat gemischt.
- b) die Keimträger Typ 2 (Sandwich-Keimträger) nach PESSARO (1995) und HOFERER (2001) dienen für Versuche mit Testviren, wobei der Keimträger erst nach dem Einbringen in den Hygienisierungsbehälter mit dem Substrat in Kontakt kommt.

Die Tenazitätsversuche im Hygienisierungsbehälter sollen dazu dienen, ob die Temperatur-Zeitkombination von 70 °C/30 min ausreicht, um die zu überprüfenden „Indikatororganismen“, die stellvertretend für relevante Pathogene angewandt werden, zu inaktivieren.

Mit den durchgeführten Tenazitätsversuchen im mesophilen Temperaturbereich soll gezeigt werden, inwieweit der Prozess der anaeroben Vergärung geeignet ist, die ausgewählten Bakterien zu reduzieren. Für diese Versuche wurden *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Senftenberg W775* und *Escherichia coli* als Testbakterien verwendet.

Aus arbeitstechnischen Gründen konnten Tenazitätsversuche mit Viren und anderen im Hygienisierungsbehälter verwendeten seuchenhygienisch relevanten Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* und *Yersinia enterocolitica* während der mesophilen Vergärung nicht durchgeführt werden. Außerdem waren wichtige Hinweise durch die Ergebnisse von HOFERER (2001) vorhanden. Er stellte fest, dass eine Inaktivierung von Viren in mesophilen Temperaturbereich nicht möglich ist.

Bei der Einbringung von Keimträgern Typ 1 in den Reaktor wurde berücksichtigt, dass die positionierten Keimträger bezüglich der Temperatur und dem chemischen Milieu repräsentativ für das gesamte Substrat sind. Eine gute technische Möglichkeit die o. g. Bedingungen zu realisieren, stellen die drei Tauchröhren dar, durch die die Keimträger in die zwei Ebenen eingebracht werden konnten (siehe 3.1.2.2).

Die Wahl der Einbringungsstelle der Keimträger Typ 1 und Typ 2 neben den Temperatursensoren im unteren Bereich des Hygienisierungsbehälters erschien hierbei als die technisch günstigste Stelle (siehe 3.1.2.1.1).

Aus den Ergebnissen der pH-Werte und den Temperaturmessungen (siehe Tab. 5) geht hervor, dass die Unterschiede im Faulraummilieu der untersuchten Biogasanlage gering sind. Dies ist auf die Nassfermentation von Speiseabfällen (Monovergärung) zurückzuführen; ihr geringer Trockensubstanzgehalt bedingt die gute Homogenität des Reaktorinhaltes. Die Lokalisation der Keimträger in der untersuchten Anlage scheint daher nicht von vordergründiger Bedeutung.

5.2 Bewertung der Inaktivierung von Testbakterien im Hygienisierungsbehälter

Die ermittelten Ergebnisse bei den durchgeführten Versuchen zeigen eine Elimination an allen untersuchten Bakterien ohne insgesamt große Unterschiede in der Tenazität der einzelnen Bakterien aufzuweisen.

5.2.1 *Listeria monocytogenes*

In der Literatur sind bisher wenige Angaben über die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in biogenen Abfällen und unter den Bedingungen der Hygienisierung und anaeroben Behandlung zu finden.

Diese Bakterien kommen im Darm klinisch gesunder Tiere vor und werden mit dem Kot ausgeschieden. Auch bei den anderen biologischen Substraten, z. B. Erde, Silage, Schlamm, konnte das Vorkommen dieses Bakteriums beobachtet werden (SAHLSTRÖM

2003). Bei der Kofermentation von biologischen Abfällen besteht daher die Möglichkeit des Eintrages in Biogasanlagen. *Listeria monocytogenes* ist ein weltweit verbreiteter Lebensmittelerreger (FARBER 1989; BÜLTE 2004c) und hierdurch besteht theoretisch die Möglichkeit seines Vorkommens während der Fermentation von Speiseabfällen in Biogasanlagen. Die Tenazität von Listerien wird besonders von der hohen Temperatur- und pH-Wert-Toleranz geprägt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass durch eine Temperaturerhöhung auf 70 °C für die Dauer von 67,4 min eine Reduktion von *Listeria monocytogenes* um mehr als acht Zehnerpotenzen bewirkt wird. Eine Reduktion von acht Zehnerpotenzen im thermophilen Bereich (55 °C) eines Reaktors wurde auch in den Untersuchungen von BURTSCHER et al. (1998) festgestellt. Die *Listeria monocytogenes*-Konzentration von 10⁸ KBE/ml Substrat wurde innerhalb von 2 h eliminiert. Außer thermischen Einflüssen kann die Eliminierung von *Listeria monocytogenes* durch einen saueren pH-Wert von 3,7 unterstützt werden. ROLLE u. MAYR (1978) führen an, dass es bei einem pH unter 5,6 oft zum Absterben der Listerien-Kulturen kommt. In natursaurer Milch gehen die Keime zugrunde, falls der pH unter 4,2 sinkt. GASPAROVIC (1988) berichtet, dass *Listeria monocytogenes* in artifiziell kontaminierten Milchproben bei Temperaturen von 65-75 °C nach 10-40 Sekunden und bei 85 °C schon innerhalb 1 Sekunde abgetötet wird. Seine Versuche zeigen ebenso, dass der Wärmetotpunkt bei 58-59 °C innerhalb von 10 min erreicht wird. Nach BÜLTE (2004c) gilt als sicherstes Verfahren zur Abtötung von *Listeria monocytogenes* eine Durcherhitzung von Lebensmitteln auf Kerntemperaturen von > 70 °C.

5.2.2 *Yersinia enterocolitica*

Als Lebensmittelinfektionserreger hat *Yersinia enterocolitica* eine große Bedeutung (SAHLSTRÖM 2003). Ihr Vorkommen in Speiseabfällen eröffnet die Möglichkeit, dass sie auch in Biogasanlagen vorzufinden sind. Gegenüber Hitzeneinwirkung ist *Yersinia enterocolitica* wie andere Enterobakterien besonders empfindlich. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Untersuchungsabschnitt zur Bestimmung der Keimzahlreduktion während des Hygienisierungsprozesses wurde ermittelt, dass bis zum Erreichen von 70 °C die Keimkonzentration von *Yersinia enterocolitica* bereits um mehr als acht Zehnerpotenzen im Vergleich zur Nullprobe reduziert wurde (Abb. 8). Das Testbakterium war nicht mehr nachweisbar.

In der Literatur wurden keine Angaben gefunden, die unter den gleichen Bedingungen zustande kamen wie in den eigenen Untersuchungen. Die Hitzeempfindlichkeit von *Yersinia enterocolitica* konnte in diversen Untersuchungen während mesophiler als auch thermophiler Faulung bestätigt werden (KEARNEY et al. 1993a; KEARNEY et al. 1993b; KEARNEY et al. 1994; BURTSCHER et al. 1998). Bereits 1982 stellte SWAMINATHAN fest, dass Yersinien die Pasteurisierung nicht überleben.

Neben Höhe und Einwirkungsdauer der Temperatur ist anzumerken, dass das Substrat im Hygienisierungsbehälter einen pH-Wert von 3,7 hatte. Nach KLEER (2004) liegen die pH-Grenzwerte für die Vermehrung von Yersinien zwischen 4,2 bzw. 9,6.

5.2.3 *Salmonella Senftenberg* W 775

Bei den vorliegenden Ergebnissen zur Keimzahlreduktion von *Salmonella Senftenberg* W775 während der Aufheizphase sowie der eigentlichen Hygienisierung muss berücksichtigt werden, dass dieser Testkeim im Vergleich zu den anderen untersuchten Testbakterien eine höhere Tenazität hat ($D_{65,6\text{ °C}} = 0,8\text{-}1,0\text{ min}$). Die hohe Thermoresistenz von *Salmonella Senftenberg* W775 gegenüber anderen *Salmonella*-Serovaren z. B. *Salmonella Blockey* und *Salmonella Typhimurium* konnten schon HENRY et al. (1969) feststellen. Nach der Empfehlung einer mit diesem Salmonellenserovar befassten Expertengruppen der Weltgesundheitsorganisation (WHO 1988) sollte *Salmonella Senftenberg* W775 aufgrund ihrer hohen Resistenz als Testorganismus zur Beurteilung der Wirksamkeit von Erhitzungsverfahren verwendet werden.

Die erste Konzentrationsabnahme von einer Zehnerpotenz wurde nach 33 min festgestellt, wobei eine deutliche Eliminierung um mehr als neun Zehnerpotenzen nach 67,4 min stattfand. Am Beginn der eigentlichen Hygienisierung lag der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W775 bereits unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml. Auch KNIE et al., (2001) konnten schon eine deutliche Reduktion der *Salmonella*-Konzentration um mehr als sechs Zehnerpotenzen zu Beginn der Pasteurisierung feststellen. Die Untersuchungen von MITSCHERLICH u. MARTH (1984; zit. bei SAHLSTRÖM 2003) ergaben, dass Salmonellen in erhitztem Schlamm bei einer Temperatur von 70 °C nicht länger als 5 min überleben können. Dass die Pasteurisierung ein effektiver Weg zur Inaktivierung von *Salmonellen* ist, konnte in den Untersuchungen von WARD et al. (1999) bestätigt werden. Hier wurden Salmonellen nach der Pasteurisierung (70 °C/0,5 h) nicht mehr nachgewiesen. Eine totale Eliminierung von *Salmonella Typhimurium* und *Salmonella Senftenberg* ermittelte PLYM-FORSHELL (1995) innerhalb von 24 h bei 55 °C in der Gülle. In den eigenen Untersuchungen wurden keine Tenazitätsversuche mit *Salmonella Senftenberg* W775 in einem thermophilen Bereich durchgeführt, wobei die vorgelegten Ergebnisse und auch die o. g. Untersuchungen bestätigen, dass die Behandlung bei höheren Temperaturen einen sicheren Weg zur Inaktivierung von Salmonellen darstellt.

Die in den eigenen Untersuchungen ermittelten Inaktivierungsraten von *Salmonella Senftenberg* W775 H_2S negativ um mehr als neun Zehnerpotenzen übertreffen damit die Forderungen der Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006a), die für die Validierung des biotechnologischen Verfahrens von Biogasanlagen eine Verminderung von $5 \log 10$ von *Salmonella Senftenberg* W775 H_2S negativ fordert.

5.2.4 *Escherichia coli*

Um ein breites Spektrum von seuchenhygienisch- und umweltrelevanten Bakterien testen zu können, wurde zusätzlich *Escherichia coli* getestet.

Durch eine Temperaturerhöhung auf 70 °C wurde das Testbakterium schon bei der dritten Probenahme, die am Beginn der eigentlichen Hygienisierung erfolgte, sicher eliminiert. Hier wurde eine Keimzahlreduktion um fast neun Zehnerpotenzen ermittelt. In den vorliegenden Ergebnissen (vgl. Pkt. 4.1.6) wurde offensichtlich, dass *Escherichia coli* als ein testrelevanter Keim keine große Tenazitätsunterschiede zu den anderen getesteten Bakterien zeigte. Das Tenazitätsverhalten von *Escherichia coli* in den eigenen Untersuchungen bestätigt die Tatsache, dass die Behandlung bei höheren Temperaturen wesentlich weniger Zeit benötigt, um pathogene Mikroorganismen zu inaktivieren. So wurde in den Untersuchungen von ESTRADA et al. (2004) eine Reduktion von *Escherichia coli* von vier Zehnerpotenzen bei 70 °C in einer Zeitspanne von 5 min festgestellt, das Testbakterium wurde dabei eliminiert. Auch WARD et al. (1999) berichten, dass in pasteurisiertem Substrat (70 °C/0,5 h) kein Nachweis von *Escherichia coli* mehr möglich war.

In den Untersuchungen von KNIE et al. (2001) wurde bei im Verlauf der Pasteurisierung mit Aufheizphase eine Keimreduktion von sechs Zehnerpotenzen schon beim Erreichen von 70 °C beobachtet, bzw. der Nachweis lag unter der Nachweisgrenze von 10¹ KBE/ml. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Tenazitätsversuche im thermophilen Bereich durchgeführt, wobei die Untersuchungen von OLSEN u. LARSEN (1987), WATANABE et al. (1997), SAHLSTRÖM et al. (2004) und JUTEAU et al. (2004) bestätigten, dass auch die niedrigen Temperaturbereiche (50 °C-60 °C) bei der anaeroben Behandlung *Escherichia coli* inaktivieren können.

5.2.5 *Campylobacter jejuni*

Das Vorkommen von *Campylobacter jejuni* in Bioabfällen bzw. in Speiseresten stammt aus Kontaminationen. Lebensmittel tierischer Herkunft können potentiell durch fäkale Verunreinigungen von *Campylobacter*-Ausscheidern (Geflügel, Rindern, domestizierte Schweine) kontaminiert werden (DOYLE 1984). *Campylobacter jejuni* gelangen hauptsächlich über Fäkalien von Tier und Mensch in die Umwelt. STAMPI et al. (1998) sind der Meinung, dass das *Campylobacter* nicht für ein hohes Gesundheitsrisiko gehalten werden muss, wenn es sich in der Umwelt durch behandelten Schlamm ausbreitet.

Die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* ist unterschiedlich lang. Nach STELZER et al. (1991) können diese Bakterien aus Abwässern von wenigen Stunden bis zu zehn Tagen isoliert werden.

Bei den vorliegenden Ergebnissen zur Tenazität von *Campylobacter jejuni* muss berücksichtigt werden, dass dieses Bakterium in einer hohen Konzentration in die Keimträger eingebracht wurde, die in der Praxis normalerweise nicht vorkommt. Die

optimale Bebrütungstemperatur von *Campylobacter jejuni* liegt bei 42 °C, weshalb er meist in so geringen Mengen in Lebensmitteln vorkommt (BÜLTE 2004a). Die Ergebnisse von Outputmaterial einer Biogasanlage (KNIE et al. 2001) zeigten, dass die ermittelten Konzentrationen von nachgewiesenen *C. jejuni* zwischen $2,3 \times 10^0$ und $3,6 \times 10^{-1}$ KBE/ml lagen und damit knapp über der Nachweisgrenze.

Die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* während bzw. nach einer anaeroben Behandlung hängt vom Temperaturbereich des Vergärungsprozesses ab. KEARNEY et al. (1993a, 1993b) konnten keine totale Eliminierung dieses Bakterium während der mesophilen Vergärung (35 °C) von Rindergülle feststellen. Im Gegensatz zu den Effekten einer mesophilen Vergärung liefert die thermophile Behandlung andere Ergebnisse. JUTEAU et al. (2004) berichten, dass Temperaturen von 50-60 °C und 70 °C ausreichen, um *Campylobacter jejuni* während der anaeroben Behandlung in der Gülle bei einer Dauer von 6 d zu inaktivieren. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die vorliegenden fünf durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits nach der Probenahme bei 70 °C kein Nachweis von *Campylobacter jejuni* mehr möglich ist. In einer Zeitdauer von 67,4 min bzw. am Beginn der eigentlichen Hygienisierung bei 70 °C wurde die ermittelte Keimzahl bereits um mehr als sieben Zehnerpotenzen reduziert (siehe Abb. 11), das Testbakterium war nicht mehr nachweisbar. Das vorgefundene Ergebnis entspricht in etwa einer Keimzahlreduktion von *Campylobacter jejuni* durch Pasteurisierung ohne Aufheizphase (1 h bei 70 °C), wo eine Reduktion um mehr als sieben Zehnerpotenzen ermittelt wurde (KNIE et al. 2001). Nach DOYLE u. ROMAN (1981) wurde *Campylobacter jejuni* durch eine Erhitzung auf 55 °C innerhalb der ersten Minute um 90 % reduziert, was die eigenen Ergebnisse bestätigt.

5.2.6 *Enterococcus faecalis*

Es ist bekannt, dass die meisten der definitionsgemäß den Fäkalstreptokokken zugeordneten Spezies eine außerordentlich hohe Thermoresistenz besitzen. Das gilt vor allem für Enterokokken (MUNDT 1986). *Enterococcus faecalis* wurde daher als testrelevantes Bakterium zur Beurteilung der Wirkung einer Temperaturbehandlung im Hygienisierungsbehälter verwendet. BERG u. BERGMAN (1980) sowie LARSEN et al. (1994) sehen die Enterokokken als relevanteste Testorganismen zur Bewertung einer hygienischen Behandlung von Bioabfällen in den Biogasanlagen. Nach MOSSEL (1978) weisen Streptokokken der Serogruppe D verglichen mit Enterobakterien eine höhere Thermoresistenz auf. In den eigenen Untersuchungen zur Bestimmung der Keimzahlreduktion während der Aufheizphase und der eigentlichen Hygienisierung konnte dies bestätigt werden. Außerdem wurde eine höhere Thermoresistenz gegenüber anderen Testbakterien festgestellt. Bei der Bestimmung der Keimkonzentration nach der ersten und zweiten Probenentnahme (50 °C und 60 °C) wurde keine Abnahme des Mikroorganismus mehr festgestellt. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Mikroorganismen war der Nachweis von *Enterococcus faecalis* am Beginn der eigentlichen Hygienisierung noch

möglich. Es handelte sich aber nur um eine Konzentration von $3,6 \times 10^0$ KBE/ml. Diese Ergebnisse waren nicht überraschend und korrespondieren mit den Ergebnissen der folgenden Tenazitätsversuche, in denen die hohe Hitzeresistenz von Enterokokken nachgewiesen wurde. In Wasserbaduntersuchungen von POHLIG-SCHMITT (1987) zeigte *Enterococcus faecalis* bei 54 °C in einer Dauer von 6 h eine Abnahme von acht Zehnerpotenzen. BREITENFELD (2000) wies *Enterococcus faecium* bei einer Temperatur von 55 °C in 24 h nach. BANWART (1983) stellte eine Überlebensfähigkeit von Enterokokken bei 60-65 °C über 30 min fest. KNIE et al. (2001) konnten eine Reduktion um sechs Zehnerpotenzen am Beginn der Hygienisierung feststellen, wobei der Verlauf der Keimkonzentration durch Pasteurisierung in Versuchen ohne Aufheizphase (1 h) zeigte, dass sich die ermittelten Konzentrationen nach 1 h zwischen $< 0,30$ und $4,3 \times 10^2$ KBE/ml bewegten. Dass die Temperatur der wichtigste Faktor für das Überleben von pathogenen Bakterien während einer Temperaturbehandlung ist (FARRAH u. BITTON 1983), konnte mit den Ergebnissen des Temperaturverhaltens von *Enterococcus faecalis* in der vorliegenden Arbeit nochmals nachgewiesen werden. Die Inaktivierung von Pathogenen ist u. a. von der Konzentration des Testkeimes abhängig (STRAUCH 1991). Trotzdem wurden alle seuchenhygienisch relevante Testbakterien vollständig inaktiviert, obwohl sie in hohen Konzentration in den Hygienisierungsreaktor eingebracht wurden.

Die in den eigenen Untersuchungen ermittelten Inaktivierungsraten von *Enterococcus faecalis* um mehr als acht Zehnerpotenzen entsprechen damit den Bedingungen der Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006a), die für die Validierung des Hygienisierungsverfahrens in den Biogasanlagen eine Verminderung von 5 log 10 fordern.

5.3 Bewertung der Inaktivierung von ausgewählten Testviren im Hygienisierungsbehälter

Die ermittelten Ergebnisse in den drei durchgeführten Versuchen zeigten einen Unterschied in der Tenazität der drei ausgewählten Testviren. Bei zwei dieser untersuchten Testviren (FCV und ECBO-Virus) wurde eine Elimination festgestellt.

5.3.1 Felines Calicivirus (FCV)

In der Literatur sind bisher keine Angaben zur Tenazität von FCV in biogenen Abfällen und in anaeroben Behandlungsprozessen zu finden. Möglicherweise liegt der Grund dafür einerseits in der geringen Resistenz der Caliciviren gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Andererseits ist bisher seine Bedeutung in Infektionsgeschehen unterschätzt worden.

Ein der Familie *Caliciviridae* zugehörendes Virus ist das Norwalk-Virus (KAADEN 2002). Es ist weltweit verbreitet und für einen Großteil der nicht bakteriell bedingten, ansteckenden Magen-Darm-Erkrankungen verantwortlich. Eine der wichtigsten Ansteckungsquellen sind Lebensmittel (ANON. 2003d). So wurden dem Robert-Koch-

Institut z. B. im Jahr 2002 51.749 Erkrankungsfälle mitgeteilt. Es muss vereinzelt mit der Kontamination von Lebensmitteln mit Norwalk-Virus gerechnet werden. Unerkannt gelangen diese Viren damit auch in die Biotonne und bei anaerober Verwertung von diesen Abfällen in Biogasanlagen.

Die Tenazität des Norwalk-Virus in einem anaeroben Behandlungsverfahren kann nicht getestet werden, da seine Vermehrung in Zellkultur bis heute noch nicht möglich ist (DOULTREE et al. 1999). Deshalb wurde in den eigenen Untersuchungen FCV als Ersatz für das Norwalk-Virus verwendet.

In den drei Versuchsdurchgängen wurde deutlich, dass Felines Calicivirus kein testrelevantes Virus ist. Die Inaktivierung des Virus erfolgte schon 42,3 min nach dem Einbringen in den Hygienisierungsbehälter. Bei der zweiten Probenahme, die bei 60 °C erfolgte, war das Virus um fünf Zehnerpotenzen inaktiviert und damit eliminiert. Der saure pH-Wert von 3,6 im Hygienisierungsbehälter könnte hierbei eine wichtige Rolle gespielt haben, da nach Angabe von KAADEN (2002) die Caliciviren bei pH-Werten von 3-5 rasch inaktiviert werden. Die Tenazität von Felinem Calicivirus wurde von DOULTREE et al. (1999) beschrieben. In deren Labortenzitätsversuchen wurde festgestellt, dass eine Temperaturexposition bei 56 °C mit der Dauer vom 1 h ausreichte, das Virus zu eliminieren. Eine 1-3 min dauernde Erwärmung auf 70 °C führte zur Teilinaktivierung ($10^{4,5} \Rightarrow 10^{1,0}$ KID₅₀/ml), wobei eine totale Reduktion nach 5 min stattfand. Diese Ergebnisse bestätigen die Thermolabilität des FCV, wie sie auch in den eigenen Untersuchungen festgestellt wurden.

5.3.2 ECBO-Virus

Das ECBO-Virus zeigt im Vergleich mit dem Felinen Calicivirus eine höhere Tenazität. Die Konzentration der Nullprobe wurde innerhalb von 83,6 min um mehr als sechs Zehnerpotenzen reduziert, d. h. am Beginn der eigentlichen Hygienisierung bei 70 °C war der Nachweis des Virus nicht mehr möglich.

Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können mit denen der virologischen Tenazitätsuntersuchungen von WINTER (2002) verglichen werden. Dort wurde die seuchenhygienische Effizienz der vorgeschalteten Pasteurisierungsstufe getestet. Noch in der Aufheizphase wurde die ermittelte Ausgangskonzentration von $10^{6,5}$ (KID₅₀/ml) des ECBO-Virus innerhalb von 30 min bzw. beim Erreichen von 70 °C völlig inaktiviert. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, in denen die Keimträger in den Hygienisierungsreaktor bei einer Temperatur von 37,5 °C eingebracht wurden, fand in den Untersuchungen von WINTER (2002) die Inaktivierung des ECBO-Virus bei einer Temperatur ab 56 °C statt. Diese Temperaturunterschiede der Aufheizphasen und die Dauer der Einwirkung erklären die unterschiedlichen Inaktivierungsverläufe des getesteten Virus.

Die Ergebnisse der Wasserbaduntersuchungen von REHMAN (1987), in denen u. a. auch das ECBO-Virus getestet wurde, zeigten ein ähnliches Temperaturverhalten dieses Virus.

Der Temperaturverlauf bis zu 50 °C reichte dabei nicht aus, um eine vollständige Inaktivierung des Virus zu bewirken. Das ECBO-Virus wurde in diesen Untersuchungen bei Temperaturen um 70 °C innerhalb von 10 min inaktiviert. In der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht bestätigt werden. Die ermittelte Ausgangskonzentration an ECBO-Virus war bei 50 °C nur um eine Zehnerpotenz reduziert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von REHMAN (1987) war der Nachweis von ECBO-Virus in den eigenen Untersuchungen am Anfang des eigentlichen Hygienisierungsprozesses nicht mehr möglich. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass beim ersten Verfahren (REHMAN 1987) ein konstanter Temperaturbereich und beim zweiten Verfahren bzw. in den eigenen Untersuchungen, ein Temperaturverlauf angewandt wurde.

Weitere Vergleiche der eigenen Untersuchungsergebnisse mit den in der Literatur erwähnten, können nur bedingt durchgeführt werden, da diese nur die Inaktivierung von ECBO-Virus im mesophil- oder thermophilen betriebenen Bereich schildern (LUND et al. 1996; PINKEPANK et al. 1997; HOFERER 2001). Dabei wurde keine Inaktivierung von ECBO-Virus während eines Temperaturverlaufes festgestellt. Dennoch erfahren die dargelegten Ergebnisse eine Bestätigung durch Untersuchungen von LUND et al. (1996). Bei ihnen wurde in einem thermophilen Reaktor eine Abnahme um vier Zehnerpotenzen in einer Zeitspanne von 30 min festgestellt. HOFERER (2001) konnte eine Titerreduktion von vier Zehnerpotenzen in einem thermophilen Reaktor (55 °C) innerhalb von 0,5 h nachweisen.

5.3.3 Bovines Parvovirus (BPV)

BPV wurde aufgrund seiner bekanntlich hohen Tenazität von verschiedenen Autoren als Indikatororganismus für die Überprüfung von Hygienisierungsprozessen in höheren Temperaturbereichen (50-80 °C) vorgeschlagen (BENDIXEN 1994; LUND et al. 1996; HOFERER 2001; KNIE et al. 2001; WINTER 2002). Die eigenen Untersuchungen bestätigten seine hohe Temperaturresistenz. Die ermittelte Virus-Konzentration von $10^{4,50}$ (KID₅₀/ml) wurde weder in der Vorerhitzungsphase noch während der eigentlichen Hygienisierung vollständig eliminiert. So betrug die reduzierte Virus-Konzentration am Beginn der eigentlichen Hygienisierung $10^{2,0}$ (KID₅₀/ml). Nach einer weiteren konstant verlaufenden Erhitzung auf 70 °C über die Dauer von 0,5 h betrug die Konzentration immer noch $10^{1,25}$ (KID₅₀/ml). Ähnliche Ergebnisse konnten schon KNIE et al. (2001) feststellen. Auch bei einer einstündigen Erhitzung auf 70 °C konnte BPV nicht eliminiert werden. Schon LEUZE (1984) u. MONTEITH et al. (1986) hatten an pasteurisiertem Klärschlamm keine vollständige Inaktivierung feststellen können.

Nach REHMAN (1987) fand eine vollständige Inaktivierung von Parvovirus bei 90 °C und einer Einwirkungszeit von 20 min statt. Auch die Temperatur von 70 °C war nicht geeignet, um das Parvovirus zu inaktivieren.

Dass die Hygienisierungsstufe in Bezug auf Temperatur- und Zeit-Einstellungen das Parvovirus nicht sicher eliminieren kann, konnte WINTER (2002) durch seine

Untersuchungen bestätigen. Die ermittelten Konzentrationen an Bovinem Parvovirus lagen je nach Versuchsdurchgang zwischen $10^{6,8}$ und $10^{7,9}$ (KID₅₀/ml), und diese wurden in einer Zeitspanne von 90 min nicht inaktiviert. Der Anfang des Tenazitätsverhaltens von Bovinem Parvovirus fand bei den Temperaturen zwischen 56 °C und 63 °C statt, und dabei verlor das untersuchte Virus im Mittel nur um 0,9 und 3,7 Zehnerpotenzen an der ermittelten Ausgangskonzentration. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen waren die Untersuchungsbedingungen (Anfangstemperatur und Einwirkungsdauer) unterschiedlich. Die entscheidenden Temperaturhöhen wurden aber in beiden Untersuchungen erreicht.

In den Tenazitätsversuchen von SPILLMANN et al. (1987) wurde das BPV während einer Erhitzung bei 70 °C (30 min) um 0,7 log₁₀ reduziert. Dieses Verhalten korrespondiert mit der Reduktion des Virus in der vorgelegten Arbeit, d. h. in einer Zeitspanne von 30 min wurde eine Abnahme von 0,75 (KID₅₀/ml) ermittelt.

Ein ähnliches Tenazitätsverhalten von ECBO- und Parvovirus während eines Inaktivierungsprozesses konnten WEKERLE et al. (1987) in ihren Untersuchungen feststellen. Das ECBO-Virus konnte nach der Inaktivierungsphase trotz einer höheren Konzentration kaum nachgewiesen werden, während das Parvovirus bei einer niedrigeren Konzentration häufig überlebte.

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Tenazitätsuntersuchungen unter Verwendung des Bovinen Parvovirus im Hygienisierungsbehälter waren nach dem damals geltenden Tierkörperbeseitigungsrecht zur Erhitzung der Speiseabfälle 70 °C für 30 min gefordert. Die Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006a) verlangt eine Erhitzung der Kat 3-Materialien (inclusive Speiseabfälle) bei 70 °C 60 min lang. In den eigenen Untersuchungen wurden von Bovinem Parvovirus die geforderte 3 log 10 Titerreduktionen nicht erreicht (ANON. 2006a). Mit großer Wahrscheinlichkeit ist allerdings davon auszugehen, dass bei einer Verlängerung der Erhitzungszeit von 30 min auf 60 min Bovines Parvovirus um mindestens 3 log 10 reduziert worden wäre.

5.4 Bewertung der Inaktivierung von ausgewählten Testbakterien im mesophilen Reaktor

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Tenazität ausgewählter Testbakterien aus den drei Tauchröhren der oberen und unteren Ebenen im Bezug auf den Ort der Probenentnahme keine nennenswerten Unterschiede aufweisen. Deshalb wurden die dargestellten Ergebnisse im Bezug auf einzelne Bakterienarten diskutiert.

Nach den drei Versuchsdurchgängen wurde festgestellt, dass die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* W775 in den Proben, die nach 24 h entnommen worden waren, sich nur geringfügig geändert hat. Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Autoren aus den Keimträgerversuchen Typ 1 (POHLIG-SCHMITT 1987; PINKEPANK et al. 1997; KNIE et al. 2001; HOFERER 2001) in einem mesophilen Reaktor. Trotz günstiger pH-

und Temperaturbedingungen im mesophilen Temperaturbereich war der Nachweis des Testbakteriums nach einer Woche nicht mehr möglich. So konnten PINKEPANK et al. (1997) in einer mesophilen Biogasanlage (30 °C) *Salmonella Senftenberg* W775 bereits nach 6 d Aufenthaltszeit quantitativ nicht mehr nachweisen. Die Untersuchungen von POHLIG-SCHMITT (1987) hinsichtlich der Salmonelleninaktivierung führten zu ähnlichen Ergebnissen, die die eigenen Untersuchungen ebenfalls ergaben. Der quantitative Nachweis von *Salmonella Senftenberg* W775 im Faulschlamm einer mesophil betriebenen Biogasanlage (34 °C) konnte nach 6 d Aufenthaltszeit nicht mehr erbracht werden. GADRE et al. (1986) berichten dass *Salmonella Typhimurium* nach der anaeroben Faulung bei 37 °C nach 9 d nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse von HOFERER (2001), KNIE et al. (2001) und TERMORSHUIZEN et al. (2003) widersprechen den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen. So war bei KNIE et al. (2001) die Quantifizierung von Salmonellen in einem mesophil betriebenen Reaktor einer Laboranlage (33 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 7 d immer noch möglich. Die ermittelte Konzentration betrug $2,1 \times 10^3$ KBE/ml. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von HOFERER (2001) festgestellt. In den Untersuchungen der erwähnten Autoren wurde keine Monovergärung vorgenommen, sondern es wurde Gülle mitverwertet. Neben den möglichen Substrateinflüssen, die inaktivierend oder auch unterstützend auf die Mikroorganismen wirken können, ist jedoch davon auszugehen, dass die um 5-7 °C höheren Temperaturwerte im Anaerobenreaktor eine kürzere Überlebenszeit der untersuchten Salmonellen bewirkt haben als in den Untersuchungen von HOFERER (2001) und KNIE et al. (2001). Die einzige Ausnahme innerhalb der eigenen Untersuchungen wurde nach der zweiten Probenentnahme in der unteren Ebene der Tauchröhre 1 festgestellt, wo die ermittelte Konzentration von 10^1 KBE/ml den Ergebnissen von KNIE et al. (2001) und HOFERER (2001) entspricht.

Für Abweichungen zwischen den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen und denen der erwähnten Autoren liefert SOLDIERER (1991) Erklärungen. So stellte er zum einen fest, dass Unterschiede zwischen Labor- und Praxisbedingungen bestehen. In Praxisanlagen findet die Eliminierung, bedingt durch verschiedene versuchstechnische Besonderheiten, schneller statt. Über Unterschiede zwischen Praxis- und Laboranlagen berichten auch CARRINGTON et al. (1982). Neben den methodisch bedingten Einflüssen und der Temperatur ist weiterhin davon auszugehen, dass auch noch andere hier nicht erfasste Parameter einen Einfluss auf die Keimreduktion haben.

Die Tenazität von *Escherichia coli* war in allen durchgeführten Versuchsdurchgängen ähnlich der von *Salmonella Senftenberg* W775. Innerhalb einer Woche war *Escherichia coli* um mehr als sieben Zehnerpotenzen reduziert bzw. nicht mehr nachweisbar. Die Inaktivierung von *Escherichia coli* K12 während einer anaeroben Vergärung (35 °C) von Schlamm konnte in den Untersuchungen von KEARNEY et al. (1993a) nach 4 d Aufenthaltszeit festgestellt werden. Dabei fand eine Reduktion des Bakteriums um acht Zehnerpotenzen statt. Andere Autoren, wie z. B. HOFERER (2001), konnten eine Elimination von *Escherichia coli* bei einer Kofermentation bei 35 °C mit Speiseresten und

Rindergülle nach 6 d nicht beobachten. Bei den Versuchen konnte *Escherichia coli* mit einer Konzentration von 10^3 KBE/ml nachgewiesen werden und dabei kam es zu einer Reduktion von 5 Zehnerpotenzen. Als mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Tenazität von *Escherichia coli* in einem mesophilen Bereich kann hier auf oben beschriebene Thermoresistenz von *Salmonella Senftenberg* W775 verwiesen werden.

Bei den Tenazitätsversuchen mit *Enterococcus faecalis* zeigte sich, dass die Reduktion der Konzentration an *Enterococcus faecalis* zwischen einer und zwei Zehnerpotenzen erst nach einer Woche Aufenthaltszeit ermittelt werden konnte. Der Nachweis von *Enterococcus faecalis* war bis zum Versuchsende möglich.

Stellt man die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen von *Enterococcus faecalis* denen früherer Untersuchungen gegenüber (OLSEN 1988; PHILLIP u. BÖHM 1997; MARTENS et al. 1999; HOFERER 2001; KNIE et al. 2001), so zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung in der Tenazität des Testbakteriums. Weiterhin wurde deutlich, dass die anaerobe Fermentation im mesophilen Temperaturbereich allein keine ausreichend sichere Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* ermöglicht. Damit konnten die Ergebnisse der Untersuchungen von WATANABE et al. (1997) bestätigt werden, wonach eine Inaktivierung von Enterokokken bei 35 °C und einer Aufenthaltszeit von 30 d nicht möglich war.

Wie aus den Ergebnissen der Tauchröhre 3 zu entnehmen ist (siehe Abbildungen 25 und 26), kann *Enterococcus faecalis* nach einer Aufenthaltszeit von 14 d um mehr als sieben Zehnerpotenzen reduziert werden. Zwar konnte auch hier das Bakterium weiterhin nachgewiesen werden, doch die Konzentration lag bei $9,4 \times 10^0$ KBE/ml. Der Grund dafür könnte in den hier nicht erfassten Parametern bzw. in dem Zusammenwirken von Redoxpotential, NH_3 -Konzentration etc. liegen wie es HAAS et al. (1995) und PESARO et al. (1995) beschrieben haben.

Allerdings zeigte *Enterococcus faecalis* eine höhere Thermoresistenz im Vergleich mit *Escherichia coli* und *Salmonella Senftenberg* W775.

5.5 Bewertung der bakteriologischen Untersuchungen des Substrates vor und nach der Hygienisierung und anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“)

Es wurden hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an Substraten einer anaeroben Biogasanlage zur Monovergärung von Speiseresten durchgeführt. Über eine Zeitspanne von ca. sechs Monaten wurden kontinuierlich in Abständen von etwa 7 d Input- und Outputproben gezogen und auf das Vorkommen von Salmonellen, Gesamtcoliforme, Fäkalcoliforme sowie Enterokokken untersucht.

In keiner der untersuchten Input- und Outputproben wurden Salmonellen nachgewiesen. Der negative Nachweis von Salmonellen erfüllt damit die Anforderungen der BioAbfV, wonach in 50 g Outputmaterial keine Salmonellen enthalten sein dürfen. Durch die

anaerobe Behandlung der biologischen Abfälle (Speisereste) wird in der untersuchten Biogasanlage ein seuchenhygienisch unbedenkliches Endprodukt erzeugt. Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 208 (ANON. 2006a) dürfen in 25 g Fermentationsrückstände keine Salmonellen enthalten sein. Es ist davon auszugehen, dass bei der Untersuchung von 50 g der Probe höhere Nachweisraten erzielt werden können (HAUMACHER 2003). Generell muss immer die Möglichkeit des Vorkommens von Salmonellen in Speiseabfällen in Betracht gezogen werden, da Lebensmittelvergiftungen mit diesen Krankheitserregern häufig sind (TSCHÄPE u. BOCKEMÜHL 2002; ANON. 2003d; KLEER 2004; ANON. 2006c) und somit auch eine Kontamination des Beschickungsmaterials (Speisereste, Bioabfälle) einer Biogasanlage nicht ausgeschlossen werden kann. In den Untersuchungen von GIESS (1992) konnte beobachtet werden, dass Speiseabfälle und Lebensmittel tierischen Ursprungs als Hauptquellen für Salmonellen im Bioabfall gelten. In den eigenen Untersuchungen wurde die Herkunft der untersuchten Inputproben bzw. Speiseabfälle, bei denen es sich um bereits vorerhitzte oder noch rohe Speisereste handelte, jedoch nicht berücksichtigt. Während der gesamten Untersuchungszeit lag der gemessene pH-Wert in der Vorgrube zwischen 3,4 und 3,9. Nach KLEER (2004) werden Salmonellen unterhalb eines pH-Wertes von 3,8 in ihrem Wachstum gehemmt. FUKUSHI et al. (2003) und STEVIK et al. (2004) fanden heraus, dass pH-Werte unter 5,0 zu einer Inaktivierung von Salmonellen führen. Salmonellen, die möglicherweise schon vor der Untersuchung im Inputmaterial vorhanden waren, wurden somit vermutlich durch den sauren pH-Wert des Substrates in der Vorgrube abgetötet, zumindest jedoch dezimiert. Sollten in der Vorgrube dennoch Salmonellen vorhanden sein, die nicht durch die angewandte Methode nachgewiesen werden konnten (vgl. Pkt. 3.2.1.6), würden diese spätestens in der nachfolgenden Hygienisierung inaktiviert werden, wie die eigenen Untersuchungen zur Inaktivierung von Salmonellen im Hygienisierungsbehälter (vgl. Pkt 4.1.5) zeigen. Auch KNIE et al. (2001) haben dies festgestellt.

Die Zahl an Enterokokken in der Vorgrube lag durchschnittlich bei $4,6 \times 10^6$ KBE/ml. Außer einer lebensmittelhygienischen Bedeutung, bei der Enterokokken als Lebensmittelvergifter eine Rolle spielen, besitzen Enterokokken eine hohe pH- und Temperaturreistenz (TISLER 1987), was ihr Vorkommen im sauren Milieu in der Vorgrube erklären könnte. Nach der Hygienisierung konnten in 12 von 25 untersuchten Proben Enterokokken nachgewiesen werden. Die Keimzahl in den Proben aus der Beschickungsgrube lag jedoch durchschnittlich unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml, maximal konnten $9,2 \times 10^1$ KBE/ml nachgewiesen werden.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konnten Enterokokken in den vier mesophilen Reaktoren nachgewiesen werden. Die Keimzahl lag durchschnittlich zwischen $2,3 \times 10^2$ und $9,3 \times 10^2$ KBE/ml. Das Einschleusen von Enterokokken in die vier Reaktoren ist durch das Impfsubstrat geschehen, das als „Starterkultur“ eingebracht wurde. Am 22.07.2002 fand eine erstmalige Befüllung der Fermenter statt, wobei die Hälfte des Reaktorvolumens mit Wasser gefüllt wurde. Weiterhin wurden 26 m^3 ausgefaultes Gärmaterial als Starterkultur aus einer Biogasanlage, die mit Speiseabfällen in

Kofermentation betrieben wird, gleichmäßig auf alle vier Reaktoren verteilt. Das restliche Volumen (304 m^3) wurde mit ausgefaulten Klärschlamm aus einer Kläranlage aufgefüllt. Aus technischen Gründen konnten diese Impfsubstrate nicht bakteriologisch untersucht werden. Da Enterokokken jedoch stets im Klärschlamm vorhanden sind (SLANETZ u. BARTLEY 1966), ist davon auszugehen, dass das Impfsubstrat eine unbestimmte Zahl von Enterokokken enthielt, die bei den folgenden Untersuchungen nachgewiesen wurden.

Wie in Pkt. 4.4.3 erläutert wurde, stieg die ermittelte Konzentration von Enterokokken in den Reaktoren in den letzten drei Monaten der Untersuchung um zwei Zehnerpotenzen an (Maximum $2,3 \times 10^5$ KBE/ml). Eine mögliche Erklärung für den Konzentrationsanstieg könnte die Temperatur in den mesophilen Reaktoren sein, die zwischen $38,3\text{-}40,0$ °C lag, denn nach SELBITZ (2002) vermehren sich Enterokokken in einem Temperaturbereich zwischen $10\text{-}45$ °C. Außer einem optimalen Temperaturbereich, wurde die Vermehrung von Enterokokken auch durch die günstigen pH-Werte der Reaktoren unterstützt (pH: $6,51\text{-}8,22$).

Das Tenazitätsverhalten von Enterokokken bestätigte die von KABRICK u. JEWELL (1982) sowie WATANABE et al. (1997) vertretene These, dass in einem mesophilen Bereich keine vollständige Eliminierung von Pathogenen stattfindet.

Aus technischen Gründen (vgl. Pkt. 4.4.4) fand die erste Probenahme aus dem Nachfermenter (Outputproben) am 26.09.02 statt. In den 19 untersuchten Proben betrug die durchschnittliche Konzentration von Enterokokken $2,3 \times 10^2$ KBE/ml. Parallel mit dem Anstieg der Konzentrationen der Enterokokken in den Reaktoren stieg die Konzentration auch im Nachfermenter an (Maximalwert $2,4 \times 10^4$ KBE/ml). Als Erklärung für diese gleichzeitige Erhöhung der Konzentration kann hier auf die oben geäußerten Vermutungen verwiesen werden. Durch den Rat des Europäischen Parlaments (ANON. 2006a) wird die Anforderung gestellt, wonach in fünf Proben von Fermentationsrückständen nicht mehr als 5×10^3 KBE/g Enterokokken nachgewiesen werden dürfen. Damit hat der ermittelte Maximalwert an Enterokokken in den eigenen Untersuchungen die Anforderungen nach Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006) um 1 log 10 überschritten. Der Medianwert der 19 untersuchten Proben lag allerdings bei $2,5 \times 10^2$ KBE/g. Damit liegt der Medianwert der 19 untersuchten Proben exakt 1 log 10 unterhalb des in der Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANON. 2006a) definierten Norm von 5×10^3 KBE/g Substrat.

Gesamtcoliforme und Fäkalcoliforme wurden in der Vorgrube in einer durchschnittlichen Konzentration von $2,3 \times 10^1$ KBE/ml ermittelt, wobei die Zahl in den letzten 10 untersuchten Proben um ca. fünf Zehnerpotenzen stieg, was mit der Herkunft der Speiseabfälle erklärt werden könnte. Nach der erforderlichen Hygienisierung lag die Konzentration dieser heterogenen Bakteriengruppe in der Beschickungsgrube und in den Reaktoren unter der Nachweisgrenze von 10^1 KBE/ml.

5.6 Diskussion der verwendeten Methoden zum kulturellen Nachweis von Salmonellen

Die wissenschaftliche Literatur, die sich den Methoden und den unterschiedlichen Medien für die Isolierung speziell von Salmonellen widmet, ist sehr komplex und in sich häufig widersprüchlich. Festzuhalten bleibt zunächst, dass sowohl die unterschiedlichen Vorgehensweisen als auch die jeweiligen Ergebnisse von folgenden Parametern abhängen (WALTMAN 2000):

- der Art, der Menge und der Herkunft der untersuchten Proben
- der Frage, ob die Proben artifiziell oder natürlich kontaminiert sind
- der Verwendung bzw. der Art der Voranreicherung
- der Art und Zusammensetzung der Anreicherung
- der Inkubationstemperatur und Zeitdauer der Anreicherung
- den verwendeten festen Nährböden.

Für die Beurteilung der in der vorliegenden Arbeit getesteten Methoden, waren die folgenden drei Kriterien von besonderer Wichtigkeit:

- Entsprechen die vorgegebenen Verfahrensschritte sowie die verwendeten Materialien, den bereits in der Literatur beschriebenen?
- Konnten die drei eingesetzten *Salmonella*-Konzentrationen (10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/ml) wiedergewonnen werden und wie ist die Genauigkeit der getesteten Methoden?
- Sind die verwendeten Methoden für alle drei untersuchten Substrate (Klärschlamm, Erde und Gülle) geeignet?

Für die nachfolgende Diskussion sei vorausgeschickt, dass in den vorliegenden Untersuchungen lediglich artifiziell kontaminierte Proben untersucht wurden.

Es hat sich während der eigenen Untersuchungen gezeigt (siehe 4.5.1 und 4.5.2), dass die unterschiedlichen Substrate keinen Einfluss auf die ermittelten Werte hatten. Daher wird in der folgenden Diskussion die Herkunft der untersuchten Proben bzw. des beimpften Materials nicht berücksichtigt.

Im Einzelnen werden nun die folgenden Schritte der Untersuchungen eingehend diskutiert:

- Bewertung des Voranreicherungsverfahrens
- Bewertung des Anreicherungsverfahrens
- Bewertung der selektiven Nährböden
- Bewertung von *Salmonella Senftenberg* als relevantes Testbakterium für die Validierung der Nachweismethoden
- Bewertung der gewonnenen Ergebnisse

5.6.1 Bewertung des Voranreicherungsverfahrens

Die bisherige Forschung hat dargelegt, dass sowohl das direkte Ausstreichen von untersuchten Salmonellen auf einem selektiven Agar als auch die direkte selektive Anreicherung ohne Voranreicherung der bestimmten Probenarten oft erfolglos für die Isolierung von Salmonellen ist (WALTMAN 2000). Bei Untersuchungen von Proben bezüglich des Vorkommens von Salmonellen hat die Anzüchtung in einem flüssigen Medium gegenüber dem direkten Ausstrich auf einem Nährboden viele Vorteile. HARVEY u. PRICE (1979) erklären es damit, dass das Inokulum sich in einem flüssigen Medium verträglicher verhält als in einem festen Medium.

In den eigenen Untersuchungen wurde stets mit einem vorangereicherten Substrat gearbeitet. Eine Ausnahme hiervon bildete die Filtrationsmethode (Methode 3).

Für eine optimale Wiederbelebung von Salmonellen erforderten die untersuchten Proben (getrocknet, erhitzt, bestrahlt oder anderweitig behandelt) die Verwendung einer nicht selektiven Voranreicherung. In diesen Proben traten gelegentlich Salmonellen auf, die bereits vorgeschädigt waren. Diese subletal geschädigten Salmonellen konnten bei der Isolierung ohne Voranreicherung, jedoch bei Verwendung selektiver Anreicherungsbouillons und vor allem bei höheren Temperaturen leicht getötet werden (CORRY et al., 1969). Eine selektive Anreicherungsbouillon kann durch ihre Zusammensetzung toxisch auf die vorgeschädigten Salmonellen wirken. Dies kann verhindert werden, indem zuvor eine nichtselektive Voranreicherung zur Wiederbelebung verwendet wird (THOMASON et al. 1977). EDEL u. KAMPELMACHER (1973), VASSILIADIS (1983), FRICKER (1984), FRICKER et al. (1985), ANDREWS (1986) und BAILEY et al. (1988) kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass eine Voranreicherung für die Untersuchung auf Salmonellen notwendig ist.

KELL et al. (1998) beschreibt mit dem Begriff „injured“ (geschädigt) bzw. „viable but not culturable“ (lebensfähig aber nicht vermehrungsfähig) Bakterien, die nicht in der Lage sind, auf einem festen Medium Kolonien zu bilden.

Diese geschädigten Bakterien verlieren in einem Minimalmedium vorübergehend ihre Fähigkeit, sich zu vermehren. In nährstoffreichen oder Komplettmedien ist dies nicht der Fall (BUSTA 1978).

Während der eigenen Untersuchungen wurde das untersuchte Substrat artifiziell kontaminiert und dadurch der Stress für die Salmonellen gemildert. Eine metabolische Aktivität von Salmonellen in den kontaminierten Substraten bzw. in einem Minimalmedium wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Für die Voranreicherung von Salmonellen werden in der Literatur verschiedene Bouillons beschrieben. In den eigenen Untersuchungen wurde bei Methode 1, Methode 2 und Methode 4 die folgenden Voranreicherungen verwendet:

Methode 1 (MPN-Methode): Selenit-Cystein, das eigentlich in der Literatur als selektive Anreicherungsbouillon beschrieben ist

Methode 2 (MPN-Methode): gepuffertes Peptonwasser als nicht selektive Voranreicherung

Methode 4 (qualitativer Nachweis): entspricht der Methode 2 mit dem Unterschied, dass dem Peptonwasser Novobiocin zugegeben wird, um eine größere Selektivität zu ermöglichen.

Eines der in der Forschung zuerst verwendeten Medien war die Laktosebouillon. Diese war allerdings nicht optimal geeignet, da durch den steigenden pH-Wert eine Hemmung bzw. Abtötung der Salmonellen resultierte (HILKER 1975). Widersprüchliche Angaben jedoch macht ANDREWS (1996) mit dem Hinweis, dass Laktosebouillon eine Quelle von Kohlehydraten und Peptonen als Eiweiß bildet und sich damit als eine Voranreicherungsbouillon für die Isolierung von Salmonellen eignet. Dabei ist wichtig zu betonen, dass die meisten Salmonellen keine Laktose spalten können. Nach ANDREWS (1996) liegt der Vorteil der Laktosebouillon darin, dass die in ihr befindlichen Salmonellen sich gegenüber steigenden pH-Werten als widerstandsfähiger erweisen.

Weiterentwickelte Voranreicherungsbouillons werden ohne einen vergärbaren Zucker hergestellt. Diese haben eine große Pufferkapazität. BAILEY u. COX (1992) verwendeten bei Versuchen zur Wiederbelebung von *Salmonella Typhimurium* gepuffertes Peptonwasser und „universal preenrichment broth“. Auch THOMASON et al. (1977), THOMASON und DODD (1978), VAN LEUDSEN et al. (1982), FRICKER (1984) und FRICKER (1987) haben herausgefunden, dass gepuffertes Peptonwasser für die Verwendung als Voranreicherungsbouillon geeigneter ist als Laktosebouillon. Diese Ergebnisse konnten auch JUVEN et al. (1984) bestätigen. In den von diesen Forschern durchgeführten Untersuchungen mit den Testkeimen *Salmonella Heidelberg* und *Salmonella Montevideo* erwiesen sich von den Medien Laktosebouillon, Laktosebouillon mit Tergitol, M9-Bouillon und gepuffertes Peptonwasser die beiden letzten Medien als die für eine Voranreicherung am geeignetsten.

In den eigenen Untersuchungen (Methode 2 und Methode 4) erwies sich die Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser als sehr effektiv. In allen 180 untersuchten Proben, die mit Methode 2 bzw. Methode 4 untersucht wurden, war der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* positiv.

Zur Verbesserung des Nachweises von Salmonellen wird in der Literatur häufig die Zugabe von Novobiocin als Antibiotikum in Medien erwähnt (ALCAIDE et al. 1982; WALTMAN et al. 1991; HUMBERT et al. 1997; KARUNIAWATI 2001; HORAN et al. 2004).

Die Wirkung von Novobiocin liegt in einer Hemmung des Wachstums von *Proteus*, *Pseudomonas* und *Escherichia coli*, welche normalerweise in Umweltproben vorhanden

sind. Durch den Zusatz von Novobiocin wird die Vermehrung der grampositiven Begleitflora unterdrückt, und die geschädigten Salmonellen erhalten die Möglichkeit, sich zu regenerieren.

REISSBRODT (1995) und SCHADEWINKEL-SCHERKL (1995) berichten von der Hemmung von *Proteus* und grampositiven Kokken durch die Verwendung von Novobiocin in Nährboden. Gute Nachweisraten von Salmonellen in Kompost- und Abwasserproben bei Verwendung von Novobiocin in Peptonwasser konnte auch KARUNIAWATI (2001) feststellen. Bei diesen Untersuchungen erhöhte die Zugabe von Novobiocin in die Voranreicherungsbouillon (gepuffertes Peptonwasser) die Nachweisrate für Salmonellen bei Abwasserproben bis zu 16 % bzw. bei Kompostproben 3 % bzw. 6 %.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen diese Untersuchungsergebnisse. In allen 90 untersuchten Proben, bei denen Methode 4 angewandt wurde, konnten *Salmonella Senftenberg* durch Verwendung von Peptonwasser mit Novobiocin nachgewiesen werden.

Für den Prozess der Wiederbelebung subletal geschädigter Salmonellen spielen außer den Nährstoffen in der Voranreicherung die Temperatur und die Zeit der Inkubation der untersuchten Proben eine wichtige Rolle. In der Literatur sind unterschiedlich lange Voranreicherungszeiten zu finden. In Untersuchungen von REISSBRODT u. RABSCH (1993) wurde festgestellt, dass eine 6-stündige Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser ausreichte, um *Salmonella Enteritidis* aus artifiziell kontaminierten Eiern wiederzugewinnen. Die meisten Studien halten fest, dass Voranreicherungszeiten von weniger als 18 h zu einer reduzierten Empfindlichkeit von Salmonellen führen (D'AOUST u. MAISHMENT 1979; D'AOUST 1981). Nach ISO 19250 (ANON. 2003b) sollen die untersuchten Proben in gepuffertem Peptonwasser 16-20 h inkubiert werden. Aus diesem Grund wird als Voranreicherungszeit eine Zeitspanne zwischen 18 h und 24 h empfohlen (WALTMAN 2000). In der vorgelegten Arbeit beträgt die Dauer der Voranreicherung bei Methode 1, Methode 2 und Methode 4 20 h bis 22 h.

Nach verschiedenen Literatur-Angaben liegt die optimale Voranreicherungstemperatur in einem Bereich von 35 °C bis 37 °C (BUDERER 1994; HEINONEN-TANSKI et al. 2000; LEON-VELARDE et al. 2004). Dieser empfohlene Temperaturbereich wurde bei der Voranreicherung in den durchgeführten Untersuchungen eingehalten. Alle 180 Erde-, Gülle- und Klärschlammproben wurden bei 37 °C bebrütet. Der Prozess der Wiederbelebung von geschädigten Salmonellen könnte durch die höheren Temperaturen der Voranreicherung verhindert werden (WALTMAN 2000). In der vorliegenden Arbeit erwies sich bei allen untersuchten Proben eine Voranreicherungstemperatur von 37 °C als sehr effektiv.

In der wissenschaftlichen Literatur findet sich eine Anzahl divergierender Angaben zur Verwendung von Selenit-Cystin-Bouillon. Diese (im weiteren Text angeführten) Studien beschreiben Selenit-Cystin-Bouillon als Anreicherungsmedium. In den eigenen

Untersuchungen wurde diese Bouillon gemäß den Angaben von CEN/TC 308 (ANON. 2002a) für die Voranreicherung verwendet.

Einige Berichte bzw. Untersuchungen (CHANG et al. 1999; ZEE u. VELD 2000) bezeichnen Selenit-Cystin-Bouillon als ein optimales Anreicherungsmedium für die Isolierung von Salmonellen aus Proben unterschiedlicher Herkunft. Dabei weisen ZEE u. VELD (2000) darauf hin, dass diese Bouillon am geeignetsten für die direkte Anreicherung von Kotproben oder von post-mortem Proben ist. Dies bestätigten CHANG et al. (1999) in Untersuchungen von natürlich und artifiziell kontaminierten Kotproben.

Einschränkend muss aber auf die Nachteile bei der Verwendung von Selenit hingewiesen werden. Verschiedentlich wird in der Literatur auf die Hemmwirkung von Selenit-Cystin-Bouillon auf bestimmte Salmonella-Serovare hingewiesen. HARVEY u. PRICE (1975) berichten von der geringen Wirksamkeit dieses Anreicherungsmediums bei der Isolierung von *Salmonella Dublin*. GREENFIELD and BIGLAND (1970) fanden heraus, dass *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum* und *Salmonella Typhi* nicht gut in Selenit-Cystin-Bouillon gedeihen, vor allem bei einer Anreicherungstemperatur von 43 °C. Auch SMITH (1952) beschreibt die Hemmung von Selenit bei der Isolierung von *Salmonella Choleraesuis*. Nach YAMAMOTO et al. (1961) hat sich Selenit bei der Isolierung von *Salmonella Typhimurium* als eine zu selektive Anreicherungsbouillon erwiesen.

In der vorliegenden Arbeit erwies sich *Salmonella Senftenberg* als optimaler Testkeim für die Validierung der Methode 1. In allen 90 untersuchten Proben verschiedener Herkunft wurde ein gutes Wachstum dieses Bakteriums in Selenit ermittelt.

Wird Selenit bei der Voranreicherung von subletal geschädigten Salmonellen aus natürlich kontaminierten Proben verwendet, sollte dessen große Selektivität berücksichtigt werden. Wie das Selenit auf die „injured“ Salmonellen in einer Voranreicherungsphase wirkte, war im Falle der eigenen Untersuchungen schwer zu beurteilen, da hier artifiziell kontaminierte Proben untersucht wurden, in denen die Salmonellen unter wesentlich günstigeren Stressbedingungen standen als bei einer natürlichen Kontamination. Natürlich kontaminierte Proben unterscheiden sich von artifiziell kontaminierten Proben insofern, dass unter natürlichen Bedingungen in der Regel ungünstige Umwelteinflüsse (pH-Wert, Salzkonzentration, Temperaturschwankungen) auf die Mikroorganismen einwirken und zu einem reduzierten Wachstum oder zu einer subletalen Schädigung der Bakterien führen (CLAIR u. KLENK 1990).

Auch zur Inkubationstemperatur gehen die Meinungen auseinander. Ein Großteil der Autoren berichtet, dass das Wachstum von Salmonellen in Selenitbouillon bei 43 °C besser war als bei 37 °C. HARVEY u. THOMPSON (1953) kamen bei einer Untersuchung von menschlichen Kotproben bei einer Temperatur von 43 °C zu besseren Ergebnissen als bei einer Temperatur von 37 °C. Zu diesen Resultaten führten auch die Untersuchungen von

CARLSON et al. (1967), SMYSER u. SNOEYENBOS (1969), BÄNFFER (1971), D'AOUST (1981) und DUSCH u. ALTWEGG (1995).

Das Wachstum von *Salmonella Senftenberg* in den eigenen Untersuchungen stimmte nicht mit diesen Ergebnissen überein. Alle untersuchten Proben wurden bei einer Voranreicherungstemperatur von 37 °C inkubiert, welche für dieses Medium ein sehr gutes Wachstum ermöglichte. Um eine Abtötung von subletal geschädigten Salmonellen während der Voranreicherung zu vermeiden, wurde die Temperatur nicht auf 43 °C erhöht. Auch bei Lebensmitteluntersuchungen (ANON. 1998c) wurde die Selenit-Cystin-Bouillon bei einer Temperatur von 37 °C bebrütet. Damit erwies sich die vorgeschriebene Temperatur von 37 °C in den eigenen Untersuchungen als geeignet.

Bei der Filtrationsmethode (Methode 3) wurde in Anlehnung an das von der Arbeitsgruppe CT/318 (ANON. 2002a) vorgeschriebene Verfahren keine Voranreicherung von Salmonellen durchgeführt.

5.6.2 Bewertung des Anreicherungsverfahrens

Nach der Voranreicherung in der Selenit-Cystin-Bouillon bzw. in Peptonwasser wurden die bebrüteten Proben in ein geeignetes Anreicherungsmedium überimpft. In den eigenen Untersuchungen wurden als selektive Anreicherungsmedien RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon und Tetrathionat-Bouillon verwendet.

Selektive Anreicherungsbouillons dienen dazu, selektiv andere Bakterien zu hemmen und dadurch das Wachstum von Salmonellen bis zu einem nachweisbaren und quantifizierbaren Level zu fördern (WALTMAN 2000). Eine ideale Anreicherungsbouillon sollte die konkurrierenden Mikroorganismen unterdrücken und den Salmonellen ermöglichen, sich unbeschränkt zu vermehren (ZEE u. VELD 2000).

Heute werden hauptsächlich drei selektive Anreicherungsmedien verwendet:

- RAPPAPORT- VASSILIADIS-Bouillon
- Tetrathionat-Bouillon
- Selenit-Cystin-Bouillon

Bei Methode 1 (MPN-Methode) wurde die Selenit-Cystin-Bouillon als Voranreicherungsmedium verwendet.

Die Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS wurde in den eigenen Untersuchungen im Verhältnis 1:100 beimpft. Dies korreliert mit den Angaben von RAPPAPORT et al. (1956) und VASSILIADIS (1983).

Die Entwicklung dieser Bouillon stammt von RAPPAPORT (1956). Folgende Eigenschaften fördern den Nachweis von Salmonellen mit diesem Medium:

- Überlebensfähigkeit bei einem relativ hohen osmotischen Druck
- Vermehrungsfähigkeit bei einem relativ niedrigen pH-Wert von 5,2
- Überlebensfähigkeit in Malachitgrün (106 mg l⁻¹)
- Wachstum bei einem minimalen Ernährungswert (5 g Pepton l⁻¹)

VASSILIADIS et al. (1976) modifizierten das Medium durch Reduktion des Malachitgrüns auf 36 mg l⁻¹, wodurch eine Inkubation des Mediums bei einer Temperatur von 43 °C ermöglicht wurde, die auch in den eigenen Untersuchungen angewandt wurde.

Mit Ausnahme von Methode 3 wurden in den eigenen Untersuchungen alle Proben bei einer Temperatur von 43 °C einmal inkubiert. Bei Methode 4 wurde die Anreicherung parallel bei 37 °C und 43 °C durchgeführt.

Salmonellen vermehren sich in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 47 °C, wobei das optimale Wachstum von Salmonellen zwischen 35 °C und 37 °C liegt (KLEER 2004). In der Literatur sind viele Angaben über das Wachstum von Salmonellen zu finden. Nach HARVEY u. PRICE (1979) führt eine Inkubation bei einer Temperatur von 43 °C zu einer Hemmung bzw. Abtötung von Salmonellen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich manche *Salmonella Typhimurium*-Mutanten bei einer Temperatur von 54 °C vermehren können (KLEER 2004). Die Vermehrungsfähigkeit von Salmonellen bei verschiedenen Temperaturen ist somit abhängig von bestimmten Salmonella-Serovaren.

Erhöhte Temperaturen, z. B. eine Temperatur von 43 °C können tödlich sein oder führen zu einer Wirkungslosigkeit des Isolierungsmediums (HARVEY u. PRICE 1979; BUSSE 1995; WALTMAN 2000). So konnten HARVEY u. THOMPSON (1953) bei einer Temperatur von 43 °C *Salmonella Typhi* und *Salmonella Pullorum* nicht isolieren. Eine Inhibitionswirkung der höheren Temperaturen konnte auch bei *Salmonella Dublin* festgestellt werden (PETERZ et al. 1989). Nach BUSSE (1995) kann eine Erhöhung der Temperatur auf über 43 °C für Salmonellen tödlich sein.

Im Gegensatz hierzu wird von verschiedenen Autoren eine Temperatur von 42 °C und 43 °C für die Isolierung der Salmonellen empfohlen (BÄNFER 1971; EDEL u. KAMPELMACHER 1969; PETERZ et al. 1989). Nach VASSILIADIS et al. (1976) liegt die erforderliche Temperatur für die Isolierung von Salmonellen sogar bei 43 °C.

Umweltproben, die einen höheren Kontaminationsgrad von konkurrierenden Begleitmikroorganismen enthalten, können bei höheren Temperaturen angereichert werden, da die Salmonellen eine höhere Temperaturresistenz haben (WALTMAN 2000). Die empfohlene Inkubationstemperatur für die Anreicherung in RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon liegt bei 41,5 °C, eine Temperatur, die annähernd auch in den eigenen Untersuchungen bei Methode 1, 2 und 4 verwendet wurde (43 °C). Diese angewandte Anreicherungstemperatur erwies sich in allen untersuchten Proben verschiedener Herkunft, die mit Methode 1, 2 und 4 untersucht wurden, als sehr effektiv, da ein gutes Wachstum von *Salmonella Senftenberg* bestätigt werden konnte.

Resümierend in Bezug auf die unterschiedlichen Temperaturangaben kann festgestellt werden, dass bei natürlich kontaminierten Proben sich Methode 4 als die vorteilhafteste erweisen könnte, da bei dieser Methode die Proben parallel bei 37 °C und 43 °C angereichert wurden. Beide Anreicherungstemperaturen zeigten in eigenen Untersuchungen keine Unterschiede im Wachstum. In allen untersuchten 90 Proben wurde bei beiden Anreicherungstemperaturen der Nachweis von *Salmonella Senftenberg* bestätigt.

In den eigenen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon ein geeignetes Medium für die Isolierung von Salmonellen aus biologischem Material ist. In allen untersuchten Proben, die bei 43 °C und 37 °C bebrütet wurden, konnte ein sehr gutes Wachstum von *Salmonella Senftenberg* ermittelt werden.

Die gute Hemmwirkung dieser Bouillon auf die Begleitflora bzw. ein gutes Wachstum von Salmonellen wurde schon oft in der Literatur beschrieben.

Diese Erkenntnisse bestätigen sich auch in Untersuchungen von VASSILIADIS (1983). Der Autor untersuchte vergleichend insgesamt 2109 Proben verschiedener Herkunft auf Salmonellen mit den beiden Anreicherungsbouillos RAPPAPORT-VASSILIADIS und Tetrathionat. In allen untersuchten Proben wurde eine größere Zahl an Salmonellen durch Verwendung der RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon festgestellt. Unter anderem wurden 40 Klärschlammproben untersucht, von denen bei Verwendung von Tetrathionatbouillon lediglich 17 Proben Salmonellen positiv waren, während bei der Verwendung von RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon in 38 Proben Salmonellen nachgewiesen wurden.

Über Vorteile der Verwendung von RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon gegenüber Tetrathionat- und Selenitbouillon berichten auch BECKERS et al. (1986, 1987a, 1987b).

In Untersuchungen von SCHLUND u. MUNCH (1993) wurden insgesamt 481 Proben aus Biogasanlagen zur Behandlung von Gülle untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten eine Überlegenheit von RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon gegenüber Selenit- und Tetrathionatbouillon. Durch Verwendung der RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon wurde in dieser Untersuchungen unter anderem eine große Anzahl von *Salmonella Typhimurium* und *Salmonella Dublin* gewonnen. Es war auffällig, dass bei Verwendung von Tetrathionatbouillon diese zwei Serovare in wesentlich geringerer Anzahl ermittelt wurden. JUNE et al. (1996) machten darauf aufmerksam, dass in den vergleichenden Untersuchungen zwischen RAPPAPORT-VASSILIADIS-, Tetrathionat- und Selenit-Cystin-Bouillon aus 1125 Lebensmittelproben die größte Anzahl an Salmonellen (409 Proben) bei Verwendung von RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon gewonnen wurde.

Die Vorteile von RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon gegenüber Tetrathionatbouillon konnten in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden, da aufgrund der Ergebnisse kein Unterschied im Wachstum zwischen den beiden verwendeten

Anreicherungsbouillons sichtbar wurde. Beide Nährmedien erweisen sich in den eigenen Untersuchungen als geeignet.

Bei Methode 3 wurde in der vorliegenden Arbeit keine Voranreicherung der untersuchten Proben vorgenommen. Die untersuchten Proben wurden nach der Verdünnung in PBS filtriert (siehe Pkt. 3.4.1.3) und der Filter in Tetrathionat-Bouillon angereichert. Tetrathionat-Anreicherungsbouillon wurde von MÜLLER (1923) beschrieben und durch KAUFFMANN (1935) modifiziert. Bei der Verwendung von Tetrathionat stellt *Proteus* spp. ein besonderes Problem dar. Dieses Bakterium wächst in Tetrathionatbouillon sehr gut, weil es wie Salmonellen das Enzym Tetrathionatreduktase besitzt (KARUNIAWATI 2001). Eine wichtige Modifizierung von Tetrathionat-Bouillon führte JEFFRIES (1959) durch. Durch das Hinzufügen von $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ Novobiocin wird das Wachstum von *Proteus* und *Providencia* spp. nach unterbunden.

In der Literatur existieren verschiedene Angaben über die Inkubationstemperatur der Proben unterschiedlicher Herkunft mit Tetrathionatbouillon. Viele Autoren empfehlen eine Anreicherungstemperatur von $43 \text{ }^\circ\text{C}$ oder sogar eine doppelte Anreicherung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $43 \text{ }^\circ\text{C}$ (ANON. 1981; BECKERS et al. 1985; BECKERS et al. 1986; KARUNIAWATI 2001), wobei bei diesen Untersuchungen die Proben erst in einem nicht selektiven Medium bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorangereichert wurden. Eine direkte Anreicherung bei $43 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $42 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde von READ et al. (1994) und FLORES-ABUXAPQUI et al. (2003) beschrieben. GRUNNET (1975) konnte bei einer Anreicherungstemperatur von $43 \text{ }^\circ\text{C}$ eine deutlich höhere Nachweisrate von Salmonellen aus Abwasser als bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ feststellen. Auch KARUNIAWATI (2001) berichtet von einer größeren Selektivität der Tetrathionatbouillon, die bei $43 \text{ }^\circ\text{C}$ angereichert wurde. Es sei jedoch angemerkt, dass bei diesen Autoren die untersuchten Abwasser- und Kompostproben erst in Pepton bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorangereichert wurden. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Autoren wurde bei den Untersuchungen von KAUFFMANN (1935), JEFFRIES (1959), JUNE et al. (1996) eine Inkubationstemperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ angewandt.

Entsprechend den Vorgaben der CEN (ANON. 2002a) wurden bei der Filtrationsmethode (Methode 3) die Proben bei einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ohne Voranreicherung inkubiert. Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von subletal geschädigten Salmonellen aus biologischem Material. Es ist bekannt, dass die „injured“ Salmonellen bei einer höheren Temperatur, z. B. $43 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem selektiven Medium nicht in der Lage sind, sich zu vermehren (EDEL u. KAMPELMACHER 1973). Es ist davon auszugehen, dass die Anreicherungstemperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ deshalb empfohlen wurde, um eine Abtötung oder Schädigung der untersuchten Salmonellen zu vermeiden.

Die Tetrathionatbouillon enthält Novobiocin. Nach einer Feststellung von JEFFRIES (1959) bleibt die Novobiocin-Konzentration in dieser Bouillon 48 h bei einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wirksam.

Wegen der Besonderheiten des vorgegebenen Verfahrens bei der Methode 3 wurde eine Voranreicherung der untersuchten Proben nicht durchgeführt. Die vorgegebene Anreicherungstemperatur erwies sich hier als sehr effektiv. In allen untersuchten Proben konnte aus der Tetrathionatanreicherung mit Novobiocin ein gutes Wachstum von *Salmonella Senftenberg* ermittelt werden (siehe 4.5.1).

5.6.3 Bewertung der verwendeten selektiven Nährböden

Die selektiven Nährmedien müssen nach verschiedenen selektiven Faktoren, Indikatorsystemen oder anderen Merkmalen differenziert werden, um Salmonellen von der Begleitflora unterscheiden zu können. Da keiner der bisher entwickelten einzelnen Nährböden ideale Bedingungen aufweist, empfiehlt sich die Verwendung von mindestens zwei unterschiedlichen Medien. Jedes sollte verschiedene selektive Indikatorsysteme oder zu unterscheidende Merkmale enthalten, um einen breiten Bereich der *Salmonella*-Serovaren bestimmen zu können (WALTMAN u. MALLINSON 1995; ZEE u. VELD 2000).

Falls nicht anders angegeben, sollten die Nährmedien bei einer Temperatur von 35 °C bis 37 °C für 18-24 h bebrütet werden (FAGERBERG u. AVENS 1976).

Mit Ausnahme bei der Filtrationsmethode (Methode 3) entspricht die Anzahl bzw. die Auswahl der verwendeten Agars sowie die Temperatur bzw. die Dauer der Inkubation oben genannten Empfehlungen. Alle Proben, die durch Methode 1 (MPN-Methode: RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon in Kombination mit Selenit-Cystein-Bouillon), 2 (MPN-Methode: Peptonwasser in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon) und 4 (qualitativer Nachweis: Peptonwasser mit Novobiocin in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon) untersucht wurden, wurden parallel auf zwei verschiedenen Agars ausgestrichen und bei 37 °C für 20-22 h inkubiert.

Bei Methode 1 wurden nach der Inkubationszeit von 24 h die bebrüteten Proben parallel auf RAMBACH®- bzw. XLD-Agar ausgestrichen. Bei den für diese Methode vorgeschlagenen zwei Nährböden konnten keine Unterschiede im Wachstum von *Salmonella Senftenberg* ermittelt werden. Beide Agars erwiesen sich als sehr effektiv, wobei bei der artifiziellen Kontamination der Proben die fehlende Begleitflora berücksichtigt werden muss.

Die Angaben in der Literatur zur Verwendung von RAMBACH®-Agar sind zahlreich und teilweise widersprüchlich. Unter ihnen finden sich jedoch nur wenige Hinweise zum Nachweis von Salmonellen aus Umweltproben. Dieser Agar scheint sich gut für die Identifikation von Salmonellen bei menschlichen Stuhluntersuchungen und bei Lebensmitteluntersuchungen zu eignen (ABDALA et al. 1994; RUIZ et al. 1995). Über Vorteile der größeren Selektivität gegenüber anderen Nährböden berichtete zuerst RAMBACH (1990). Durch die Entwicklung dieses Nährbodens konnte das Wachstum von *Proteus* spp. und anderen *Enterobacteriaceae* zwar nicht verhindert werden, doch war durch

die Bildung der spezifisch rosafarbenen Salmonellenkolonien eine Differenzierung zwischen den gewachsenen Kolonien leichter möglich. HORAN et al. (2004) haben in den Tenazitätsuntersuchungen mit dem Testbakterium *Salmonella Senftenberg* den RAMBACH[®]-Agar verwendet. In den eigenen Untersuchungen wurde artifiziell kontaminierter Klärschlamm mit Hilfe von Methode 3 untersucht. Auch BLANC (1991) berichtet von Vorteilen der Verwendung von RAMBACH[®]-Agar bei Untersuchungen von Stuhl und Lebensmittelproben. Diese Erfahrungen konnte BUDERER (1994) nicht bestätigen. In ihren Untersuchungen von Salmonellen aus Abwasserproben erwies sich XLD-Agar gegenüber RAMBACH[®]-Agar als geeigneter, wobei keine Tetrathionatbouillon bzw. Selenit als Anreicherungsmedien verwendet wurden. Als Anreicherungsmedium wurde RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon verwendet. In den Untersuchungen von KOIVUNEN et al. (2001) erwies sich XLD-Agar zum Nachweis von Salmonellen aus Abwasserproben effektiver als RAMBACH[®]-Agar. Mit dem XLD-Agar wurde eine größere Anzahl von Salmonella-Kolonien festgestellt. RAMBACH[®]-Agar ist ein sehr teurer Nährboden, bei dem nicht alle Salmonellenserovaren die typisch morphologisch erkennbaren rosafarbenen Kolonien bilden können. In den Untersuchungen von KÜHN et al. (1994) PIGNATO et al. (1995a) und PIGNATO et al. (1995b) wurde festgestellt, dass zusätzlich zu *Salmonella Typhi* und *Salmonella Paratyphi* auch noch *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Abortusovis*, *Salmonella Abortusequi*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Dublin*, *Salmonella Pullorum* u. a. keine rosafarbenen Kolonien bilden können, und eine ausschließlich morphologische Identifizierung nicht sicher ist. In den vorliegenden Entwürfen zum Nachweis von Salmonellen (ANON. 2002a) wurde dies bei allen vier Methoden berücksichtigt. Damit erwies sich, dass alle mutmaßlichen Salmonellen-Kolonien auch serologisch und biochemisch bestätigt sein müssen.

Die Tatsache, dass nur ein Nährboden bei Methode 3 Anwendung fand, widerspricht der häufig zu findenden Empfehlung, mindestens zwei verschiedene Agar zum Nachweis von Salmonellen zu verwenden (WALTMAN u. MALLINSON 1995; WALTMAN 2000; ZEE u. VELD 2000; ANON. 2003b). In der vorliegenden Arbeit wurden artifiziell kontaminierte Proben ohne die nicht sporenbildende Begleitflora untersucht. Dadurch konnten die gewachsenen *Salmonella*-Kolonien morphologisch leicht erkannt werden. Bei Untersuchungen von natürlich kontaminierten Umweltproben ist jedoch mit der Einwirkung störender Begleitflora zu rechnen.

Dass die Verwendung zweier verschiedener Nährböden sinnvoll ist, konnten auch ALONSO et al. (1992) bestätigen. In deren Wasseruntersuchungen wurden parallel RAMBACH[®]- und Hektoenagar verwendet. Dabei wies Hektoenagar im Vergleich zu RAMBACH[®]-Agar eine größere Selektivität auf.

Die zusätzliche Verwendung eines zweiten Agar bei Methode 3 ist theoretisch vorstellbar, jedoch ist bei der praktischen Anwendung mit einem größeren Arbeitsaufwand zu rechnen.

Die Hinweise der Verwendung von mindestens zwei Nährmedien mit verschiedenen selektiven Indikatorsystemen und unterscheidbaren Merkmalen wurden durch die

Hinzunahme des XLD-Agars bei den Methoden 1, 2 und 4 erfüllt. Wie bei Methode 1 wurden bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Nährböden auch bei Methode 2 und 4 keine Unterschiede im Wachstum von *Salmonella Senftenberg* ermittelt. In der vorliegenden Arbeit erwies sich XLD-Agar als eine gute Wahl, wie auch andere Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen in Umweltproben verschiedener Herkunft bestätigen können (RAPP 1995; SCHWARZ 2003; HAUMACHER 2003). XLD-Agar weist H₂S-positive Mikroorganismen bzw. Salmonellen nach und kann somit nicht als einziger Agar zur *Salmonella*-Isolierung verwendet werden. Diesen Umstand erwähnen viele Autoren (YUNO et al. 2001; KOIVUNEN et al. 2001; GAST et al. 2004), die XLD-Agar fast immer parallel mit einem zweiten Nährboden verwendeten. Manche fanden heraus, dass die Verwendung dieses „Festmediums“ zu falschen Ergebnissen führen kann. ISENBERG et al. (1969) berichten von niedrigen Salmonellen-Nachweisraten durch die Verwendung von XLD-Agar, im Vergleich zu Salmonella-Shigella-Agar. Diese Agar wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Bei vergleichenden Untersuchungen zwischen fünf Nährböden haben KOMATSU et al. (1981) auf XLD-Agar eine große Anzahl angeblicher Salmonellen gefunden. Diese stellten sich bei näherer Identifizierung als *Proteus mirabilis* heraus. In Untersuchungen von Abwasserproben (KARUNIAWATI 2001), bei denen BPLS-, XLT-4- sowie XLD-Agar verwendet wurden, war das Vorkommen von Begleitflora bzw. von *Proteus* spp. auf dem letztgenannten Agar besonders stark ausgeprägt. MADDOCKS et al. (2002) verglichen bei den Untersuchungen menschlicher Kotproben CHROMagar (CAS), XLD-Agar und Salmonella-Shigella-Agar und stellten fest, dass der CAS-Agar eine größere Anzahl von Salmonellen aufwies. Diese Nachteile der Verwendung des XLD-Agars konnten durch die vorliegenden Ergebnisse nicht verifiziert werden, da in den eigenen Untersuchungen artifiziell kontaminierte Proben untersucht wurden. Bei allen untersuchten Substraten wurde ein sehr gutes Wachstum von *Salmonella Senftenberg* festgestellt.

Als erster Nährboden wurde der BPLS-Agar bei Methode 2 und 4 aus folgenden Gründen verwendet:

- Die Bioabfallverordnung (ANON. 1998a) sieht BPLS-Agar zur Verwendung für die Isolierung von Salmonellen aus biologischem Material vor, wobei die Wahl des zweiten Nährbodens in der Entscheidung des Verfassers liegt. In der vorliegenden Arbeit wurde der XLD-Agar als zweiter Agar verwendet.
- Weiterhin hat sich BPLS-Agar in Lebensmitteluntersuchungen (ANON. 1989c) und in Untersuchungen von Salmonellen aus menschlichem Kot (KIST et al. 2000) bewährt.
- Ferner hat eine ganze Reihe weiterer Autoren den BPLS-Agar als günstigen Nährboden bezeichnet (BANWART et al. 1953; EDEL u. KAMPELMACHER 1969; GRUNNET 1975; KARUNIAWATI 2001).

Diese Einschätzungen bzw. Empfehlungen des BPLS-Agars konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In allen untersuchten Proben verschiedener Herkunft, die mit

Methoden 2 und 4 untersucht waren, konnte ein gutes Wachstum von *Salmonella Senftenberg* bei 37 °C und auch bei 43 °C nachgewiesen werden.

Die Kombination von BPLS- und XLD-Agar wurde von verschiedenen Autoren bei den Untersuchungen von Umweltproben verschiedener Herkunft verwendet und als günstig erachtet (SOLDIERER 1991; WAGNER 1993; RAPP 1995; BREITENFELD 2000; HOFERER 2001; KNIE et al. 2001; SCHWARZ 2003; ADE-KAPPELMANN et al. 2004; HAUMACHER 2003)

In den oben aufgeführten Veröffentlichungen wurde die Anzahl der positiven Salmonellaprobe ohne Rücksicht auf den verwendeten Agar dargestellt. Damit sind keine Aussagen möglich, auf welchem Nährboden Salmonellen überhaupt vorhanden waren.

5.6.4 Bewertung von *Salmonella Senftenberg* als relevantes Testbakterium für die Validierung der vier Nachweismethoden

Zur Validierung einer Nachweismethode wird die Wahl des Testbakteriums gewöhnlich vom Verfasser getroffen. Daher sind in der Literatur verschiedene *Salmonella*-Serovaren als Testkeime für unterschiedliche Zwecke verwendet worden.

In unterschiedlichen Nachweisverfahren wurde *Salmonella Utrecht* als Testbakterium für vergleichende Salmonella-Untersuchungen von neun (EDEL u. KAMPELMACHER 1973) bzw. zehn (EDEL u. KAMPELMACHER 1974) europäischen Labors verwendet.

Bei vergleichenden Untersuchungen (BECKERS et al. 1986; BECKERS et al. 1987b) zur Anwendbarkeit von Tetrathionat- und RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon wurde *Salmonella Typhimurium* als Testbakterium verwendet.

BUDERER (1994) verwendete *Salmonella Enteritidis* zur artifiziellen Kontamination von Klärschlamm, um die beiden Nährmedien XLD- und RAMBACH[®]-Agar bezüglich ihrer Eigenschaft zum Nachweis von Salmonellen zu vergleichen.

Bei artifiziell kontaminierten Lebensmittelproben (JUNE et al. 1996), die in Selenit-Cystin-, Tetrathionat- und RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon angereichert wurden, fanden *Salmonella Poona*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Montevideo*, *Salmonella Worthington* und *Salmonella Enteritidis* als Testbakterien Verwendung.

Bei der Ringuntersuchung „Bioabfall 2001“ (ANON. 2001) zwischen 30 Labors in Deutschland wurde das untersuchte Substrat bzw. Kompost mit *Salmonella Typhimurium* kontaminiert, während bei den Ringuntersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus Komposten in Baden-Württemberg bzw. im gemeinsamen Ringversuch des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen in Zusammenarbeit mit der Bundesgütegemeinschaft

Kompost e.V. in 2003 und 2004 *Salmonella Senftenberg* W775 (H₂S-negativ) in drei unterschiedlichen Konzentrationen in die Kompostproben eingemischt wurden (ANON. 2004b). In einem weiteren Ringversuch zwischen 41 deutschen Labors (ADE-KAPPELMANN et al. 2004) wurde als Untersuchungsmaterial Kompost gewählt und mit *Salmonella Senftenberg* H₂S negativ beimpft. Das beimpfte Substrat wurde in diesem Fall mit Methode 4 untersucht, wobei das gepufferte Peptonwasser kein Novobiocin enthielt und als Nährboden nur BPLS-Agar verwendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Testbakterium *Salmonella Senftenberg* H₂S positiv und *Salmonella Senftenberg* H₂S negativ verwendet, wobei das untersuchte Substrat mit einer Mischung dieser beiden Bakterien beimpft wurde. Die zwei verwendeten Salmonellasuspensionen sind in der Diskussion als Testbakterium *Salmonella Senftenberg* angegeben.

Die Verwendung von *Salmonella Senftenberg* W 775 entspricht den Vorgaben der Bioabfallverordnung (ANON. 1998a). Dieses Bakterium wird für die direkte Prozessprüfung bei der Inbetriebnahme von biotechnologischen Anlagen verwendet und wird als „Standard Testbakterium“ nicht nur in Tenazitätsuntersuchungen des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene häufig benutzt.

Da *Salmonella Senftenberg* H₂S negativ auf XLD-Agar keine morphologisch erkennbaren schwarzen Kolonien bilden kann, wurde *Salmonella Senftenberg* H₂S positiv hinzugefügt, womit diese Eigenschaften aufgehoben werden konnte.

In den eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Kombination aus *Salmonella Senftenberg* H₂S positiv und *Salmonella Senftenberg* H₂S negativ als relevante Testbakterien für die Validierung der vier Nachweismethoden geeignet ist.

Die zwei in dieser Arbeit verwendeten Serovare erwiesen sich bei der Isolierung, welche nach den von der Europäischen Arbeitsgruppe TC/318 empfohlenen Methoden erfolgte, in allen verwendeten Vor- und Anreicherungsmedien einschließlich der Nährböden bei beiden Inkubationstemperaturen (37 °C und 43 °C) als leicht nachweisbar. In allen untersuchten Substraten wurden beim verwendeten Testbakterium keine Wachstumsunterschiede festgestellt.

5.6.5 Bewertung der angewandten Nachweisverfahren hinsichtlich der ermittelten Ergebnisse

Durch die vorliegenden Ergebnisse der *Salmonella*-Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die vorgegebenen Vorgehensweisen der Methoden 2 (MPN-Methode: Peptonwasser in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon), 3 (Filtrationsmethode) und 4 (qualitativer Nachweis: Peptonwasser mit Novobiocin in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon) optimale Nachweisverfahren zum Nachweis von Salmonellen aus biologischem Material darstellen.

Die Bewertung des MPN-Verfahrens von Methode 1 (Selenit-Cystein-Bouillon in Kombination mit RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon) erwies sich als problematisch und wird im folgenden Text noch näher diskutiert (siehe unten).

Die verwendeten Medien bzw. die Temperatur und die Dauer der Bebrütungszeiten bei den validierten Methoden entsprechen den in der Literatur beschriebenen bzw. empfohlenen Vorgehensweisen. Eine Ausnahme bildet die Verwendung des Selenits als Voranreicherungsmedium bei Methode 1.

Alle drei verwendeten *Salmonella*-Konzentrationen (10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/ml) konnten durch die Methoden 2 und 3 bei allen drei beimpften Substraten wiedergewonnen werden. Der qualitative Nachweis von *Salmonella Senftenberg* (Methode 4) konnte ebenfalls bei allen untersuchten Proben sowohl bei 37 °C als auch bei 43 °C in 50 g der Probe erbracht werden.

Die Rückgewinnung der *Salmonella*-Konzentrationen, mit der die Proben beimpft wurden ist wichtig, um Aussagen über die jeweiligen Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden zu treffen. Dies hat vor allem auch bei den Untersuchungen von unbehandelten Proben, die eine geringere Anzahl von Salmonellen erhalten können als auch für die Tenazitätsversuche während verschiedener Behandlungsprozesse wie auch für die bakteriologische Kontrolle der Endprodukte eine entscheidende Bedeutung.

Nach der statistischen Auswertung (siehe Kapitel 4.5.2) hat sich Methode 3 (Filtrationsmethode) bei allen untersuchten Substraten als die genaueste erwiesen. Sowohl Standardabweichung als auch das 95 % Vertrauensintervall der ermittelten Werte aus allen Proben waren für alle Kontaminationsgrade am kleinsten. Eine Ausnahme bilden hier die Ergebnisse aus Gülleproben, die mit einer Konzentration von 10^2 KBE/ml beimpft waren. Dort war das 95 % Vertrauensintervall der Methode 2 (MPN-Methode) kleiner als bei der Methode 3. Hierzu hat die Methode 2 vergleichbar gute Ergebnisse geliefert.

Die statistische Auswertung der MPN-Methode 1 war nur bei einem Konzentrationsgrad von 10^1 KBE/ml möglich (siehe 4.5.2). Für die Kontaminationsgrade 10^2 und 10^3 KBE/g wurden die Standardabweichung (SD) und das 95 % Vertrauensintervall (95 % CI) nicht berechnet, da diese Werte bei allen untersuchten Substraten größer als $>2,4 \times 10^2$ KBE/g waren. Dies war der maximal zu erhaltende Wert der De MAN-MPN Tabelle. Die

Anwendung dieser Methode ist nicht zu empfehlen, da mit ihr keine genaue Konzentrationsbestimmung erfolgen kann.

Abgesehen von den statistischen Ergebnissen, die die Methode 3 als am genauesten herausstellen, muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den validierten Methoden um drei unterschiedliche Verfahren handelt und dadurch ein direkter Vergleich der Genauigkeit der Methoden, nicht möglich ist.

Ein Vergleich der beiden Methoden 1 und 2, die jeweils der Ermittlung der wahrscheinlichsten Keimzahl dienen, zeigte die Ungenauigkeit der Methode 1.

Beim verwendeten MPN-Verfahren der Methode 1 wurde festgestellt, dass im Falle einer „10 ml, 1 ml und 0,1 ml-Verdünnungskombination“ (siehe 3.4.1.1) und einem höheren Kontaminationsgrad als 10^1 KBE/ml Substrat eine optimale „wahrscheinlichste Keimzahl“ nicht ermittelt werden konnte (vgl. die folgenden Erläuterungen).

Zehn Gramm des untersuchten Substrats wurden mit 90 ml Trypton in einem Verhältnis 1:10 verdünnt. Diese Verdünnung wurde danach in drei vorgegebenen Verdünnungsstufen der Kombination 3 x „10 ml, 1 ml und 0,1 ml“ weiter verdünnt. Dieses Verfahren, in welchem die sog. Stammlösung bzw. Primärlösung (10 g in 90 ml Trypton) jeweils als erste Verdünnung für die weiteren Verdünnungsstufen diente, brachte als Ergebnis, dass in dem jeweiligen Inokulum von 3 x 1 ml bzw. 0,1 ml der Stammlösung genügend vermehrungsfähige Bakterien verblieben, die sich bei optimaler Voranreicherungstemperatur und Voranreicherungsmedium unbegrenzt vermehren konnten. Das MPN-Verfahren hatte für die Auswertung der Ergebnisse zur Folge, dass die wahrscheinlichste Keimzahl nicht ermittelt werden konnte.

Die eigenen Untersuchungen ergaben somit, dass die erste Verdünnung (10 g in 90 ml Trypton) bei den folgenden Verdünnungsstufen nicht jedes Mal die Ausgangsverdünnung sein darf.

Eine weitere Verdünnungsstufe von 0,01 und 0,001 ml in 10 ml ist mathematisch zwar vorstellbar, jedoch ist bei der praktischen Umsetzung mit der Wahrscheinlichkeit einer hohen Ungenauigkeit und Fehlerquote zu rechnen.

Im Gegensatz zu oben beschriebenem MPN-Verfahren der Methode 1 erbrachte die Methode 2 mit ihren dekadischen Verdünnungen eine eindeutige Auswertung der Ergebnisse und somit eine genaue Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl.

In der vorliegenden Arbeit zeichnete sich ab, dass die Methode 2 der Methode 1 mit ihrem MPN-Verfahren bezüglich Genauigkeit der Ergebnisse überlegen ist.

Es ist daher zu empfehlen, dass bei zu untersuchenden Proben ohne Rücksicht auf die verwendeten Voranreicherungsbouillons mit dem Verfahren der dekadischen Verdünnungen wie in Methode 2 gearbeitet werden sollte.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die vorgeschlagenen Methoden 3 und 4 wie auch Methode 2, geeignet für die Untersuchungen von Salmonellen aus Erd-, Gülle und Klärschlammproben sind.

Inwieweit diese getesteten Methoden auch bei Substraten wirksam sind, die nicht artifiziell kontaminiert wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

Um hier Aussagen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen, natürlich kontaminierten Substraten notwendig.

Zu Beginn des Jahres 2005 startete ein CEN-europäisches Projekt (HORIZONTAL-HYG Project), in dem die Bearbeitung bzw. notwendige Modifizierung der vorgeschlagenen Methoden vorgesehen ist. Im Rahmen des Projektes werden zwei Ringversuche durchgeführt an denen 15 europäische Partner teilnehmen werden. Dabei sollen unterschiedliche artifiziell und natürlich kontaminierte Substrate untersucht werden. Nachdem die Methoden endgültig feststehen und entsprechende Untersuchungsergebnisse vorliegen, kann eine Aussage darüber getroffen werden, welche Methode für welche Substrate angewendet werden sollte.

5.7 Diskussion der zwei angewandten Methoden zum Nachweis von *Escherichia coli* aus biologischem Material

Um zwischen den biochemischen Eigenschaften von Gesamt- und Fäkalcoliformen differenzieren zu können, müssen zunächst diese beiden mikrobiologischen Begriffe kurz erklärt werden.

Zur Gruppe der Gesamtcoliforme gehören nach „Environment Agency“ (ANON. 2003c) folgende Genera der Familie *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* und *Yersinia*. Nach ANDREWS et al. (1995; zit. in BAUMGART 1999) und HITCHINS et al. (1995; zit. in BAUMGART 1999) sind coliforme Bakterien eine heterogene Bakteriengruppe, die nicht durch taxonomische Merkmale definiert ist, sondern durch Nachweisverfahren. Es sind gram-negative, aerobe, fakultativ anaerobe Stäbchen (ANON. 1990), die Lactose unter Gas- und Säurebildung innerhalb von 48 h bei Temperaturen zwischen 30 °C und 37 °C fermentieren (ANON. 2003c). Coliforme, die bei 44,5 °C Gas aus Lactose und bei 44 °C Gas und Indol bilden können, werden auch als Fäkal-Coliforme, (thermotrophe Coliforme) oder präsumtive *Escherichia coli* bezeichnet (BECKER u. TERPLANT 1987). Auch nach SCHINDLER (1996) wurden als Fäkalcoliforme jene Gesamtcoliforme bezeichnet, die Lactose noch bei 44 °C mit Säure- und Gasbildung vergären. Der Begriff „Coliforme“ ist nicht präzise und wurde hier verwendet, um alle Coliforme zu beschreiben, von denen angenommen wurde, dass sie fäkalen Ursprungs sind (ANON. 2003c).

Der Nachweis von *Escherichia coli* mittels Fluoreszenz in den zwei verglichenen Methoden basiert auf der Tatsache, dass etwa 94-97 % der *Escherichia coli*-Stämme das Enzym β -Glucuronidase bilden und die fluorogene Substanz 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) spalten (HANSEN u. YOURASSOWSKY 1984; ADAMS et al. 1990;

FREMPTON u. RESTIANO 1995). Der Anteil von Glucuronidase-positiver *Escherichia coli*-Stämme lag immer oberhalb von 90 %.

Nährmedien, die das 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) enthalten, wurden in den verschiedenen Untersuchungen, die den Nachweis von *Escherichia coli* u. a. auch aus biologischen Materialien beschreiben, häufig verwendet (EDBERG et al. 1988; EDBERG et al. 1989; ADAMS et al. 1990; HERNANDEZ et al. 1991; POURCHER et al. 1991; BRENNER et al. 1993; ECCLES et al. 2004).

Die Fähigkeit des fluoreszenzoptischen Nachweisprinzips beschränkt sich nach FREMPTON und RESTIANO (1995) nicht nur auf β -D-Glucuronidaseaktivität von *Escherichia coli*. Diese Aktivität kann auch bei anderen Mikroorganismen vorkommen: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Enterobacter (E.) cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *Hafnia alei*, *Citrobacter sp.*, *Pseudomonas testosteroni*, *Flavobacterium multivorum*, *Staphylococcus (St.) xylosus*, *St. simulans*, *St. haemolyticus*, *St. cohnii*, *St. warneri* und Streptokokken (außer D-Streptokokken).

Ein Merkmal, das *Escherichia coli* von oben genannten Bakterien unterscheiden kann, ist nach FREMPTON u. RESTIANO (1995) die Indolbildung, wobei nach SCHLEGEL (1992) innerhalb der Familie *Enterobacteriaceae* außer *Escherichia coli* noch *Proteus*, *Citrobacter* und *Shigella* Indol bilden. Dies kann durch eine Bebrütung bei 44 °C verhindert werden (BECKER 1988). Nach SCHWIEN (1988) liegt bei Verknüpfung des fluoreszenzoptischen Nachweises von *Escherichia coli* mit dem Nachweis der Indolbildung aus Tryptophan die Spezifität bei über 99 %. Eine positive Indolreaktion zeigen etwa 96 % aller *Escherichia coli*-Stämme (EWING 1986). Nachweisreaktionen von *Escherichia coli* und von Coliformen in der „Bunten Reihe“ gemäß Punkt 4.2.4.1 der Trinkwasserverordnung (ANON. 1990) halten für Coliforme eine „wechselnde“ Indolreaktion fest.

BÜLTE (1988) ist der Meinung, dass für die fluoreszenzoptisch präsumptiv erfassten *Escherichia coli* der Indoltest zur zusätzlichen Bestätigung angewendet werden muss. Nach ISO (ANON. 2001b) besteht der Nachweis von *Escherichia coli* u. a. durch Indolbildung bei einer Temperatur von 44 °C. Auch nach dem „Dictionary of Microbiology and Molecular Biology“ (SINGLETON u. SAINSBURY 2001) werden präsumptive *Escherichia coli* zusätzlich durch Indolreaktion bei einer Temperatur von 44 °C bestätigt. In den eigenen Untersuchungen wurde in Anlehnung an die für die vorliegende Arbeit vorgeschriebenen Verfahren der Makromethode die Indolbildung als drittes Merkmal zum Nachweis von *Escherichia coli* herangezogen. In dieser Hinsicht entspricht das Verfahren den Untersuchungen von HERNANDES et al. (1991), BREDIE u. BOER (1992), SCHINDLER (2001), SUEIRO et al. (2001), BORDALO et al. (2002) und ECCLES et al. (2004), in denen der Nachweis von *Escherichia coli* zusätzlich durch die Indolbildung

bestätigt wurde. In diesen Untersuchungen wurde eine Anreicherungstemperatur von 44 °C verwendet.

Das entscheidende Kriterium der Differenzierung zwischen *Escherichia coli* und Coliforme ist die Zuckerspaltung bei 44 °C. In verschiedenen publizierten Versuchen wurde für den Nachweis von *Escherichia coli* aus biologischen Substraten eine Temperaturspanne zwischen 42 °C (ASLAM et al. 2004) und 45 °C (HOLH et al. 2004) verwendet, wobei eine Großzahl von Autoren eine Inkubationstemperatur von 44 °C verwendet (GAUTHIER u. ARCHIBALD 2001; VILANOVA et al. 2002a; VILANOVA et al. 2002b; OTTOSON u. STENSTRÖM 2003; HUGES 2003; HUGES u. THOMPSON 2003). Auch nach ISO (ANON. 1998b) und ISO (ANON. 2001c) liegt die Inkubationstemperatur zum Nachweis von *Escherichia coli* bei 44 °C. Diese Temperatur wurde ebenso in den eigenen Untersuchungen bei beiden validierten Methoden verwendet und erwies sich als sehr effektiv.

Die von SCHINDLER (1991) bei der Untersuchung von 97 Flusswasserproben gewonnenen Kenntnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bei allen vier unterschiedlichen biologischen Substraten bestätigt werden, wobei hierfür jeweils eine Anreicherungstemperatur von 44 °C verwendet wurde. Die verwendete Makromethode erwies sich in der vorliegenden Arbeit als sehr effektiv. In allen 120 untersuchten Proben verschiedener Herkunft konnte *Escherichia coli* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprachen auch den Ergebnissen von SAMHAN (2005), in denen die untersuchten Klärschlammproben mit der Makromethode untersucht wurden. In den Untersuchungen von HAUMACHER (2003) wurde der Nachweis von *Escherichia coli* aus Bioabfallproben ebenfalls mit Hilfe der Makromethode erzielt, die sich zudem als sehr geeignet für die Quantifizierung des untersuchten Bakteriums erwies. WASSIAK et al. (2004) untersuchten die mit *Escherichia coli* artifiziell kontaminierten Erdproben ebenfalls mit Hilfe der Makromethode.

Sowohl diese Ergebnisse als auch die der eigenen Untersuchungen können bestätigen, dass das fluoreszenzoptische Verfahren mit Indolbildung eine hohe diagnostische Sicherheit mit einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand verbindet (SCHWIEN 1988).

In den Untersuchungen von HERNANDEZ et al. (1991) wurden Wasser-, Abwasser- und Kotproben auf das Vorkommen von *Escherichia coli* mit Hilfe der Mikromethode untersucht. Die Prozentzahl der positiven *Escherichia coli*-Proben, die zusätzlich noch in der Schubertbouillon auf Gas- und Indolbildung getestet wurden, deutete darauf hin, dass die β -D-Glucuronidaseaktivität ein zuverlässiges Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* ist. In anderen Untersuchungen von Wasser- und Abwasserproben mittels Mikromethode konnte dies ebenfalls bestätigt werden (DELILLE u. GLEIZON 2003; GARZIA-ARMISEN und SERVAIS 2004). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen korrespondieren mit diesen Angaben. Die β -D-Glucuronidaseaktivität wurde bei allen 120

untersuchten Proben festgestellt, durch eine statistische Tabelle ausgerechnet und als Nachweis von *Escherichia coli* dargestellt.

In dem vorliegenden Methodenvergleich erwies sich die Makromethode jedoch als vorteilhafter gegenüber der Mikromethode.

Die Ergebnisse der Makro- und Mikromethode, die durch zwei verschiedene statistische Tabellen ausgerechnet wurden, zeigen bei allen untersuchten Substraten (mit Ausnahme von Gülle), dass die Medianwerte der Makromethode im Durchschnitt zwischen einer halben und einer Zehnerpotenz höher liegen als bei der Mikromethode (siehe Abbildung 34). Bei den 30 untersuchten Gülleproben lagen die Medianwerte im gleichen Bereich von 10^4 KBE/g. Die gewonnenen maximalen Werte der Makromethode waren ebenfalls eine Zehnerpotenz höher als bei den durch die Mikromethode gewonnenen Ergebnissen. Eine Ausnahme bilden hier die Ergebnisse den untersuchten Speiseabfälle: hier war die errechnete *Escherichia coli* Anzahl von 10^4 KBE/g bei beiden Methoden gleich. Die minimalen Werte zeigten bei den untersuchten Substraten keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden getesteten Methoden. Die niedrigsten Konzentrationen lagen im Bereich von 10^1 KBE/g. Damit wurde bestätigt, dass auch die niedrigsten Konzentrationen nachgewiesen werden konnten.

Ein zweiter Vorteil der Makro- gegenüber der Mikromethode besteht in zwei biochemischen Eigenschaften, die nicht durch Miniaturverfahren bestätigt werden können: Laktose-Spaltung bei 44 °C und Indolbildung. Alle „gaspositiven“ Proben wurden zusätzlich auf Fluoreszenz und Indolbildung getestet. Es kann davon ausgegangen werden, dass mit einem fluoreszenzoptischen Verfahren und einer Inkubationstemperatur von 44 °C die präsumtiven *Escherichia coli* von anderen Coliformen differenziert werden können, wobei das Einbeziehen der Indolbildung ins Nachweisverfahren nach allgemeiner Ansicht sinnvoll erscheint.

In der folgenden Abbildung sind die gewonnenen Medianwerte aller untersuchten Substrate grafisch dargestellt.

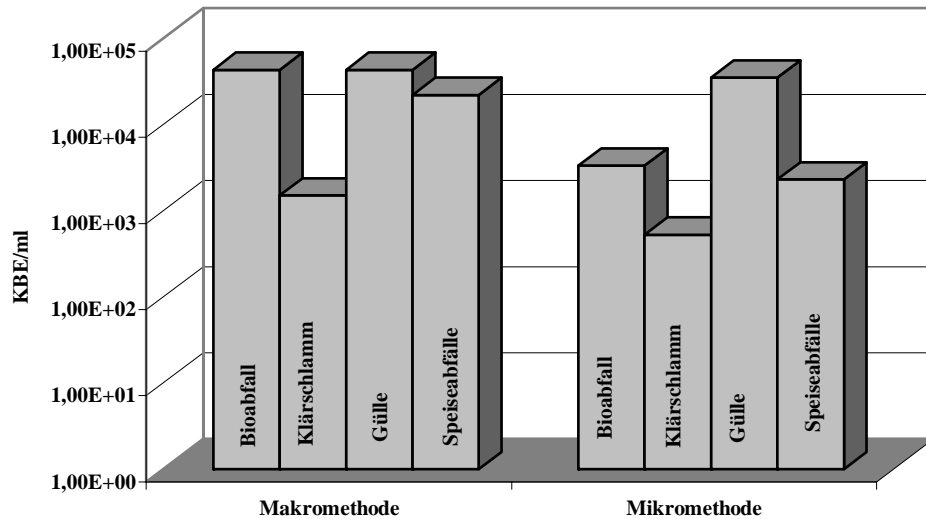


Abb. 35: Nachweis von *Escherichia coli* aus verschiedenen Substraten mit zwei unterschiedlichen MUG-fluoreszenzoptischen Methoden

In den vorliegenden Untersuchungen ergab sich für die Makromethode eine optimale Vorgehensweise in bezug auf Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand sowie den gewonnenen Ergebnissen. Im Gegensatz zur Makromethode lieferte die Mikromethode etwas schlechtere Ergebnisse, wobei dieser Unterschied nicht groß war und einer Verwendung dieser Methode nicht widerspricht.

Es wird jedoch empfohlen, biologische Substrate mit Hilfe der Makromethode zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Milan Drča

Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an einer mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von Speiseresten in Verbindung mit methodischen Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und *Escherichia coli* aus biologischem Material

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim

Eingereicht im Mai 2007

156 Seiten, 17 Tabellen, 35 Abbildungen, 307 Literaturstellen, 1 Anhang

Schlüsselworte: Biogasanlage, Hygienisierung, Speisereste, *Salmonella*, *Escherichia coli*

Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen

Es wurden folgende Versuchsvarianten an der Biogasanlage berücksichtigt: Keimträgerversuche während der Hygienisierung, Keimträgerversuche im mesophilen Reaktor und hygienisch-bakteriologische Untersuchungen des Substrates vor und nach der anaeroben Vergärung.

Das Ziel der Tenazitätsversuche mit den Keimträgern Typ 1 und Typ 2 während der Pasteurisierung und im mesophilen Reaktor lag darin, nachzuweisen, ob eine sichere Inaktivierung seuchenhygienisch relevanter Bakterien und Viren zu erreichen ist. Es wurden folgende Bakterien und Viren verwendet: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S negativ, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, Felines Calicivirus, ECBO-Virus und Bovines Parvovirus. Zusätzlich zu den Keimträgerversuchen wurde das Substrat vor und nach der anaeroben Behandlung („Input- und Outputkontrolle“) auf seinen Gehalt an Salmonellen, Enterokokken und Gesamtcoliforme sowie Fäkalcoliforme untersucht. Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen lag darin, die Effektivität der in der Biogasanlage ablaufenden Prozesse zu überprüfen.

Die Ergebnisse der Versuche zur Tenazität der eingebrachten Bakterien während der Hygienisierung zeigten bei allen untersuchten Bakterien eine Inaktivierung bzw. Keimzahlreduktion um mehr als sieben Zehnerpotenzen. Die Ergebnisse der Versuche zur Tenazität der eingebrachten Viren während der Hygienisierung zeigten eine vollständige Inaktivierung von ECBO- und Felinen Caliciviren. Dagegen konnte das Bovine Parvovirus während des gesamten Hygienisierungsprozesses nicht inaktiviert werden. Am Ende der

Hygienisierung betrug die Konzentration noch $10^{2,0}$ (KID₅₀/ml) bei einem Ausgangstiter von $10^{4,50}$ (KID₅₀/ml). Im mesophilen Reaktor wurden die ermittelten Konzentrationen von *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S negativ und *Escherichia coli* in einer Zeitspanne von 7 d um mehr als acht Zehnerpotenzen reduziert. *Enterococcus faecalis* erwies sich als wesentlich thermostabileres Testbakterium. Nach 14 d Aufenthaltszeit wurde die ermittelte Ausgangskonzentration von 10^8 KBE/ml um sechs Zehnerpotenzen reduziert.

Die Ergebnisse der hygienisch-bakteriologischen Untersuchungen der Substrate nach der Hygienisierung bzw. die ermittelten Konzentrationen von Gesamtcoliforme, Fäkalcoliforme und Enterokokken zeigten eine Inaktivierung von 5 log 10. In keiner der untersuchten Input- und Outputproben konnten Salmonellen nachgewiesen werden.

Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen aus biologischem Material

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die entsprechenden vier CEN-Nachweismethoden für Salmonellen mit den Substraten Klärschlamm-, Gülle und Erde zu erproben, um deren Eignung für die Praxis beurteilen zu können. Es wurden artifiziell kontaminierte Proben untersucht. Als Testbakterien diente *Salmonella Senftenberg*. Alle drei verwendeten *Salmonella*-Konzentrationen (10^1 , 10^2 und 10^3 KBE/ml) konnten durch die Methoden 2 (MPN-Verfahren) und Methode 3 (Filtrationsmethode) bei allen drei beimpften Substraten wiedergewonnen werden. Der qualitative Nachweis von *Salmonella Senftenberg* (Methode 4) konnte ebenfalls bei allen untersuchten Proben erbracht werden. Ein Vergleich der beiden Methoden 1 und 2, die jeweils der Ermittlung der wahrscheinlichsten Keimzahl dienen, zeigte die Ungenauigkeit der Methode 1. Das angewandte MPN-Verfahren der Methode 1 lieferte bei allen untersuchten Substraten, die mit einer Konzentration von 10^2 und 10^3 KBE/ml beimpft waren, einen ungenauen Wert von $>2,4 \times 10^2$ KBE/ml. Aufgrund der angewandten Nachweisverfahren sowie der gewonnenen Ergebnisse (mit Ausnahme der Methode 1) konnte festgestellt werden, dass die vorgeschlagenen Entwürfe zum Nachweis von Salmonellen für alle drei untersuchten Substrate geeignet sind.

Untersuchungen zum Nachweis von *Escherichia coli* aus biologischem Material

120 natürlich kontaminierte Gülle-, Klärschlamm-, Speiserest- und Bioabfallproben, wurden mittels zweier quantitativen MPN- Nachweismethoden (Makro- und Mikromethode) untersucht. Die gewonnenen Maximal- und Medianwerte der Makromethode lagen bei allen untersuchten Substraten durchschnittlich zwischen einer halben und einer Zehnerpotenz höher als bei der Mikromethode. Eine Ausnahme stellten allerdings die Medianwerte der untersuchten Gülleproben und die Maximalwerte den untersuchten Speiseabfallproben dar. Hierbei zeigten die beiden Methoden vergleichbare Werte. Aufgrund der Ergebnisse und der Tatsache, dass die Makromethode drei biochemische Eigenschaften von *Escherichia coli* umfasst, und damit eine sicherere Identifizierung von *Escherichia coli* gewährleistet, empfiehlt sich daher, bei Untersuchungen von biologischem Material die Makromethode anzuwenden.

7 Summary

Milan Drča

Sanitary and microbiological investigations in a mesophilic biogas plant using food waste and methodical trials for detection of *Salmonella* and *Escherichia coli* from biological waste

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig

and

Institute for Environmental and Animal Hygiene, University of Hohenheim

Submitted in May 2007

156 pages, 17 tables, 35 figures, 307 references, 1 appendix

Keywords :biogas plant, pasteurisation, food waste, *Salmonella*, *Escherichia coli*

Sanitary and microbiological investigations

The following combinations of assays were carried out in this study: assays with suitable germ carriers during pasteurisation, assays with suitable germ carriers in a mesophilic reactor in a biogas plant and bacteriological examinations of the substrate before and after treatment (“input- and output control”).

The purpose of the tenacity trials with the type 1 and type 2 germ carriers during pasteurisation and in the mesophilic reactor was to investigate whether a safe inactivating of specific bacteria and viruses can be attained. The following bacteria and viruses were used: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S negative, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, Feline Calicivirus, ECBO virus and Bovines Parvovirus. In addition to the germ carrier assays, the substrate from the biogas plant was examined for its *Salmonella*, enterococci, total and faecal coliforms before and after the anaerobic treatment (“input and output control”). The purpose of these assays was to ensure the efficiency of the processes used in the biogas plant.

The results of the tenacity tests during pasteurisation showed a reduction/inactivation of all of the bacteria assayed. All tested bacteria were reduced by more than 7 log₁₀ units.

The results of the tenacity tests during pasteurisation showed a totally inactivation of ECBO-Virus and feline calicivirus. The bovine parvovirus could not be inactivated during the whole hygienisation process. After 113.6 min the concentration was 10^{2.0} (KID50 / ml) in comparison with the initial concentration of 10^{4.50} (KID50 / ml) at the beginning of the exposure time.

During 7 d the determined concentrations of *Salmonella Senftenberg* W775 H₂S negative and *Escherichia coli* in the mesophilic reactor were reduced by more than 8 log₁₀ units. *Enterococcus faecalis* showed a higher tenacity. Its initial concentration of 10⁸ cfu/g was reduced by 6 log₁₀ units after 14 d of exposure time in the reactor. The determined concentrations of enterococci, total and faecal coliforms from the substrate after pasteurisation showed an inactivation of 5 log₁₀ units. *Salmonellae* were not found in the “input” or the “output” samples.

Detection of *Salmonella* from biological waste

The aim of this study was to evaluate the suitability of the four CEN Methods for the detection of *Salmonella* spp. in three different matrices (sewage sludge, manure and soil). The methods were compared to determine their ability and efficacy in detecting *Salmonella* from these three different types of biological waste. The different substrates were artificially contaminated with three different *Salmonella Senftenberg* concentrations (10¹-, 10²- and 10³ cfu/g). All three *Salmonella*-concentrations used were detected again using methods 2 (MPN-Method) and method 3 (Filtrations method) in all types of biological waste. The presence/absence method (method 4) was also able to detect *Salmonella Senftenberg* in all of the examined samples. A comparison of methods 1 and 2, both of which are used to determine the most probable number of bacteria, demonstrated the inaccuracy of method 1. The recovery of *Salmonellae* from biological wastes that were inoculated with concentrations of 10² cfu/g and 10³ cfu/g and analyzed with method 1, were > 2.4 x 10² cfu/g for all samples. These results demonstrate that it is easy to obtain reproducible results with the three methods used (with the exception of MPN method 1), and that they can be recommended for the detection of *Salmonellae* from all three used types of biological waste.

Detection of *Escherichia coli* from biological waste

A total of 120 naturally contaminated samples of sludge, biowaste, food waste, and manure were assayed with two CEN quantitative MPN methods (macromethod and micromethod). An analysis of the results of the macromethod and micromethod showed for all analysed substrates (except for the liquid manure) that the median, maximum and minimum values of the macromethod are, on average, between a half and one power higher than those of the micromethod. In the analysed liquid manure and food waste samples, the median and maximum values were in the same range. Based on the results of this study and the ability of the assay system to confirm the presence of *Escherichia coli* using three biochemical characteristics, the macromethod can be recommended for the detection and enumeration of *Escherichia coli* from biological waste samples.

8 **Literaturverzeichnis**

Abdala S, Vila J, Jimenez De Anta MT. Identification of *Salmonella* spp. with Rambach agar in conjunction with the 4-methylumbelliferyl caprylate (MUCAP) fluorescence test. Br J Biomed Sci. 1994; 51 (1): 5-8.

Abinatti FR, Warfield MS. Recovery of a hemadsorbing virus (Haden) from the gastrointestinal tract of calves. Virology. 1961; 14: 288-289.

Adams MR, Grubb SM, Hamer A, Clifford MN. Colorimetric Enumeration of *Escherichia coli* Based on β -D-Glucuronidase Activity. Appl Environ Microbiol. 1990; 56: 2021-24.

Ade-Kappelmann K, Lorenz H, Buchenauer H, Philipp W, Böhm, R.: Überprüfung der phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus der anaeroben Behandlung von Bioabfällen. Abschlußbericht zum DES Umweltbundesamt. Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim. 2004.

Adolph J. Monofermentation von Speiseresten. Schriftenreihe des Arbeitskreises Forschung und Lehre der Max Eyth-Gesellschaft zur Förderung der Agrartechnik. Frankfurt: 2004; Bd. 421: ISSN 0931-6264.

Alcaide E, Martinez JP, Martinez-Germes P, Garay E. Improved *Salmonella* recovery from moderate to highly polluted waters. J Appl Bacteriol. 1982; 53:143-46.

Aleksic S, Bockemühl J. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. Immun Infekt. 1990; 18: 178-85.

Alonso JL, Botella MS, Amoros I, Rambach A. *Salmonella* detection in marine waters using a short standard method. Water Research. 1992; 26: 973-78.

Andrews WH. Resuscitation of injured *Salmonella* spp. and coliforms from Foods. J Food Prot. 1986; 49: 62-75.

Andrews WH. Evolution of Methods for the Detection of *Salmonella* in Foods. J AOAC Intern. 1996; 79 (1): 4-12.

ANON. International Organisation for Standardization. Microbiology-General guidance for the detection of *Salmonella*. 1981; ISO-6579.

ANON. Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung-TrinkwV). 1990; BGBl I: 2613-29.

ANON. Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung-BioAbfV).. Bundesgesetzblatt Teil I, G 5702, Nr. 65, ausgegeben zu Bonn am 28. September 1998. 1998a; 2955-81.

ANON. ISO 9308-3: 1998. Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser. Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN Verfahren). (1998b).

ANON. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln. Horizontales Verfahren für den Nachweis von Salmonellen. Beuth Verlag GmbH;1998: 1-14. (1998 c).

ANON. Neufassung der Verordnung über die Zulassung von Düngemitteltypen sowie Anforderungen an Düngemittel, Natur- und Hilfsstoffe (DüMV). Umsetzung der Richtlinie 76/116/EWG des Rates vom 18. Dezember 1975 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten für Düngemittel (Abl. EG 1976 Nr. L 24, 21), zuletzt geändert durch die Richtlinie 98/3/EG der Kommission vom 15. Januar 1998 zur Anpassung der Richtlinie 76/116/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften für Düngemittel an den technischen Fortschritt (Abl. EG Nr. L 18, 15), BGBl I. 1758. (1999a).

ANON. Ringuntersuchung Bioabfall 2001. Hessisches Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz, LUFA Kassel. Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer. (2001a).

ANON. Wasserbeschaffenheit, Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien. Teil 1: Membranfiltrationsverfahren. DIN EN ISO 9308-1 (K 12) 2000-09. (2001b).

ANON. Water quality-General guide to enumeration of micro-organism by culture. ES ISO 8199:2001. (2001c).

ANON. Tierkörperbeseitigung (TierKBG), Bundesgesetzblatt Teil I Nr. 16, 523, ausgegeben zu Bonn, 20 April 2001. (2001d).

ANON. Characterisation of sludge-Detection of *Salmonella* spp. Part 1-3. CEN/TC 308, TC 308 WI 049. Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart (unveröffentlicht). (2002a).

ANON. Characterisation of sludge-Detection of *Escherichia coli*. Part 1-3. CEN/TC 308, TC 308 WI 049. Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart (unveröffentlicht). (2002b).

ANON. BMVEL, Bundesministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Merkblatt zur Errichtung und zum Betrieb von Biogasanlagen im landwirtschaftlichen Bereich. Berlin: 2002. (2002c).

ANON. Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte. (2002d).

ANON. Biogasanlagen in der Landwirtschaft. Infodienst aid – Verbraucherschutz, Ernährung, Landwirtschaft e.V. Bonn: 2003. (2003a).

ANON. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Salmonellen. ISO/DIS 19250-2003-07 (Norm Entwurf). (2003b).

ANON. Environment Agency. The Microbiology of Drinking Water. Part 4: Methods for the isolation and enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* (including *E. coli* 0157:H7). (2003c).

ANON. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2002. Robert Koch-Institut. Berlin: 2003. (2003d).

ANON. Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG). Artikel 1 des Gesetzes vom 25. Januar 2004 (BGB1. I S. 82) zuletzt geändert durch: Artikel 16b des Gesetzes vom 13. April 2006 (BGB1. I S. 855, 859). (2004a).

ANON. Anleitung zum Nachweis von Salmonellen aus Kompostproben im Rahmen von Ringversuchen durch das Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart (interne Arbeitsanleitung, unveröffentlicht). (2004b).

ANON. Verordnung (EG) Nr. 208/2006 der Kommission vom 7. Februar zur Änderung der Anhänge VI und VIII der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Verarbeitungsstandards für Biogas- und Kompostieranlagen sowie der Bestimmungen über Gülle. (2006a).

ANON. Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes TierNebV – Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung vom 27. Juli 2006 (BGB1. I Nr. 37 vom 3.8.2006 S. 1735). Gl.-Nr.: 7831 – 12-3. (2006b).

ANON. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005. Robert Koch Institut. Berlin: 2006. (2006c).

ANON. Erhebung des Vorkommens von *Campylobacter* spp. bei Masthänchen in Deutschland (Campylobacter-Monitoring-Projekt). Endbericht des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) vom 16. Juni 2006. Berlin: (2006d).

Aslam M, Greer GG, Nattress FM, Gill CO, McMullen LM. Genotypic analysis of *Escherichia coli* recovered from product and equipment at a beef-packing plant. J Appl Microbiol. 2004; 97: 78-86.

Bagge E, Sahlström L, Albiñ A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. Water Research. 2005; 39: 4879-86.

Bailey JS, Chi JY, Cox NA, Johnson RW. Improved selective procedure for detection of salmonellae from poultry and sausage products. J Food Prot. 1988; 51: 391-96.

Bailey JS, Cox NA. Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria* in foods. J Food Prot. 1992; 55: 256-59.

Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. Microbiol Rev. 1979; 43: 260-93.

Banwart GJ, Ayres JC. Effect of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. Appl Microb. 1953; 1: 296-301.

Banwart GJ. Basic food microbiology. Westport-Conneticut: the AVI publishing Company, INC. 1983; 326-27.

Barrow PA. Serological Diagnosis of *Salmonella* by ELISA and other Tests. In: Wray C, Wray A. (Hrsg.). *Salmonella* in Domestic Animals. Oxon: CABI Publishing; 2000: 407-27.

Baumgart J. Markerorganismen. In: Baumgart J. (Hrsg.). Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Hamburg: Behr's Verlag GmbH & Co.; 1999: 135-50.

Bänffer JRJ. Comparison of the Isolation of *Salmonellae* from Human Faeces by Enrichment at 37 °C and at 43 °C. Zbl Bakt I Abt Orig. 1971; 217: 35-40.

Becker H, Terplan G. Bedeutung und Systematik von Enterobacteriaceen in Milch und Milchprodukten. Deutsche Molkerei-Zeitung. 1987; 8: 204-10.

Becker H. Vergleichende Untersuchungen über die Eignung verschiedener neuerer Verfahren zum Nachweis präsumtiver *E. coli* in Käse. In: Hofmann G, Schwien G. (Hrsg.). Fluoreszenzoptischer Nachweis von *E. coli*, Grundlagen und Praxis. Würzburg: Merck-Seminar, GIT Verlag; 1988: 62-6.

Beckers HJ, Van Leusden FM, Meijssen MJM. Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of salmonellas in foods and feeding stuffs. J Appl Bacteriol. 1985; (59): 507-12.

Beckers HJ, Van Leusden FM, Roberts D, Pietzsch O, Price TH, Van Schothorst M, Beumer RR, Peters R, Kampelmacher E H. Evaluation of reference samples for the detection of Salmonella. Int J Food Microbiol. 1986; 3: 287-98.

Beckers HJ, Peters R, Pateer PM. Collaborative study on the isolation of *Salmonella* from reference material using selective enrichment media, prepared from individual ingredients or commercial dehydrated products. Int J Food Microbiol. 1987a ; 4: 1-11.

Beckers HJ, Roberts D, Pietzsch O, Van Schothorst M, Vassiliadis P, Kampelmacher EH. Replacement of Muller-Kaufmann's tetrathionate brilliant green bile broth by Rappaport-Vassiliadis magnesium chloride malachite green broth in the standard method for the detection of *salmonellae*. Int J Food Microbiol. 1987b; 4: 59-64.

Behmel U, Gleixner AJ. Mikrobiologische und technologische Grundlagen der Biogaserzeugung aus organischen Reststoffen und organisch hoch belasteten Abwässern. Innovas News. 1995; 2: 1-8.

Bendixen HJ. Safeguards against Pathogens in Danisch Biogas Plants. Wat Sci Tech. 1994; 30 (12): 171-80.

Bendixen HJ. Hygiene and Sanitation Requirements in Danisch biogas Plants. The future of biogas in Europe, Institute of Biomass Utilisation in Biorefinery, South Jutland University Centre. 1997; 50-8.

Bendixen HJ. Hygienische und sanitäre Anforderungen an dänische Biogasanlagen. Tagungsband 50 Jahre Biogas in der Landwirtschaft. Fachverband Biogas e. V. 1998

- Berg G, Berman D. Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges. *Appl Environ Microbiol.* 1980; 39: 361-68.
- Bergs CG. Bioabfälle/Bioabfallverordnung. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999, Universität Hohenheim. Stuttgart: 1999; 2-9.
- Beuth J, Schütt-Gerowitt H. Die Gattung *Listeria*, Listeriose. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischner R, Marre H, Pfister G, Pulverer G. (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage. München-Jena: Urban & Fischer; 2001: 388-90.
- Blanc M. RAMBACH-Agar. Laboratoires Humeaux, za de Gesvrine, La Chapelle-sur-Erdre, France. 1991.
- Blobel H, Schliesser, T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Jena-Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1994.
- Bockemühl J, Karch H, Rüssmann H, Aleksic S, Wiß R, Emmrich P. Shiga-like toxin (Verotoxin) produzierende *Escherichia coli* 022:H8. In: *Bundesgesundhbl.* 1990; 33: 3-6.
- Böhm, R. Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt *Dtsch Tierärztl Wschr.* 1993; 100: 275-78.
- Böhm, R. Hygieneaspekte die der getrennten Sammlung sowie der Handhabung von Bioabfällen. In: *RHINO-Fachkongress, Bioabfall-Management 1993*. Köln: Rheinisches Institut für Ökologie; 1993; 98-110.
- Böhm, R. Die Problematik der Festsetzung mikrobiologischer Grenz- und Richtwerte in der Umwelthygiene. Tagungsband zur 27. Hohenheimer Umwelttagung: Grenzwerte und Grenzwertproblematik im Umweltbereich, 27. Januar 1995, Universität Hohenheim. Stuttgart: 1995; 75-86.
- Böhm, R. Die Bewertung von mesophilen und thermophilen Kofermentationsverfahren aus Sicht der Hygiene. In: Märkl H, Stegmann R. (Hrsg.). *Technik anaerober Prozesse*. Frankfurt: Dechema, 1998; 215-230.
- Böhm, R. Begründung der Hygieneregeln und vergleichbare Regelungen in anderen Ländern. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar. Biologische Abfallbehandlung-Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999, Universität Hohenheim. Stuttgart: 1999; 31-47.

- Böhm, R. What need for specific rules for composting of biowaste and catering waste. In: Langenkamp L, Marmo L. (Hrsg.). Biological treatment of biodegradable waste, technical aspects, Workshop, European Commission, Joint Research Centre. EUR 20517 EN. 2003: 45-63.
- Braumiller, P. Dissertation in Vorbereitung. In Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim. Stuttgart: 2000.
- Braun R. Biogas-Methangärung organischer Abfallstoffe. Wien-New York: Springer Verlag; 1982.
- Bredie WLP, Boer E. Evaluation of the MPN, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for the enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin. Intern J Food Microbiol. 1992; 16: 197-208.
- Breitenfeldt, P. Untersuchungen zur Human- und Veterinärhygiene der Bioabfallkompostierung. (Agrarwiss. Dissertation). Stuttgart: Univ. Hohenheim; 2000.
- Brenner KP, Rankin CC, Roybal YR, Stelma GN, Scarpino PV, Dufour AP. New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water. App Environ Microbiol. 1993; 59: 3534-44.
- Bryant MP. Methane-Producing Bacteria. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition. Baltimore: the Williams & Wilkins Company; 1974.
- Bordalo AA, Onrassami R, Dechsakulwatana C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). J Appl Microbiol. 2002; 93: 864-71.
- Buderer M. Abwasserdesinfektion mittels UV-Bestrahlung und Ozoneintrag und die Auswirkung einer vorgeschalteten Sandfiltration (Dissertation med. vet.). Gießen: Justus-Liebig-Univ. Gießen; 1994.
- Burtscher C, Fall PA, Christ O, Wilderer PA, Wuertz S. Detection and survival of pathogens during two-stage thermophilic/mesophilic anaerobic treatment of suspended organic waste. Wat Sci Tech. 1998; 38: 123-26.
- Busse M. Media for salmonella. Intern J Food Microbiol. 1995; 26: 117-31.
- Busta FF. Introduction to injury and repair of microbial cells. Advances in Applied Microbiology. 1978; 23: 195-200.

Bülte M. Nachweis von toxinogenen und apathogenen *E. coli* auf MUG-Nährmedien. In: Hofmann G, Schwien U. (Hrsg.). Fluoreszenzoptischer Nachweis von *E. coli*, Grundlagen und Praxis. Würzburg: Merck-Seminar, GIT Verlag; 1988: 54-61.

Bülte M. Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* -Stämme (EHEC). In: Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz. 2002; 45: 484-90.

Bülte M. *Campylobacter* spp. In: Sinell HJ. (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag; 2004a: 43-45.

Bülte M. Virusinfektionen. In: Sinell HJ. (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag; 2004b: 57-60.

Bülte M. *Listeria monocytogenes*. In: Sinell HJ. (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag; 2004c: 52-55.

Bülte M. Enterovirulente *Escherichia coli* (EVEC). In: Sinell HJ. (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag; 2004d: 33-37.

Carrington EG, Harman SA, Pike E B. Inactivation of *Salmonella* during anaerobic digestion of sewage sludge. J Appl Bacteriol. 1982; 53: 331-34.

Carlson VL, Snoeyenbos GH, Mckie BA, Smyser CF. A comparison of incubation time and temperature for the isolation of *Salmonella*. Avian Diseases. 1967; 11: 217-25.

Chang CT, You CY, Shen HC, Li AM, Chen CY, Chou JL, Huang SP. Recovery of *Salmonella* by Using Selenite Brilliant Green Sulfa Enrichment Broth. J Clin Microbiol. 1999; 37(12): 4120-23.

Clair VJS, Klenk MM. Performance of three methods for the rapid identification of *Salmonella* in naturally contaminated foods and feeds. J Food Prot. 1990; 53: 961-64.

Cole DJ, Hill VR, Humenik FJ, Sobsey MD. Health, safety and environmental concerns of farm animal waste. Occupational Medicine. 1999;14 (2): 423-48.

Corry JEL, Kitchell AG, Roberts TA. Interaction in the Recovery of *Salmonella* damaged by heat or gamma radiation. J Appl Bacteriol. 1969; 32: 415-511.

D'aoust JY, Maishment C. Pre-enrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods. J Food Protect. 1979; 42: 153-57.

D'aoust JY. Update on preenrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods. J Food Protect. 1981; 44: 369-74.

Dedie K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer KJ, Weinke T. Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1993.

Delille D, Glezon F. Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding the Port-aux-Francais permanent station (Kerguelen Island). Mar Pollut Bull. 2003; 46: 1179-83.

De Man JC. MPN Tables, Corrected. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1983; 17: 301-05.

Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. J Hosp Infect. 1999; 41: 51-57.

Doyle MP, Roman DJ. Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH. J Food Protect. 1981; 44: 596.

Doyle MP. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. Appl Environ Microbiol. 1984; 51: 533.

Dusch H, Altwegg M. Evaluation of Five New Plating Media for Isolation of *Salmonella* Species. J Clin Microbiol. 1995; 33 (4): 802-04.

Dürr HD. Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Biogasproduktion aus verschiedenen Mistarten in liegenden Laborfermentern. (Agrarwiss. Dissertation). Stuttgart: Univ. Hohenheim; 1983.

Eccles JP, Searle R, Holt D, Dennis PJ. A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. J Appl Microbiol. 2004; 96: 375-83.

Edberg SC, Allen MJ, Smith DB, the national collaborative study. National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method. Appl Environ Microbiol. 1988; 54: 1595-1601.

Edberg SC, Allen MJ, Smith DB, the national collaborative study. National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with Presence-Absence Techniques. Appl Environ Microbiol. 1989; 55: 1003-08.

Edel W, Kampelmacher EH. *Salmonella* isolation in nine European laboratories using a standardized technique. Bull Wld Hlth Org. 1969; 41: 297-306.

Edel W, Kampelmacher EH. Comparative studies on the isolation of „sublethally injured“ *salmonellae* in nine European laboratories. Bull Wld Hlth Org. 1973; 48: 167-74.

Edel W, Kampelmacher EH. Comparative studies on *Salmonella* isolations from feeds in ten laboratories. Bull Wld Hlth Org. 1974; 50: 421-26.

Eder B. Hygienisierungswirkung von Biogasanlagen. In: Schulz H, Eder B. (Hrsg.). Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele. Staufen bei Freiburg: Ökobuch; 2001: 130-36.

Estrada IB, Aller A, Aller F, Gómez X, Morán A. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. Biores Technol. 2004; 93: 191-98.

Ewing WH. Edwards and Erwing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th Ed. New York- Amsterdam, Oxford: Elsevier; 1986.

Faber JM. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. Int J Food Microbiol. 1989; 8: 258-91.

Fagerberg DJ, Avens JS. Enrichment and Plating Methodology for *Salmonella* Detection in Food. A Review. J Milk Food Technol. 1976; 39 (9): 628-46.

Farrah SR, Bitton G. Bacterial Survival and Association with Sludge Flocs During Aerobic and Anaerobic Digestion of Wastewater Sludge Under Laboratory Conditions. Appl Environ Microbiol. 1983; 45: 174-81.

Fehlhaber K. Streptokokken- und „unspezifische“ Lebensmittelvergiftungen. In: Sinell HJ. (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag; 2004: 79-81.

Flores-Abuxapqui JJ, Puc-Franco MA, Heredia-Navarrete MR, Vivas-Rosel ML, Franco-Monsreal J. Comparison between sodium selenite and sodium tetrathionate broths, incubated at 37 °C and 42 C for the isolation of *Salmonella* spp. from faeces of carries. Rev Biomed. 2003; 14: 215-20.

- Chen KH, Robins JA, Mattingly DA, Gabis DA, Silliker JH. Comparison study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. J Food Sci. 1987; 52: 781-85.
- Frempton EW, Restiano L. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta- glucuronidase detection. J Appl Microbiol. 1993; 74: 223-33.
- Fricker CR. A comparison of isolation procedures for salmonellas from polluted water using two forms of Rappaport's medium. J Appl Bacteriol. 1984; 56: 305-09.
- Fricker CR, Quail E, McGibbon L, Girdwood RWA. An evaluation of commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis medium for the isolation of *salmonellae* from poultry. J Hyg Camb. 1985; 95: 337-44.
- Fricker CR. The isolations of salmonellas and campylobacters: a review. J Appl Bacteriol. 1987; 63: 99-116.
- Fukushi K, Babel S, Burakrai S. Survival of *Salmonella* spp. in a simulated acid-phase anaerobic digester treating sewage sludge. Biores Techn. 2003; 86: 177-81.
- Gadre RV, Ranade DR, Godbole SH. A note on survival of salmonellas during anaerobic digestion of cattle dung. J Appl Bacteriol. 1986; 60: 93-96.
- Garzia-Armisen T, Servais P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. J Microbiol Methods. 2004; 58: 269-79.
- Gasparovic E. Untersuchungen über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Rohmilch in Südwürttemberg. 1988.
- Gast RK, Mitchell BW, Holt PS. Evaluation of culture media for detecting airborne *Salmonella enteritidis* collected with an electrostatic sampling device from the environment of experimentally infected laying hens. Poult Sci. 2004; 83(7): 1106-11.
- Gauthier F, Archibald F. The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water system. Water Research. 2001; 35: 2207-18.
- Gelderblom HA. Astro- und Caliciviren, Hepatitis E-Virus. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischner R, Marre H, Pfister G, Pulverer G. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage. München-Jena: Urban & Fischer; 2001: 613-616.

Giess S. Bioabfallkompostierung: Untersuchungen zur Seuchenhygiene. Ministerium für Umwelt Baden-Württemberg (Hrsg.). Stuttgart, Kernerplatz 9; 1992.

Greenfield J, Bigland CH. Selective inhibition of certain enteric bacteria by selenite media incubated at 35 and 43 C. *Can J Microbiol.* 1970; 16: 1267-71.

Grunnet K. Salmonella in Sewage und Receiving Waters: Assessment of Health Hazards Due to Microbially Polluted Waters. Copenhagen-Århus-Odense: FADL's FORLAG; 1975: ISBN 87 7437 497 4.

Guenich, HH. Müller HE. Isolierung und Keimzahlbestimmung von *Listeria monocytogenes* in ungeklärtem und biologisch gereinigtem Abwasser. *Zentralbl Bakt Hygiene.* 1984; 179: 266-73.

Haas B, Ahl R, Böhm R, Strauch D. Inactivation of virus in liquid manure. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1995; 14: 435-45.

Hacker J, Ott M, Tschäpe H. Das Problem der Pathogenität von *Escherichia coli* und seine Bedeutung für die rekombinante DNA-Technologie. *Bioforum.* 1991; 14: 150-57.

Hahn G, Heeschen W, Tolle A. Streptococcus. *Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* Kieler: 1970; 22: 333-46.

Hansen W, Yourassowsky E. Detection of betaglucuronidase in lactose-fermenting members of the family *Enterobacteriaceae* and its presence in bacterial urine cultures. *J Clin Microbiol.* 1984; 20 (6): 1177-79.

Harvey RWS, Thompson S. Optimum temperature of incubation for isolation of *salmonellae*. *Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service.* 1953; 12: 149-50.

Harvey RWS, Price TH. Studies on the isolation of *Salmonella dublin*. *J Hyg Camb.* 1975; 74: 369-74.

Harvey RWS, Price TH. A review: principles of *Salmonella* isolation. *J Appl Bacteriol.* 1979; 46: 27-56.

Haumacher R. Aerobiologische Untersuchungen zur Keimemission aus Biotonnen in Abhängigkeit von deren Bauart, der Abholfrequenz und der Jahreszeit. Beuren-Stuttgart: Verlag Grauer; 2003.

Heeschen W. Gesamtproblematik des *E. coli*-Nachweises. In: Hofmann G, Schwiem U. (Hrsg.). Fluoreszenzoptischer Nachweis von *E. coli*, Grundlagen und Praxis. Würzburg: Merck-Seminar, GIT Verlag; 1988: 4-15.

Heesemann J. Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischner R, Marre H, Pfister G, Pulverer G. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage. München-Jena: Urban & Fischer; 2001a: 315-23.

Heesemann J. Die Familie der *Enterobacteriaceae*. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischner R, Marre H, Pfister G, Pulverer G. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage. München-Jena: Urban & Fischer; 2001b: 283-314.

Heinonen-Tanski H, Philipp W, Böhm R. The role of ferrioxamine E in pre-enrichment medium for determining *Salmonella* in environmental samples according to ISO methods. Microbiol Res. 2000; 155: 65-68.

Heizmann W, Döller PC, Gutbrod B, Werner H. Rapid Identifikation of *Escherichia coli* by Fluorocult Media and positive Indole Reaktion. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2682-84.

Henry NG, Henry G Bayne, Garibaldi, John A. Heat resistance of *Salmonella*: the Uniqueness of *Salmonella senftenberg 775W*. Appl Environ Microbiol. 1969; 17 (1): 78-82.

Hernandez JF, Guibert JM, Delattre JM, Oger C, Charriere C, Hughes B, Serceau R, Sinegre F. Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide. Water Research. 1991; 25: 1073-78.

Hilker JS. Enrichment serology and fluorescent antibody procedures to detect *salmonellae* in foods. J Milk Food Techn. 1975; 38: 227-31.

Hoferer M. Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. (Dissertation med. vet.). Berlin: Freie Univ. Berlin; 2001.

Holth JT, Bird J, Hall KE. The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. J Appl Microbiol. 2004; 97: 68-77.

Horan NJ, Fletcher L, Betmal SM, Wilks SA, Keevil CW. Die-off enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Research*. 2004; 38: 1113-20.

Hornix WJ, Mannaerts SHWM. Van't Hoff and the Emergenze of Chemical Thermodynamics, Delft University Press. 2001; 212-242.

Höchst C. Genehmigung und Überwachung von Biogasanlagen im landwirtschaftlichen Bereich. Beitrag im Tagungsband 11. Jahrestagung: Biogas und Bioenergie in der Landwirtschaft, 5. und 6. Dezember, Rot am See, Internationales Biogas und Bioenergie Kompetenzzentrum. Kirchberg: 2002.

Huges KA. Influence of Seasonal Environmental Variables on the Distribution of Presumptive Fecal Coliforms around an Antarctic Research Station. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69: 4884-91.

Hughes KA, Thompson A. Distribution of sewage pollution around a maritime Antarctic research station indicated by faecal coliforms, *Clostridium perfringens* and faecal sterol markers. *Environ Poll*. 2004; 127: 315-21.

Humbert FS, Salvat G, Lalande F, Colin P. Miniaturized Most Probable Number and Enrichment Serology Technique for the Enumeration of *Salmonella* spp. on Poultry Carcasses. *J Food Protect*. 1997; 60: 1306-11.

Isenberg HD, Kominos S, Siegel M. Isolation of *salmonellae* and *shigellae* from an artificial mixture of fecal bacteria. *Appl Microbiol*. 1969; 18 (26): 656-59.

Jeffries L. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of *salmonellae* from faeces. *J Clin Path*. 1959; 12: 568-71.

June GA, Sherrod PA, Hammack TS, Amaguana RM, Anrews WA. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh, high contaminated foods, and poultry feed: collaborative study. *J AOAC Int*. 1996; 79: 1307-23.

Juteau P, Tremblay D, Ould-Moulaye CB, Bisailon JG, Beaudet R. Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors. *Water Research*. 2004; 38: 539-46.

Juven BJ, Cox NA, Bailey JS, Thomson JE, Charles OW, Schutze JV. Recovery of salmonella from artificially contaminated poultry feeds in non-selective and selective broth media. *J Food Protect*. 1984; 47: 299-302.

Johnes D, Seeliger HPR. The Genus *Listeria*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. (Hrsg.). *Prokaryotes*. Berlin: Springer Verlag; 1992: 1595-1616.

Johnes YE, McLaren IM, Wray C. Laboratory Aspect of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Hrsg.). *Salmonella in Domestic Animals*. Oxon: CABI Publishing; 2000; 393-405.

Kaaden OR. Viruskrankheiten der Tiere. In: Mayr A. (Hrsg.). *Rolle-Mayr-Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2002: 145-377.

Kabrick RM, Jewell WJ. Fate of pathogens in thermophilic aerobic sludge digestion. *Water Research*. 1982; 16: 1051-60.

Karuniawati A. Untersuchungen von Umweltproben auf „viable but not culturable“ Salmonellen und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Beuren-Stuttgart: Verlag Grauer; 2001: ISBN 3-86186-360-X.

Kauffmann F. Weitere Erfahrungen mit der kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellen Bazillen. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, medizinische Mikrobiologie*. 1935; 117: 26-32.

Kauffmann F. *Serological diagnosis of Salmonella spezies*. Munksgaard, Copenhagen. 1972.

Kauffmann F. *Das Fundament*. Munksgaard, Copenhagen. 1978.

Kautsch S. Entsorgung TBA-pflichtiger Küchenabfälle und Speisereste. Referat Veterinärwesen, Lebensmittelüberwachung und Pharmazie. Regierungspräsidium Leipzig: 2000.

Kearney TE, Larkin MJ, Frost JP, Levett PN. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J Appl Bacteriol*. 1993a; 75: 215-19.

Kearney TE, Larkin MJ, Levett PN. The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J Appl Bacteriol*. 1993b; 74: 86-93.

Kearney TE, Larkin MJ, Levett PN. Metabolic Activity of Pathogenic Bacteria during Semicontinuous Anaerobic Digestion. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 3647-52.

Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1988; 73: 169-87.

Kern M. Übersicht über ökonomische Rahmenbedingungen bei der Kompostierung und der Anaerobbehandlung. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar. Biologische Abfallbehandlung-Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999. Stuttgart: Universität Hohenheim; 1999: 95-111.

Kist M. Die Gattungen *Streptobacillus*, *Campylobacter* und *Helicobacter*. In: Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G. (Hrsg.). Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Stuttgart, Jena, New York: G. Fischer Verlag; 1994: 489-95

Kleer J. *Yersinia enterocolitica*. In: Sinell HJ. (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag; 2004: 37-40.

Knie A., Haumacher R, Martens W, Philipp W, Böhm R, Lorenz H, Hellwald KH, Buchenauer H. Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikatororganismen in anaeroben Kofermentationsanlagen. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben UTOX, Nr. 98009. In Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim. Stuttgart: 2001.

Koivunen J, Lanki E, Rajala RL, Siitonen A, Heininen-Tanski H. Determination of salmonellae from municipal wastewaters. *Water Sci Technol*. 2001; 43(12): 221-24.

Komatsu KK, Restiano L. Determination of the effectiveness of novobiocin added to two agar plating media for the isolation of *Salmonella* from fresh meat products. *J Food Safety*. 1981; 3: 183-92.

Kühn H, Rabsch W, Gericke B, Reissbrodt R. Infektionsepidemiologische Analysen von Salmonellosen, Shigellosen und anderen *Enterobacteriaceae*-Infektionen. *Bundesgesundheitsb* 1993; 8: 324-33.

Kühn H, Wonde B, Rabsch W, Reissbrodt R. Evaluation of Rambach agar for detection of *Salmonella* subspezies I to VI. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 749-51.

Kist M, Bockemühl J, Aleksic S, Altwegg M, Autenrieth IB, Bär W, Beutin L, Gerten B, Heintschel von Heinegg E, Karch H, Lehmacher A, Mehnert F, Sonnenborn U, Tschäpe T, von Eichel-Streiber C. MIQ 9: Qualitätsstandard in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. *Infektionen des Darmes*. München-Jena: Urban & Fischer Verlag; 2000: 32-40.

- Konstandt HG. Biogas-Anlagen, verfahrenstechnische und sicherheitstechnische Probleme und Maßnahmen. In: Stadlbauer EA, Sixt H, Konstandt HG. (Hrsg.). Biogasanlagen, Reihe Kontakt und Studium. Grafenau/Württ; Expert Verlag; 1982: 103.
- Konstandt HG. Verfahrens- und sicherheitstechnische Maßnahmen beim Entwurf und Betrieb von Biogasanlagen. In: Mach RE, Blickwedel PT. (Hrsg.). Biogas aus Abfall und Abwasser. Berlin: Verlag E. Schmidt; 1983.
- Larsen HE, Munch B, Schlundt J. Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in BGPs. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1994; 195: 544-55.
- Le Minor L, Popoff MY. Request for an opinion: Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov., nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int J Syst Bacteriol. 1987; 37: 465-68.
- Leon-Velarde CG, Cai HY, Larkin C, Bell-Rogers P, Stevens RWC, Odumeru JA. Evaluation of methods for the identification of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 from poultry environmental samples. J Microbiol Meth. 2004; 58: 79-86.
- Leuze M. Hygienische Untersuchungen über das Verhalten von Viren bei der 2-stufigen anaeroben Klärschlammstabilisierung. Gießen; 1984.
- Levine M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J Infect Dis. 1987; 155: 377-94.
- Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosos. Vet J. 1997; 153: 9-29.
- Lovet J. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Food Techn. 1988; 42 (4): 172-75.
- Löbberth FJ. Sicherheitsstandards in der Lebensmittelresteverwertung. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle. 1996; 2: 178-82.
- Lund B, Jensen VF, Have P, Ahring B. Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 25-31.
- Maddocks S, Olma T, Chen S. Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and Salmonella-Shigella Agars for Isolation of Salmonella Strains from Stool Samples. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2999-3003.

Mahnel H. Resistenzunterschiede zwischen Viren verschiedener Gruppen gegenüber einigen chemisch-physikalischen Dekontaminationsverfahren. *Infection*. 1979; 7: 240-46.

Martens M, Fink A, Philipp W, Winter D, Böhm R. Seuchenhygienische Bewertung von Anaerobverfahren. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: Biologische Abfallbehandlung- Erste Erfahrung mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999, Universität Hohenheim. Stuttgart: 1999; 150-63.

Mc Ghee TJ. Low temperature anaerobic digestion. Dissertation, University of Kansas, Ann Arbor, Michigan. 1968.

Mitterleitner H. Die Stärken und Schwächen der einzelnen Gärsysteme. *Biogas top agrar extra*. Münster: Landwirtschaftsverlag GmbH; 2000: 19-20.

Monteith HD, Shannon EE, Derbyshire JB. The inactivation of a bovine enterovirus and a Bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. *J Hyg Camb*. 1986; 97: 175-84.

Moos A. Aerobe und anaerobe Behandlung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft unter den Aspekten der Seuchenhygiene. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere. 2000; 95: HS 095.

Mossel DAA. Index and indicator organisms-a current assessment of their usefulness and significance. *Food Technology in Australia*. 1978; 30: 212-19.

Müller L. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la bacille typhique et des paratyphiques. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 1923; 89: 434-37.

Mundt JO. Enterococci. In: Sneath PHA. (Hrsg.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986.

Nilehn B. Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. *Acta path Microbiol Scand Suppl*. 1969; 206: 1-48.

Norton DM, McCamey MA, Gall KL, Scarlett JM, Boor KJ, Wiedmann M. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Appl Environ Microbiol*. 2001a; 67: 198-205.

Norton DM, Scarlett JM, Horton K, Sue D, Thimothe J, Boor KJ, Wiedmann M. Characterisation and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Appl Environ Microbiol.* 2001b; 67: 646-53.

Oechsner H. Erhöhung der Energieproduktion landwirtschaftlicher Biogasanlagen durch Zusatz von Speiseabfällen. Energy generated from Residual and Waste Substances. CIGR-International Commission of Agricultural Engineering IV Hohenheim Energy and Agriculture vom 25.-28. September, 1995, Topic 3, Paper 24. Stuttgart: 1995.

Olsen JE, Larsen HE. Bacterial Decimation Times in Anaerobic Digestions of Animal Slurries. *Biol Wast.* 1987; 21: 153-68.

Olsen JE. Studies on the Reduction of Pathogenic and Indicator Bacteria in Liquid Pig Manure Treated by Sedimentation and Anaerobic Filter Digestion for Methane Generation. *Biol Wast.* 1988; 24: 17-26.

Olsen JE. Molekular Typing of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Hrsg.). *Salmonella in Domestic Animals*. Oxon: CABI Publishing; 2000; 429-46.

Ottoson J, Stenström TA. Faecal contamination of greywater and associated microbial risks. *Water Research.* 2003; 37: 645-55.

Pesaro F, Sorg I, Metzler A. In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61 (1): 92-7.

Peterz M, Wiberg C, Norberg P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in homemade and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. *J Appl Bacteriol.* 1989; 66: 523-28.

Philipp W, Böhm R. Hygieneanforderungen an Verfahren der Bioabfallvergärung. In: Wiemer K, Kern M. (Hrsg.). *Bio- und Restabfallbehandlung*. Fachbuchreihe Abfallwirtschaft. Witzhausen: M. I. C.-Baeza-Verlag; 1997: 313-44.

Philipp W. Hygieneprobleme und Risikobetrachtung bei der Anwendung von organischen Düngemitteln. Bericht, Institut für Umwelt und Tierhygiene, Universität Hohenheim. Stuttgart: 2002a.

Philipp W. Verfütterungsverbot von Speiseresten-Zukünftige Verwertung in Biogasanlagen. Beitragung im Tagungsband 11. Jahrestagung, Biogas und Bioenergie in der Landwirtschaft, 5. und 6. Dezember 2002, Rot am See, Internationales Biogas und Bioenergie Kompetenzzentrum. Kirchberg; 2002b

Pietsch O. Salmonella. In: Blobel H, Schlisser Th. (Hrsg.). Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. III. Stuttgart-New York: G. Fischer Verlag;1981: 344-52.

Pietzsch O, Kempf G. Salmonellen in Futtermitteln. Zbl Vet-Med Reihe B. 1984; 31: 343-57.

Pignato S, Marino AM, Emanuele MC, Iannotta V, Caracappa S, Giammanco G. Evaluation of New Culture Media for Rapid Detection and Isolation of *Salmonellae* in Foods. Appl Environ Microbiol. 1995; 61 (5): 1996-99.

Pignato S, Giammanco G, Giammanco S. Rambach agar and SM-ID medium sensitivity for presumptive identification of *Salmonella* subspecies I-IV. J Med Microbiol. 1995a; 43: 68-71.

Plym-Forshell L. Survival of *Salmonellas* and *Ascaris suum* eggs in a termophilic BGP. Acta Vet Scand. 1995; 36 (1): 79-85.

Pinkepank T, Böhm R, Martens W, Philipp W. Untersuchungen zur Seuchenhygiene bei der Vergärung (Kofermentation) von Speiseabfällen zusammen mit Gülle. Abschlußbericht zum FVO, Nr. U 47-95.07/2, Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim. Stuttgart: 1997.

Podbielski A, Lütticken R. Die Familie der *Streptococcaceae*. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischner R, Marre H, Pfister G, Pulverer G. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage. München-Jena: Urban & Fischer; 2001: 260-74.

Pohlig-Schmitt M. Seuchenhygienische Untersuchungen bei der thermophilen und mesophilen anaeroben alkalischen Faulung von kommunalem Klärschlamm. In Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim. Stuttgart: 1987.

Pourcher AM, Devriese LA, Hernandez JF, Delattre JM. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. J Appl Bacteriol. 1991; 70: 525-30.

- Pöhn HPH. Salmonellose-Überwachung beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland. Jahresberichte 1978-1980 des Zentralen Überwachungsprogramms für Salmonellosen des Bundesgesundheitsamtes. Berlin: Dietrich Reimer Verlag; 1982.
- Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56: 301-03.
- Rapp A. Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Güllegemeinschaftsanlagen. (Agrarwiss. Dissertation). Stuttgart: Univ. Hohenheim; 1995.
- Rappaport F, Konforti N, Navon B. A new enrichment medium for certain *salmonellae*. *J clin Path.* 1956; 9: 261-66.
- Read SC, Irwin RJ, Poppe C, Harris J. A comparison of two methods for isolations of *Salmonella* from poultry litter samples. *Poultry Science.* 1994; 73: 1617-21.
- Rehman SUR. Untersuchungen zum viruziden Effekt bei der Erhitzung von Speiseabfällen für die Schweinemast. *Tierärztliche Umschau.* 1987; 42 (11): 892-97.
- Reissbrodt R. Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella*: an overview. *Biotest Bulletin.* 1995; 5:143-56.
- Reissbroth R, Rabsch W. Selective pre-enrichment of *Salmonella* from eggs by siderophore supplements. *Zentralbl Bakteriologie Abt. 1 Orig.* 1993; 279: 344-53.
- Rolle M, Mayr A. *Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 4. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 1978.
- Rolle M, Mayr A. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 5. Auflage, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1984.
- Rolle M, Mayr A. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 1993.
- Ruiz J, Luz-Nunez M, Climent C, Sempere MA, Gomez J. Use of Rambach agar for the detection of *Salmonella* in feces using broth enrichment. Comparison with our methodology. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 1995; 13 (4): 213-7.

Sahlström L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*. 2003; 87: 161-66.

Sahlström L, Aspan A, Bagge E, Danielsson-Tham ML, Albiñ A. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatments plants. *Water Research*. 2004; 38: 1989-94.

Sahlström L. *Recycled Biowaste as a Source of Infection* (Doctoral dissertation). Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences; 2006: ISSN 1652-6880, ISBN 91-576-7119-2.

Samhan F. *Coliphages as indicators and test organisms for assessment of hygienic safety of water, wastewater and liquid organic wastes*. Beuren-Stuttgart: Verlag Grauer; 2005: ISBN: 3-86186-503-3.

Sasali HR, Parker WJ, Sattar SA. Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Can J Microbiol*. 2006; 52 (4): 279-86.

Schadewinkel-Scherkl AM, Scherkl R. Novobiocin. In: *Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1995: 107-108.

Schattauer A, Weiland P. Grundlagen der anaeroben Fermentation. In: *Handreichung-Biogasgewinnung und Nutzung*. Herausgegeben von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 2004; 25-36.

Scherer PA. Vergärung. In: Thomé-Kozmiensky KJ, (Hrsg.). *Biologische Abfallbehandlung*. Berlin: EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik; 1995: 359-402.

Schindler P. MUG-Laurylsulfat-Bouillon-ein optimales Nachweismedium für gesamtcoliforme und fäkalcoliforme Bakterien im Rahmen der hygienischen Überprüfung von Badegewässern gemäß der EG-Richtlinie 76/160 EWG. *Zbl Hyg*. 1991; 191: 438-44.

Schindler P. Coli-Coliforme. In: Schulze E. (Hrsg.). *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen, Band 1*. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm: G. Fischer Verlag; 1996: 36-53: ISBN 3-437-35160-5.

Schindler P. Hygiene der Badegewässer. *Gesundheitswesen - Sonderheft 2*. 2001; 63: 142-50.

Schlegel H. Allgemeine Mikrobiologie, 7. überarbeitete Auflage. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 1992.

Schlund J, Munch B. A Comparison of the Efficiency of Rappaport-Vassiliadis, Tetrathionate and Selenite Broths with Pre-enrichment for the Isolation of *Salmonella* in Animal Waste Biogas Plants. Zbl Bakt. 1993; 279: 336-43.

Schmidt-Hornig G. Vorgehen der Bundesländer zur Umsetzung der Bioabfallverordnung am Beispiel Baden-Württemberg. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar. Biologische Abfallbehandlung-Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999, Universität Hohenheim. Stuttgart: 1999; 48-54.

Scholwin F, Weidele T, Gattermann H, Schattauer A, Weiland P. Grundlagen der anaeroben Fermentation. In: Handreichung-Biogask Gewinnung und Nutzung. Herausgegeben von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 2004; 36-85.

Schwarz M. Vergleichende seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an horizontal und vertikal beschickten, bewachsenen Bodenfiltern mit vorgeschalteter Mehrkammerausfallgrube bzw. einem als Grobstoff-Fang dienenden Rottebehälter (Rottefilter) (Dissertation med. vet.). Berlin: Freie Univ. Berlin; 2003.

Schwien U. Der fluoreszenzoptische Nachweis von *E. coli*. In: Hofmann G, Schwien U. (Hrsg.). Fluoreszenzoptischer Nachweis von *E. coli*, Grundlagen und Praxis. Würzburg: Merck-Seminar, GIT Verlag; 1988: 24-34.

Seeliger HPR, Johnes D. *Listeria*. In Sneath PH et al. (Hrsg.). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2. Baltimore: the Williams & Wilkins Co; 1986: 1235-1245.

Selbitz HJ. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Jena-Stuttgart: Fischer Verlag; 1992: 91-108.

Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayr A. (Hrsg.). Rolle-Mayr: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2002: 417-589.

Singleton P, Sainsbury D. Dictionary of Microbiology and Molekular Biology, 3rd Edition. Chichester-New York-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto: John Wiley & Sons, LTD; 2001.

Slanetz LW, Bartley CHJ. Detection and sanitary significance of faecal Streptococci in water. Am K Publ Health. 1966; 54: 609-11.

Smith HG. Observations on the Isolation of *Salmonellae* from Selenit Broth. J appl Bact. 1952; 22 (1): 116-24.

Smith SR, Lang NL, Cheung KH, Spanoudaki K. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. Waste Management. 2005; 25: 417-25.

Smyser CF, Snoeyenbons GH. Evaluation of several methods of isolating salmonellae from poultry litter and animal feedstuffs. Avian Diseases. 1969; 13: 134-41.

Soldierer W. Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss einer thermischen Desinfektion von Flüssigmist auf die Vermehrungsfähigkeit ausgewählter Mikroorganismen (Dissertation med. vet.). Gießen: Justus-Liebig-Univ. Gießen; 1991.

Spillmann SK, Traub F, Schwyzer M, Wyler R. Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. Appl Environ Microbiol. 1987; 53: 2077-81.

Staffa W. *Salmonella Typhimurium* DT 104 aus einer mesophilen Biogasanlage: Überlebenszeiten und experimentelle Inaktivierung durch ausgewählte organische Säuren (Dissertation med. vet.). Leipzig: Univ. Leipzig; 2003.

Stampi S, De Luca G, Varoli O, Zanetti F. Occurance, removal and seasonal variation of thermophilic *Campylobacters* and *Arcobacter* in sewage sludge. Zentr Bl Hyg Umweltmed. 1998/1999; 202: 19-27.

Stelzer W, Jacob J, Schulze E, Mochmann H. Untersuchungen zum Vorkommen und Überleben von *Campylobacter* im Klärschlamm. Zentralbl Mikrobiol. 1991; 146: 17-23.

Stevik TK, Aa K, Ausland G, Hanssen JF. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. Water Research. 2004; 38: 1355-67.

Strauch D. Hygienische Gesichtspunkte der Lagerung und Ausbringung von Stallmist und Gülle. D Tierzüchter. 1981; 33: 149-50.

Strauch D. Hygiene of animal waste management. In Animal production and enviromental health. Amsterdam: Elsevier; 1987: 155-202.

Strauch D. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1991; 10 (3): 813-46.

Strauch D. Hygieneaspekte bei der Nutzung landwirtschaftlicher Biogasanlagen zur Kofermentation. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle.* 1997; 1+2: 61-69/121-132.

Sueiro RA, Araujo M, Santos CJ, Gómes MJ, Garrido MJ. Evaluation of Coli-ID and MUG Plus media for recovering *Escherichia coli* and other coliform bacteria from groundwater samples. *Wat Sci Techn.* 2001; 43: 213-16.

Swaminathan B, Harmon MC, Mehlman IJ. A review *Yersinia enterocolitica.* *J Appl Bacteriol.* 1982; 52: 151-83.

Termorshuizen AJ, Volker D, Blok WJ, Ten Brummeler E, Hartog BJ, Janse JD, Knol W, Wenneker M. Survival of human and plant pathogens during anaerobic mesophilic digestion of vegetable, fruit, and garden waste. *Europ J Soil Sci.* 2003; 39: 165-71.

Thomason BD, Dodd DJ, Cherry WB. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *Appl Environ Microbiol.* 1977; 34: 270-73.

Thomason BM, Dodd DJ. Enrichment procedures for isolating *salmonellae* from raw meat and poultry. *Appl Environ Microbiol.* 1978; 36: 627-28.

Tisler L. Zur Problematik mikrobiologischer Hygienetest in Lebensmittelbetrieben. *Forum-Städte-Hygiene.* 1987; 38: 42-43.

Traub F, Spiellmann SK, Wyler R. Method for determining virus inactivation during sludge treatment vprocesses. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 52 (3): 498-503.

Tompkin RB. General Interest: Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *J Food Protect.* 2002; 65 (4): 709–25.

Tschäpe H, Bockemühl J. Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.- Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz .* 2002; 45: 491-96.

Van Leudsen FM, Van Schothorst M, Beckers HJ. The standard *Salmonella* isolation method. In: Coffy JEL, Roberts D, Skinner FA. (Hrsg.). *Isolation and Identification Methods for Food Poisoning Organisms.* SAB Technical Series. London: Academic Press; 1982: 35-49.

Van Netten P, Perales J, Van De Moosdijk A, Curtis GDW, Mossel DAA. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int J Food Microbiol. 1989; 8 (4): 299-316.

Vassiliadis P, Pateraki E, Papaiconomou N, Papadakis JA, Trichopoulos D. Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. Annales de Microbiologie (Institut Pasteur), 127B. 1976; 195-200.

Vassiliadis P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the Isolation of Salmonellas: an overview. J Appl Bacteriol. 1983; 54: 69-76.

Vilanova X, Manero A, Cerda-Cuellar M, Blanch AR. The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters. J Appl Microbiol. 2002a; 92: 210-14.

Vilanova X, Manero A, Cerda-Cuellar M, Blanch AR. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. J Appl Microbiol. 2002b; 96: 279-88.

Yamamoto R, Sadler WW, Adler HE, Stewart GF. Comparison of media and method for recovering *Salmonella typhimurium* from turkeys. Appl Microbiol. 1961; 9: 76-80.

Yuno MM, Terzolo HR, Fernandez HD, Malena RC, Altuna ME. Evaluation of selective culture media for the isolation of *Salmonella* from poultry. Rev Argent Microbiol. 1995; 27(2): 57-69.

Wagner JW. Untersuchungen zur Tenazität und zum Infiltrationsverhalten von Salmonellen und Güllekeimen in Standardböden und in verschiedenen Böden des Wasserschutzgebietes Donauried (Agrarwiss. Dissertation). Stuttgart: Univ. Hohenheim; 1993.

Waltman WD, Mallinson ET. Isolation of *Salmonella* from Poultry Tissue and Environmental Samples: A Nationwide Survey. Avian Diseases. 1995; 39: 45-54.

Waltman WD, Horne AM, Pirkle C, Dickson TG. Use of Delayed Secondary Enrichment for the Isolation of *Salmonella* in Poultry Environments. Avian Diseases. 1991; 35: 88-92.

Waltman WD. Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Hrsg.). *Salmonella in Domestic Animals*. Oxon: CABI Publishing; 2000: 355-372.

Ward A, Stensel HD, Ferguson JF, Ma G, Hummel S. Preventing growth of pathogens in pasteurised digester solids. *Water Environ Res.* 1999; 71 (2): 176-82.

Watanabe H, Kitamura T, Ochi S, Ozaki M. Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions. *Wat Sci Tech.* 1997; 36: 25-32.

Weber A. Über die Brauchbarkeit von Salmosyst[®] zur Anreicherung von Salmonellen aus Kotproben von Tieren. *Berl Münch tierärztl. Wochenschr.* 1988; 101: 57-59.

Wasiak K. Untersuchungen zum Einsatz von Kalk zur Bodendesinfektion mit ausgewählten Mikroorganismen. Dissertation in Vorbereitung. In Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit tierklinik der Universität Hohenheim. Stuttgart: 2004.

Weiland P. Übersicht über angewendete Anaerobverfahren zur biologischen Abfallbehandlung. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar. Biologische Abfallbehandlung-Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999, Universität Hohenheim. Stuttgart: 1999; 83-94.

Wekerle J, Leuze M, Koch K, Strauch D. Untersuchungen zum Verhalten von Viren bei der konventionellen und der 2- stufigen anaerob-mesophilen Klärschlammstabilisierung mit Vor- und Nachpasteurisierung. *Zbl Bakt Hyg.* 1987; B 184: 214-28.

Wellinger A, Egger A, Sutter K. Biogasproduktion- und Verbrauch. Biologische und verfahrenstechnische Grundlagen. Schriftenreihe der FAT 23. Tänikon; 1985: 100.

Wellinger A, Baserga W, Edelmann W, Egger K, Seiler B. Biogas Handbuch, Grundlage-Planung-Betrieb landwirtschaftlicher Biogasanlagen, 2. Aufgabe. Aarau: Witz-Verlag; 1991.

Werner U, Stöhr U, Hees N. Praktischer Leitfaden für Biogasanlagen in der Tierproduktion. Sonderpublikation der GTZ Nr. 180. TZ-Verlagsgesellschaft. 1983.

White PB. Further studies on the *Salmonella* group. Great Britain medical research special report no. 103, HMSO, London. 1926.

WHO. Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Report of a WHO expert committee, Technical report series 774, World Health Organisation, Geneva. 1988

Widmann R. Anaerobe Verfahren (Vergärung). In: Bidlingmaier W. (Hrsg.). Biologische Abfallverwertung. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co; 2000: 120-152.

Williams JE, Whittemore AD. Serological response of chickens to *Salmonella Thompson* and *Salmonella Pultorum* infections. J Clin Microbiol. 1979; 9:108-14.

Winter D. Virologische Untersuchungen zur Überprüfung von Gülle-Aufbereitungsverfahren und der erzeugten Gülle-Aufbereitungsprodukte unter den Aspekten der Veterinär- und Seuchenhygiene. Beuren-Stuttgart: Verlag Grauer; 2002.

Zee van der H, Veld JHJH in't. Methods for the Rapid Detection of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Hrsg.). *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing; 2000: 373-91.

Ziegert E. Vorkommen, Nachweis und Antibiotikaresistenz von *Yersinia enterocolitica* im Wasser. Gesundheit und Umwelt. 1988; 4: 32-59.

Zillig W, Stetter KO, Schafer W, Janekovic D, Wunderl S, Jolz J, Palm P. *Thermoproteales*: a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from Icelandic solfataras. Zentralbl Bakteriolog Hyg 1 Abt Orig C 2. 1981; 205-27

Fortsetzung der Tab. A 1

<i>Campylobacter jejuni</i>						
Entnahme	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Median
Nullprobe	4,30E+08	1,50E+07	9,30E+07	4,30E+07	4,30E+06	4,30E+07
50 °C	1,50E+08	4,30E+06	2,30E+07	2,30E+06	3,60E+05	4,30E+06

Tab. A 3: Einzelergebnisse der Tenazitätsversuche mit Keimträgern Typ 2 während der Hygienisierung (Angaben in log₁₀ KID₅₀/ml Keimträgereluat)

Felines Calicivirus							
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Median
	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz A	Ansatz B	
Nullprobe	6,00	6,00	4,75	4,75	5,00	5,00	5,00
50 °C	4,00	4,50	2,50	3,25	2,50	2,25	2,88
60 °C	0,25	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
70 °C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71,66 °C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71,70 °C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ECBO-Virus							
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Median
	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz A	Ansatz B	
Nullprobe	5,75	5,75	6,75	6,75	6,25	6,25	6,25
50 °C	5,25	5,00	6,50	6,00	6,00	5,50	5,75
60 °C	4,50	4,00	xx	2,50	2,75	3,00	3,00
70 °C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71,66 °C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71,70 °C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bovines-Parvovirus							
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Median
	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz A	Ansatz B	
Nullprobe	4,50	4,50	3,75	3,75	4,75	4,75	4,50
50 °C	4,50	4,25	4,25	4,25	4,75	4,75	4,38
60 °C	3,75	3,50	1,50	2,50	4,00	2,50	3,00
70 °C	2,50	2,50	0,00	1,50	2,25	1,75	2,00
71,66 °C	1,50	1,00	0,00	1,50	1,50	1,50	1,50
71,70 °C	1,50	1,00	0,00	1,50	1,00	1,50	1,25

0,00 = nicht nachweisbar

xx = verlorengangener Keimträger

Tab. A 4: Ergebnisse der Tenazitätsversuche im mesophilen Reaktor, Ebene oben
(Angaben in KBE/ml)

Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Salmonella Senftenberg</i> W775 / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	1,40E+09	1,40E+08	2,30E+08	2,30E+08	1,40E+09	1,40E+08
1	2,30E+08	9,30E+07	4,30E+07	9,30E+07	2,30E+08	4,30E+07
7	3,60E+01	2,30E+02	0,00E+00	3,60E+01	2,30E+02	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Salmonella Senftenberg</i> W775 / Tauchröhre 2					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	1,40E+09	1,40E+08	2,30E+08	2,30E+08	1,40E+09	1,40E+08
1	2,30E+08	2,30E+07	4,30E+07	4,30E+07	2,30E+08	2,30E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+08	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Salmonella Senftenberg</i> W775 / Tauchröhre 3					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	1,40E+09	1,40E+08	2,30E+08	2,30E+08	1,40E+09	1,40E+08
1	2,30E+08	9,30E+07	9,30E+07	9,30E+07	2,30E+08	9,30E+07
7	2,30E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

d: Tage

Tab. A 5: Ergebnisse der Tenazitätsversuche im mesophilen Reaktor, Ebene oben
(Angaben in KBE/ml)

Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Escherichia coli</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	3,60E+08	3,80E+07	2,40E+07	3,80E+07	3,60E+08	2,40E+07
1	2,30E+08	2,40E+07	9,30E+06	2,40E+07	2,30E+08	9,30E+06
7	4,60E+02	1,50E+06	0,00E+00	4,60E+02	1,50E+06	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Escherichia coli</i> / Tauchröhre 2					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	3,60E+08	3,80E+07	2,40E+07	3,80E+07	3,60E+08	2,40E+07
1	2,30E+08	2,40E+07	2,30E+07	2,40E+07	2,30E+08	2,30E+07
7	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Escherichia coli</i> / Tauchröhre 3					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	3,60E+08	3,80E+07	2,40E+07	3,80E+07	3,60E+08	2,40E+07
1	2,30E+08	2,40E+07	2,40E+07	2,40E+07	2,30E+08	2,40E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

d: Tage

Tab. A 6: Ergebnisse der Tenazitätsversuche im mesophilen Reaktor, Ebene oben
(Angaben in KBE/ml)

Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Enterococcus faecalis</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08
1	4,30E+08	1,50E+08	2,30E+08	2,30E+08	4,30E+08	1,50E+08
7	4,60E+06	1,50E+08	2,30E+07	2,30E+07	1,50E+08	4,60E+06
14	0,00E+00	1,50E+02	4,30E+04	1,50E+02	4,30E+04	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Enterococcus faecalis</i> / Tauchröhre 2					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08
1	4,30E+08	9,30E+07	2,30E+08	2,30E+08	4,30E+08	9,30E+07
7	1,50E+05	1,50E+08	4,30E+05	4,30E+05	1,50E+08	1,50E+05
14	3,60E+00	4,30E+02	2,30E+05	4,30E+02	2,30E+05	3,60E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Enterococcus faecalis</i> / Tauchröhre 3					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08
1	4,30E+08	2,30E+08	4,30E+07	2,30E+08	4,30E+08	4,30E+07
7	9,30E+06	1,50E+07	2,30E+07	1,50E+07	2,30E+07	9,30E+06
14	9,40E+00	9,20E+00	9,30E+03	9,40E+00	9,30E+03	9,20E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

d: Tage

Tab. A 7: Ergebnisse der Tenazitätsversuche im mesophilen Reaktor, Ebene unten
(Angaben in KBE/ml)

Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Salmonella Senftenberg W775</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	1,40E+09	1,40E+08	2,30E+08	2,30E+08	1,40E+09	1,40E+08
1	2,30E+08	4,30E+07	2,30E+07	4,30E+07	2,30E+08	2,30E+07
7	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Salmonella Senftenberg W775</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	1,40E+09	1,40E+08	2,30E+08	2,30E+08	1,40E+09	1,40E+08
1	2,30E+08	2,30E+07	4,30E+07	4,30E+07	2,30E+08	2,30E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Salmonella Senftenberg W775</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	1,40E+09	1,40E+08	2,30E+08	2,30E+08	1,40E+09	1,40E+08
1	2,30E+08	2,30E+07	2,30E+08	2,30E+08	2,30E+08	2,30E+07
7	9,20E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+01	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

d: Tage

Tab. A 8: Ergebnisse der Tenazitätsversuche im mesophilen Reaktor, Ebene unten
(Angaben in KBE/ml)

Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Escherichia coli</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	3,60E+08	3,80E+07	2,40E+07	3,80E+07	3,60E+08	2,40E+07
1	2,30E+08	2,40E+07	2,40E+07	2,40E+07	2,30E+08	2,40E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Escherichia coli</i> / Tauchröhre 2					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	3,60E+08	3,80E+07	2,40E+07	3,80E+07	3,60E+08	2,40E+07
1	2,30E+08	2,40E+07	2,30E+07	2,40E+07	2,30E+08	2,30E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Escherichia coli</i> / Tauchröhre 3					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	3,60E+08	3,80E+07	2,40E+07	3,80E+07	3,60E+08	2,40E+07
1	2,30E+08	2,40E+07	2,40E+07	2,40E+07	2,30E+08	2,40E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

d: Tage

Tab. A 9: Ergebnisse der Tenazitätsversuche im mesophilen Reaktor, Ebene unten
(Angaben in KBE/ml)

Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Enterococcus faecalis</i> / Tauchröhre 1					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08
1	4,30E+08	2,30E+07	2,30E+08	2,30E+08	4,30E+08	2,30E+07
7	3,80E+05	xx	2,30E+07	1,17E+07	2,30E+07	3,80E+05
14	0,00E+00	1,50E+02	2,30E+05	1,50E+02	2,30E+05	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Enterococcus faecalis</i> / Tauchröhre 2					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08
1	4,30E+08	2,30E+08	2,30E+08	2,30E+08	4,30E+08	2,30E+08
7	2,10E+06	1,50E+08	4,30E+05	2,10E+06	1,50E+08	4,30E+05
14	9,30E+02	0,00E+00	2,30E+05	9,30E+02	2,30E+05	0,00E+00
Aufenthaltszeit der Keimträger (d)	<i>Enterococcus faecalis</i> / Tauchröhre 3					
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Median	Maximum	Minimum
0	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08	4,30E+08	4,30E+08	3,60E+08
1	4,30E+08	2,30E+08	2,30E+08	2,30E+08	4,30E+08	2,30E+08
7	2,30E+06	4,30E+06	7,40E+04	2,30E+06	4,30E+06	7,40E+04
14	0,00E+00	9,20E+00	2,30E+04	9,20E+00	2,30E+04	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

d: Tage

xx: verlorengangener Keimträger

Anhang

Tab. A 10: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus der Vorgrube
(Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
15.08.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,40E+01
23.08.2002	3,30E+00	3,30E+00	0,00E+00	7,50E+05
30.08.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,80E+07
06.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+07
13.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,30E+06
20.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+06
26.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
02.10.2002	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	9,30E+04
08.10.2002	9,30E+02	4,30E+02	0,00E+00	2,40E+07
15.10.2002	9,20E+00	9,20E+00	0,00E+00	4,30E+06
23.10.2002	3,60E+00	3,60E+00	0,00E+00	4,60E+05
29.10.2002	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	9,30E+04
05.11.2002	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+03
14.11.2002	9,30E+00	4,30E+00	0,00E+00	2,40E+02
19.11.2002	3,00E+00	3,00E+00	0,00E+00	4,60E+06
26.11.2002	2,30E+03	2,30E+03	0,00E+00	4,60E+07
03.12.2002	4,30E+04	4,30E+04	0,00E+00	4,60E+07
10.12.2002	3,60E+04	3,60E+04	0,00E+00	2,30E+07
17.12.2002	1,50E+05	9,20E+04	0,00E+00	2,30E+07
23.12.2002	9,20E+04	9,20E+04	0,00E+00	4,60E+06
07.01.2003	1,50E+05	1,50E+05	0,00E+00	9,30E+05
14.01.2003	2,30E+06	2,30E+06	0,00E+00	2,30E+07
21.01.2003	3,60E+07	3,60E+07	0,00E+00	9,30E+05
28.01.2003	2,30E+08	2,30E+08	0,00E+00	2,30E+08
11.02.2003	2,30E+08	9,20E+07	0,00E+00	1,50E+08
Median	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	4,60E+06
Maximum	2,30E+08	2,30E+08	0,00E+00	2,30E+08
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,40E+01

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Tab. A 11: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus der Beschickungsgrube (Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
15.08.2002	7,20E+00	7,20E+00	0,00E+00	7,40E+01
23.08.2002	3,00E+00	3,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
30.08.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+01
06.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00
13.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
20.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+00
26.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
02.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+01
08.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
15.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+01
23.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
29.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
05.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14.11.2002	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
19.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
26.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
03.12.2002	3,60E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+00
10.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
17.12.2002	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
23.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,60E+00
07.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+00
21.01.2003	3,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,60E+00
28.01.2003	3,60E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00
11.02.2003	3,60E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00
Median	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Maximum	9,20E+00	7,20E+00	0,00E+00	9,30E+01
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Anhang

Tab. A 12: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus dem Reaktor 1 (Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
02.08.2002	1,50E+03	1,50E+03	0,00E+00	9,30E+01
23.08.2002	2,30E+02	2,30E+02	0,00E+00	1,50E+02
30.08.2002	4,60E+02	4,60E+02	0,00E+00	3,80E+03
06.09.2002	2,30E+03	2,30E+03	0,00E+00	2,30E+03
13.09.2002	9,20E+00	9,20E+00	0,00E+00	2,30E+02
20.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,40E+02
26.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+02
02.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,60E+02
08.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,70E+01
15.10.2002	9,20E+00	9,20E+00	0,00E+00	1,50E+02
23.10.2002	9,20E+00	9,20E+00	0,00E+00	3,60E+01
29.10.2002	9,20E+00	9,20E+00	0,00E+00	6,10E+00
05.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,10E+02
14.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,10E+01
19.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+02
26.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+03
03.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,90E+03
10.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+03
17.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+03
23.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,10E+04
07.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
14.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
21.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+05
28.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+05
11.02.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
Median	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+02
Maximun	2,30E+03	2,30E+03	0,00E+00	2,30E+05
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,10E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Tab. A 13: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus dem Reaktor 2 (Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
02.08.2002	1,50E+03	1,50E+03	0,00E+00	9,30E+01
23.08.2002	7,40E+01	2,30E+02	0,00E+00	2,70E+02
30.08.2002	2,40E+02	9,20E+00	0,00E+00	2,30E+03
06.09.2002	2,30E+02	9,20E+01	0,00E+00	2,10E+02
13.09.2002	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00
20.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+01
26.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,30E+01
02.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,40E+01
08.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,40E+00
15.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,40E+01
23.10.2002	3,60E+00	3,60E+00	0,00E+00	3,00E+00
29.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,40E+02
05.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+02
14.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,10E+01
19.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02
26.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+03
03.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+02
10.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+02
17.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+03
23.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,10E+04
07.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,10E+04
14.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
21.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+05
28.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
11.02.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
Median	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,70E+02
Maximun	1,50E+03	1,50E+03	0,00E+00	2,00E+05
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Anhang

Tab. A 14: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus dem Reaktor 3 (Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
02.08.2002	2,30E+02	2,30E+02	0,00E+00	1,50E+02
23.08.2002	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	7,40E+02
30.08.2002	1,40E+02	1,40E+02	0,00E+00	2,70E+03
06.09.2002	2,30E+01	9,20E+00	0,00E+00	2,30E+03
13.09.2002	3,60E+00	3,60E+00	0,00E+00	9,20E+01
20.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,30E+01
26.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,30E+01
02.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,30E+01
08.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+00
15.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,60E+01
23.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,20E+00
29.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+02
05.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,10E+02
14.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+02
19.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,10E+02
26.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+03
03.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+03
10.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+04
17.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+04
23.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
07.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
14.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
21.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
28.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
11.02.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
Median	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+02
Maximun	2,30E+02	2,30E+02	0,00E+00	1,50E+05
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Tab. A 15: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus dem Reaktor 4 (Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
02.08.2002	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	9,30E+01
23.08.2002	3,80E+02	3,80E+02	0,00E+00	3,60E+01
30.08.2002	1,40E+02	1,40E+02	0,00E+00	2,30E+02
06.09.2002	9,30E+01	9,30E+01	0,00E+00	3,60E+01
13.09.2002	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	2,10E+02
20.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+01
26.09.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,60E+02
02.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,60E+02
08.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,60E+02
15.10.2002	2,30E+00	2,30E+00	0,00E+00	9,40E+01
23.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,40E+01
29.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,40E+00
05.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,20E+00
14.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,10E+00
19.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,20E+00
26.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+01
03.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,30E+03
10.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,60E+03
17.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+03
23.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+03
07.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+04
14.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
21.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
28.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
11.02.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,30E+04
Median	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02
Maximun	3,80E+02	3,80E+02	0,00E+00	1,50E+05
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,10E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Tab. A 16: Ergebnisse der bakteriologischen Ergebnisse des Substrates aus dem Nachfermenter (Angaben in KBE/ml)

Tage der Probenahmen	GKF	FKF	Salmonellen	EK
26.09.2002	3,60E+01	3,60E+01	0,00E+00	0,00E+00
02.10.2002	2,30E+01	2,30E+01	0,00E+00	3,00E+00
08.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,40E+00
15.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
23.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+00
29.10.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,20E+00
05.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,10E+00
14.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+00
19.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,20E+00
26.11.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02
03.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02
10.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02
17.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,20E+02
23.12.2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+03
07.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+03
14.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+04
21.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,40E+04
28.01.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+04
11.02.2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+04
Median	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,30E+02
Maximum	3,60E+01	3,60E+01	0,00E+00	2,40E+04
Minimum	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

KBE: koloniebildende Einheiten

GKF: Gesamtcoliforme

FKF: Fäkalcoliforme

EK: Enterokokken

Tab. A 17: Ermittelte pH-Werte der Substratproben aus den untersuchten Bereichen der Biogasanlage

Vorgrube		Beschickungsgrube		Reaktor	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nachfermenter
Probenahme	pH	Probenahme	pH	Probenahme	pH	pH	pH	pH	pH
15.08.2002	3,42	15.08.2002	3,55	02.08.2002	7,45	7,51	7,55	7,49	nicht durchgeführt
23.08.2002	3,58	23.08.2002	3,61	23.08.2002	7,81	7,85	7,55	7,81	nicht durchgeführt
30.08.2002	3,58	30.08.2002	3,49	30.08.2002	7,82	7,56	7,82	7,81	nicht durchgeführt
06.09.2002	3,67	06.09.2002	3,62	06.09.2002	7,65	7,65	7,59	7,62	nicht durchgeführt
13.09.2002	3,57	13.09.2002	3,54	13.09.2002	7,81	7,81	7,68	7,63	nicht durchgeführt
20.09.2002	3,62	20.09.2002	3,57	20.09.2002	7,53	7,88	7,97	7,97	nicht durchgeführt
26.09.2002	3,57	26.09.2002	3,59	26.09.2002	6,88	7,82	7,83	7,55	7,81
02.10.2002	3,74	02.10.2002	3,81	02.10.2002	7,82	7,63	7,55	7,61	7,88
08.10.2002	3,83	08.10.2002	3,72	08.10.2002	7,17	6,55	6,51	7,18	7,91
15.10.2002	3,84	15.10.2002	3,82	15.10.2002	7,71	7,66	7,83	7,22	7,92
23.10.2002	3,72	23.10.2002	4,15	23.10.2002	7,99	8,05	7,62	7,92	8,01
29.10.2002	3,63	29.10.2002	4,12	29.10.2002	8,02	7,82	7,65	7,75	7,94
05.11.2002	3,52	05.11.2002	3,65	05.11.2002	7,84	8,22	7,63	8,16	7,71
14.11.2002	3,72	14.11.2002	3,59	14.11.2002	8,04	7,78	7,61	7,75	7,93
19.11.2002	3,78	19.11.2002	3,71	19.11.2002	7,84	7,66	7,78	8,16	7,78
26.11.2002	3,79	26.11.2002	3,77	26.11.2002	7,85	7,97	7,86	7,75	8,33
03.12.2002	3,95	03.12.2002	3,71	03.12.2002	7,59	7,79	7,58	7,88	7,93
10.12.2002	3,79	10.12.2002	3,75	10.12.2002	7,57	7,81	7,64	7,08	8,01
17.12.2002	3,84	17.12.2002	3,65	17.12.2002	7,56	7,79	7,62	7,86	7,92
23.12.2002	3,95	23.12.2002	3,72	23.12.2002	8,01	7,79	7,78	7,92	7,86
07.01.2003	3,83	07.01.2003	3,68	07.01.2003	7,69	7,73	7,95	7,85	7,95
14.01.2003	3,82	14.01.2003	3,76	14.01.2003	7,85	7,81	7,85	7,88	7,81
21.01.2003	3,81	21.01.2003	3,67	21.01.2003	7,59	7,88	7,62	7,81	7,85
28.01.2003	3,83	28.01.2003	3,85	28.01.2003	7,59	7,95	7,55	7,79	8,01
11.02.2003	3,81	11.02.2003	3,81	11.02.2003	7,41	8,05	7,78	7,81	7,95
Mittelwert	3,72	Mittelwert	3,72	Mittelwert	7,68	7,76	7,65	7,73	7,92
Maximum	3,95	Maximum	4,15	Maximum	8,04	8,22	7,97	8,16	8,33
Minimum	3,42	Minimum	3,49	Minimum	6,88	6,55	6,51	7,08	7,71

Tab.A 19: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Erdproben mit Hilfe Methode 1

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10 ¹	10 ²	10 ³
Erde	1	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	2	2,40E+02	2,40E+02	2,40E+02
	3	2,40E+02	2,40E+02	2,40E+02
	4	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	5	2,10E+01	2,40E+02	2,40E+02
	6	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	7	2,10E+01	2,40E+02	2,40E+02
	8	2,40E+02	2,40E+02	2,40E+02
	9	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	10	2,40E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Minimum	2,10E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Maximum	2,40E+02	2,40E+02	2,40E+02
	Mittelwert	9,70E+01	2,40E+02	2,40E+02
	SD	9,92E+01	n.d.	n.d.
	95%CI	6,15E+01	n.d.	n.d.

KBE: koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

n.d.: nicht durchgeführt

Tab.A 20: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Erdproben mit Hilfe Methode 2

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10^1	10^2	10^3
Erde	1	2,30E+01	4,30E+02	4,30E+03
	2	4,30E+01	9,30E+02	2,30E+03
	3	4,30E+01	4,30E+02	9,30E+03
	4	9,20E+00	9,30E+02	4,30E+03
	5	1,50E+01	2,30E+02	4,30E+03
	6	4,30E+01	4,30E+02	4,30E+03
	7	4,30E+01	2,30E+02	2,30E+03
	8	4,30E+01	4,30E+02	9,30E+03
	9	2,30E+01	4,30E+02	9,30E+03
	10	2,30E+01	9,30E+02	2,30E+03
	Minimum	9,20E+00	2,30E+02	2,30E+03
	Maximum	4,30E+01	9,30E+02	9,30E+03
	Mittelwert	3,08E+01	5,40E+02	5,20E+03
	SD	1,35E+01	2,81E+02	2,96E+03
	95%CI	1,50E+01	2,96E+02	3,09E+03

KBE: koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

Tab.A 21: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Erdproben mit Hilfe Methode 3

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10 ¹	10 ²	10 ³
Erde	1	5,00E+01	1,50E+02	3,30E+03
	2	1,00E+01	1,70E+02	3,50E+03
	3	7,00E+01	4,00E+01	1,80E+03
	4	4,00E+01	1,90E+02	3,00E+03
	5	2,00E+01	1,20E+02	2,30E+03
	6	8,00E+01	2,00E+02	3,20E+03
	7	3,00E+01	1,50E+02	2,50E+03
	8	2,00E+01	0,00E+00	2,60E+03
	9	4,00E+01	1,70E+02	3,70E+03
	10	3,00E+01	2,40E+02	1,10E+03
	Minimum	1,00E+01	0,00E+00	1,10E+03
	Maximum	8,00E+01	2,40E+02	3,70E+03
	Mittelwert	3,90E+01	1,43E+02	2,70E+03
	SD	2,23E+01	7,30E+01	8,11E+02
	95%CI	1,38E+01	4,53E+01	5,03E+02

KBE: koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

Tab.A 22: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Erdproben mit Hilfe Methode 4

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Nachweis von Salmonellen in 50 g Probe		
		Kontaminationsgrad		
		10 ¹ KBE/g	10 ² KBE/g	10 ³ KBE/g
Erde	1	0:19	0:19	0:19
	2	0:19	0:19	0:19
	3	0:19	0:19	0:19
	4	0:19	0:19	0:19
	5	0:19	0:19	0:19
	6	0:19	0:19	0:19
	7	0:19	0:19	0:19
	8	0:19	0:19	0:19
	9	0:19	0:19	0:19
	10	0:19	0:19	0:19

0:19: serologische Identifizierung mit 0-Faktorseren

Tab.A 23: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Gülleproben mit Hilfe Methode 1

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10^1	10^2	10^3
Gülle	1	1,10E+02	2,40E+02	2,40E+02
	2	9,30E+01	2,40E+02	2,40E+02
	3	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	4	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	5	9,30E+01	2,40E+02	2,40E+02
	6	2,40E+01	2,40E+02	2,40E+02
	7	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	8	9,30E+01	2,40E+02	2,40E+02
	9	9,30E+01	2,40E+02	2,40E+02
	10	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Minimum	2,40E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Maximum	1,10E+02	2,40E+02	2,40E+02
	Mittelwert	6,90E+01	2,40E+02	2,40E+02
	SD	3,00E+01	n.d.	n.d.
	95%CI	1,86E+01	n.d.	n.d.

KBE: koloniebildende Einheiten

n.d.: nicht durchgeführt

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

n.d.: nicht durchgeführt

Tab.A 24: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Gülleproben mit Hilfe Methode 2

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10^1	10^2	10^3
Gülle	1	2,30E+01	2,30E+02	4,30E+03
	2	2,30E+01	2,10E+02	7,50E+03
	3	1,50E+01	2,30E+02	2,30E+03
	4	4,30E+01	1,50E+02	2,30E+03
	5	2,30E+01	1,50E+02	4,30E+03
	6	9,30E+01	2,30E+02	4,30E+03
	7	1,50E+01	4,30E+02	4,30E+03
	8	1,50E+01	4,30E+02	4,30E+03
	9	2,30E+01	4,30E+02	4,30E+03
	10	4,30E+01	2,30E+02	2,30E+03
	Minimum	1,50E+01	1,50E+02	2,30E+03
	Maximum	9,30E+01	4,30E+02	7,50E+03
	Mittelwert	3,16E+01	2,72E+02	4,02E+03
	SD	2,39E+01	1,13E+02	1,54E+03
	95%CI	1,48E+01	7,02E+01	9,57E+02

KBE: Koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

Tab.A 25: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Gülleproben mit Hilfe Methode 3

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10 ¹	10 ²	10 ³
Gülle	1	2,00E+01	2,10E+02	2,90E+03
	2	2,00E+01	2,40E+02	4,70E+03
	3	2,00E+01	5,60E+02	5,00E+03
	4	1,00E+01	3,40E+02	4,90E+03
	5	1,00E+01	4,60E+02	5,70E+03
	6	2,00E+01	2,10E+02	3,50E+03
	7	1,00E+01	2,30E+02	2,10E+03
	8	0,00E+00	5,40E+02	4,80E+03
	9	1,00E+01	4,20E+02	3,80E+03
	10	3,00E+01	6,50E+02	3,50E+03
	Minimum	0,00E+00	2,10E+02	2,10E+03
	Maximum	3,00E+01	6,50E+02	5,70E+03
	Mittelwert	1,50E+01	3,86E+02	4,09E+03
	SD	8,50E+00	1,63E+02	1,11E+03
95%CI	5,27E+00	1,01E+02	6,89E+02	

KBE: koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

Tab.A 26: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Gülleproben mit Hilfe Methode 4

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Nachweis von Salmonellen in 50 g Probe		
		Kontaminationsgrad		
Erde		10 ¹ KBE/g	10 ² KBE/g	10 ³ KBE/g
	1	0:19	0:19	0:19
	2	0:19	0:19	0:19
	3	0:19	0:19	0:19
	4	0:19	0:19	0:19
	5	0:19	0:19	0:19
	6	0:19	0:19	0:19
	7	0:19	0:19	0:19
	8	0:19	0:19	0:19
	9	0:19	0:19	0:19
	10	0:19	0:19	0:19

0:19: serologische Identifizierung mit 0-Faktorseren

Tab.A 27: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Klärschlammproben mit Hilfe Methode 1

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10^1	10^2	10^3
Klärschlamm	1	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	2	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	3	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	4	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	5	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	6	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	7	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	8	2,40E+01	2,40E+02	2,40E+02
	9	9,30E+01	2,40E+02	2,40E+02
	10	4,60E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Minimum	2,40E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Maximum	9,30E+01	2,40E+02	2,40E+02
	Mittelwert	4,85E+01	2,40E+02	2,40E+02
	SD	1,71E+01	n.d.	n.d.
	95%CI	1,06E+01	n.d.	n.d.

KBE: koloniebildende Einheiten

n.d.: nicht durchgeführt

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

n.d.: nicht durchgeführt

Tab.A 28: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Klärschlammproben mit Hilfe Methode 2

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10^1	10^2	10^3
Klärschlamm	1	2,30E+01	4,60E+02	4,30E+02
	2	4,30E+01	2,10E+02	9,30E+03
	3	4,30E+01	1,60E+02	4,30E+03
	4	9,30E+01	4,60E+02	4,30E+03
	5	4,30E+01	2,10E+02	4,30E+03
	6	4,30E+01	4,60E+02	2,30E+03
	7	9,20E+00	4,60E+02	2,30E+03
	8	2,30E+01	2,40E+02	2,10E+03
	9	2,30E+01	2,40E+02	2,30E+03
	10	4,30E+01	9,30E+01	7,20E+02
	Minimum	9,20E+00	9,30E+01	4,30E+02
	Maximum	9,30E+01	4,60E+02	9,30E+03
	Mittelwert	3,86E+01	2,99E+02	3,24E+03
	SD	2,27E+01	1,45E+02	2,54E+03
	95%CI	1,41E+01	8,96E+01	1,58E+03

KBE: Koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

Tab.A 29: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Klärschlammproben mit Hilfe Methode 3

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Kontaminationsgrad-Angaben in KBE g/ml		
		10 ¹	10 ²	10 ³
Klärschlamm	1	1,00E+01	8,00E+01	7,00E+02
	2	1,00E+01	2,10E+02	1,00E+03
	3	1,00E+01	1,80E+02	1,00E+03
	4	2,00E+01	9,00E+01	5,00E+02
	5	1,00E+01	8,00E+01	1,20E+03
	6	1,00E+01	1,00E+02	2,00E+03
	7	1,00E+01	2,80E+02	8,00E+02
	8	1,00E+01	1,00E+02	5,00E+02
	9	2,00E+01	3,00E+01	1,70E+03
	10	4,00E+01	2,70E+02	1,70E+03
	Minimum	1,00E+01	3,00E+01	5,00E+02
	Maximum	4,00E+01	2,80E+02	2,00E+03
	Mittelwert	1,50E+01	1,42E+02	1,11E+03
	SD	9,72E+00	8,69E+01	5,30E+02
	95%CI	6,02E+00	5,39E+01	3,29E+02

KBE: koloniebildende Einheiten

SD: Standard Abweichung

95% CI: 95% Vertrauensintervall

Tab.A 30: Ermittelte Einzelergebnisse der Salmonellenuntersuchungen der Klärschlammproben mit Hilfe Methode 4

Untersuchtes Substrat	Probe Nr.	Nachweis von Salmonellen in 50 g Probe		
		Kontaminationsgrad		
		10 ¹ KBE/g	10 ² KBE/g	10 ³ KBE/g
Erde	1	0:19	0:19	0:19
	2	0:19	0:19	0:19
	3	0:19	0:19	0:19
	4	0:19	0:19	0:19
	5	0:19	0:19	0:19
	6	0:19	0:19	0:19
	7	0:19	0:19	0:19
	8	0:19	0:19	0:19
	9	0:19	0:19	0:19
	10	0:19	0:19	0:19

0:19: serologische Identifizierung mit 0-Faktorseren

Anhang

Tab.A 31: Einzelergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zwischen Makro- und Mikromethode zum Nachweis von *Escherichia coli* aus Bioabfall- und Klärschlammproben (Angaben in KBE/ml)

Probe Nr.	Untersuchtes Substrat			
	Bioabfall		Klärschlamm	
	Makromethode	Mikromethode	Makromethode	Mikromethode
1	9,30E+01	3,80E+02	2,30E+03	2,00E+02
2	4,30E+01	3,80E+02	4,30E+03	3,40E+02
3	9,30E+01	4,70E+02	1,50E+03	2,70E+02
4	9,20E+00	4,70E+02	4,30E+02	6,00E+02
5	9,30E+05	5,80E+03	1,50E+03	4,00E+02
6	4,30E+05	2,80E+02	9,30E+02	3,20E+02
7	4,30E+05	1,50E+04	1,50E+03	3,10E+02
8	2,30E+06	3,80E+04	4,30E+03	3,70E+02
9	4,30E+04	2,80E+04	4,30E+03	7,20E+02
10	1,50E+05	1,20E+04	2,30E+03	4,90E+02
11	2,30E+02	3,70E+01	9,30E+03	2,70E+02
12	2,30E+01	3,70E+01	4,30E+02	4,80E+02
13	9,20E+00	1,20E+02	7,50E+03	7,20E+02
14	2,30E+03	3,70E+02	1,50E+03	3,40E+02
15	2,10E+01	6,60E+01	9,30E+03	5,70E+02
16	9,30E+01	5,10E+01	2,30E+03	3,70E+02
17	2,30E+01	5,10E+01	2,30E+04	4,30E+02
18	9,30E+01	8,10E+02	4,30E+03	7,20E+02
19	9,30E+01	3,10E+02	6,40E+02	5,40E+02
20	9,30E+01	8,00E+02	1,50E+03	5,10E+02
21	2,30E+05	8,00E+03	7,50E+02	9,30E+02
22	9,30E+05	7,50E+04	3,80E+02	3,70E+02
23	9,30E+05	1,90E+05	2,30E+02	6,30E+02
24	4,30E+05	5,60E+04	2,30E+02	1,00E+03
25	2,30E+05	6,40E+04	9,30E+02	9,10E+02
26	9,30E+04	2,00E+04	1,20E+03	1,00E+03
27	9,30E+04	3,80E+04	4,30E+03	1,70E+03
28	4,30E+05	5,60E+05	4,30E+03	2,10E+03
29	9,30E+04	1,90E+04	4,30E+03	1,00E+03
30	4,30E+04	2,10E+04	7,50E+02	1,20E+03
Minimum	9,20E+00	3,70E+01	2,30E+02	2,00E+02
Maximum	2,30E+06	5,60E+05	2,30E+04	2,10E+03
Median	4,30E+04	3,31E+03	1,50E+03	5,25E+02

Anhang

Tab.A 32: Einzelergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zwischen Makro- und Mikromethode zum Nachweis von *Escherichia coli* aus Speiseabfälle- und Gülleproben (Angaben in KBE/ml)

Probe Nr.	Untersuchtes Substrat			
	Speiseabfälle		Gülle	
	Makromethode	Mikromethode	Makromethode	Mikromethode
1	2,30E+04	1,20E+03	4,30E+04	2,30E+04
2	2,30E+04	3,80E+03	9,30E+04	4,20E+04
3	2,30E+04	3,00E+03	4,30E+04	5,10E+04
4	2,10E+04	2,40E+03	4,30E+04	3,80E+04
5	4,30E+04	2,10E+03	2,30E+05	3,00E+04
6	9,20E+03	1,60E+03	4,30E+04	3,00E+04
7	1,50E+03	1,90E+03	1,50E+06	1,90E+04
8	2,30E+04	1,90E+03	4,30E+04	1,90E+04
9	9,20E+03	2,30E+03	4,30E+04	3,90E+04
10	2,30E+04	2,60E+03	4,30E+05	3,90E+04
11	9,20E+03	2,30E+03	2,30E+05	5,10E+04
12	2,30E+04	1,50E+03	9,20E+04	3,20E+04
13	4,30E+04	9,30E+02	1,50E+05	1,70E+04
14	9,20E+03	8,00E+02	9,30E+04	1,20E+04
15	9,20E+03	1,50E+03	1,50E+05	4,60E+04
16	2,30E+04	3,00E+03	9,30E+04	1,20E+04
17	4,30E+04	2,30E+03	9,30E+04	4,60E+04
18	4,30E+03	5,40E+03	1,50E+05	3,00E+04
19	2,10E+04	4,80E+03	2,30E+04	5,10E+04
20	4,30E+03	1,60E+04	4,30E+04	1,90E+04
21	2,30E+04	1,60E+04	2,30E+04	3,80E+04
22	2,30E+04	1,40E+04	3,80E+04	3,00E+04
23	2,00E+04	5,40E+03	4,30E+04	4,80E+04
24	2,10E+03	2,30E+03	3,80E+04	5,80E+04
25	3,50E+03	1,40E+04	2,30E+04	2,70E+04
26	3,40E+04	1,60E+03	2,30E+04	4,00E+04
27	9,30E+03	2,10E+03	1,50E+05	4,60E+04
28	2,30E+04	1,90E+03	2,30E+05	1,90E+04
29	9,30E+03	1,90E+03	4,30E+04	3,80E+04
30	2,30E+04	1,50E+03	3,80E+04	1,20E+04
Minimum	1,50E+03	8,00E+02	2,30E+04	1,20E+04
Maximum	4,30E+04	1,60E+04	1,50E+06	5,80E+04
Median	2,20E+04	2,30E+03	4,30E+04	3,50E+04

Herstellernachweis

- ¹ DSM 10062, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- ² DSM 20600, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- ³ DSM 498, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- ⁴ DSM 4688, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- ⁵ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ⁶ DSM 2570, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- ⁷ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ⁸ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ⁹ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ¹⁰ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07881.5000
- ¹¹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07882.0500
- ¹² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.06400.500
- ¹³ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.06498.5000
- ¹⁴ Sartorius, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 23007-25-N
- ¹⁵ Viton, Firma Karl Späh, D-72516 Scheer
- ¹⁶ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 10824
- ¹⁷ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 4039
- ¹⁸ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 11755
- ¹⁹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.12122.0001
- ²⁰ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.10455 mit 5 % Schafblut, Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. SR 0051C
- ²¹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.08597
- ²² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07228.0500
- ²³ Sigma Chemie GmbH, D-89522 Steinheim, Art. Nr. C-1389

- ²⁴ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07700.0500
- ²⁵ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.16434 07700
- ²⁶ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.16466.0001
- ²⁷ Sifin, D-13088 Berlin, Art. Nr. 407a/91
- ²⁸ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. CM 67
- ²⁹ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. SR 0204E
- ³⁰ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. SR 84
- ³¹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 2248
- ³² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.16275
- ³³ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. SR 0048C
- ³⁴ Sartorius, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 13806-46-ACN
- ³⁵ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.13300
- ³⁶ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.01590.0500
- ³⁷ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.05222.0500
- ³⁸ Boule Diagnostics AB, Huddinge, Sweden, Art. Nr. 10-5586-12
- ³⁹ Carl Roth, D-76185 Karlsruhe, Art. Nr. A119.1
- ⁴⁰ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ⁴¹ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ⁴² Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim
- ⁴³ Heraeus Sepatech, D-37520 Osterode am Harz
- ⁴⁴ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art Nr. 178905
- ⁴⁵ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. T 043-50
- ⁴⁶ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. SO-155
- ⁴⁷ pH-Wert (7,0), NaCl (80,00 g), KCl (2,00 g), KH₂PO₄ (2,00 g), Na₂HPO₄ x 12 H₂O (23,10 g), MgSO₄ x 7 H₂O (1,00 g), CaCl₂ x H₂O (1,32 g), Trypsin 1:250 (12,50 g, Difco, D-86156 Augsburg, Art. Nr. 0152-15-9), Versen-Titriplex III (12,50 g, Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.08418), Streptomycin Sulfat (0,50 g), Penicillin G (0,50 g), Aqua.dest. (add 1000,00 ml), pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt.

- ⁴⁸ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. A321-42
- ⁴⁹ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. A331-27
- ⁵⁰ Serva, D-Heidelberg, Art. Nr. 17-5182
- ⁵¹ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. A2612
- ⁵² pH-Wert (6), NaCl (8,00 g), KCl (0,20 g), H₂PO₄ (0,12 g), Na₂HPO₄ x 2 H₂O (0,91 g), Aqua.dest (ad 1000,00 ml), pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt.
- ⁵³ Sartorius, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 16514 E
- ⁵⁴ Cuno, D-Mainz, Art. Nr. 64058-01-1 MDS
- ⁵⁵ Sartorius, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 6980569
- ⁵⁶ Infiltec GmbH, D-67346 Speyer, Art. Nr. 19401
- ⁵⁷ pH-Wert (8,5), 4 % Fleischextrakt trocken granuliert (Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.03979.0500), 0,5M NaCl
- ⁵⁸ Juan Typ GR4-12, Jouan S.A. rue Bobby Sands, 44805 Saint-Herblain, France
- ⁵⁹ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art Nr. 149026
- ⁶⁰ DSM 10062, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- ⁶¹ Sigma Chemie GmbH, D-89522 Steinheim, Art. Nr. T-9410
- ⁶² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07709
- ⁶³ Difco, D-86156 Augsburg, Art. Nr. 1880-17
- ⁶⁴ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07500
- ⁶⁵ DADE Behring Vertriebs GmbH+Co, D-65835
Art. Nr. ORTM 10/11 (Polyvalent I)
Art. Nr. ORTM 10/11 (Polyvalent II)
Art. Nr. ORTM 10/11 (Polyvalent III)
Art. Nr. ORTM 15 (Omnivalent)
- ⁶⁶ Difco, D-86156 Augsburg, Art. Nr. 1880-17
- ⁶⁷ Sodium Chloride (8 g), Potassium chloride (0,2 g), Na₂HPO₄ (1,15 g), KH₂PO₄ (0,2 g), steriles destilliertes Wasser (1000 ml).
- ⁶⁸ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. CM 029
- ⁶⁹ Sigma Chemie GmbH, D-89522 Steinheim, Art. Nr. N-1628
- ⁷⁰ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 4760

⁷¹ Whatman International Ltd Maidstone England, Art. Nr. 1823047

⁷² Sigma Chemie GmbH, D-89522 Steinheim, Art. Nr. M 9130-25 MG

⁷³ BIOMÉRIEUX, D-69280 Marcy l'Etoile-France, Art. Nr. 20 100

⁷⁴ Sartorius, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 16510

⁷⁵ Multimed, Wicker GmbH, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art Nr. 294722727

⁷⁶ Sartorius, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 16831

⁷⁷ Multimed, Wicker GmbH, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art Nr. 260262200

⁷⁸ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.05450.

⁷⁹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.12588.0100

⁸⁰ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.09293.0100

⁸¹ BIO RAD, 92430 Marnes-la-Coquette-FRANCE, Art. Nr. 53782

⁸² BRAND GMBH + CO KG, 97861 Wertheim, Art. Nr. 703610

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Reinhard Böhm danke ich für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung sowie die gute Atmosphäre am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim.

Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Hensel und Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen danke ich für die Annahme der Arbeit und für die Vertretung am Fachbereich Tiermedizin der Universität Leipzig.

Herrn Dr. Werner Philipp danke ich für die fachkundige praktische, wissenschaftliche und vor allem freundschaftliche Unterstützung.

Meiner Kollegin Frau Dr. Renate Haumacher danke ich besonders für den beherzten Einsatz sowie für die kritischen und vor allem detaillierten fachlichen Ratschläge. Danke Dir, liebe Renate.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene danke ich an dieser Stelle für die fachkundige, technische und tatkräftige Mithilfe. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Frau Petra Veit, Frau Katja Ade-Kappelmann, Frau Dr. Rachel Marschang, Frau Dr. Ulrike Hahn sowie Frau Dr. Birgit Hunsinger.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine lieben Freunde Simone Dettling, Dr. Michael Würdinger, Michael Bohn, Dr. Guido Messling, Dr. Robert Ivišić, Christiane Hahn sowie Sebastian Wysocki mit deren Unterstützung und Engagement ich mein Promotionsvorhaben realisieren konnte. Und Dir liebe Simone, bin ich ganz besonders dankbar.