

## Untersuchungen praxisrelevanter thermischer Verfahren zur Bodendesinfektion am Beispiel ausgewählter Mikroorganismen

**Investigation on Practical Application of Thermal Methods for Disinfection of Selected  
Microorganism in Soil**

**FKZ: 02OE150**

**Projektnehmer:**

Universität Hohenheim  
Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik  
Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart  
Tel.: +49 711 459-22427  
Fax: +49 711 459-22431  
E-Mail: boehm@uni-hohenheim.de  
Internet: <http://www.uni-hohenheim.de>

**Autoren:**

Wasiak, Krzysztof; Philipp, Werner; Böhm, Reinhard

**Herausgeberin:**

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)  
53168 Bonn  
Tel.: +49 228 6845-3280 (Zentrale)  
Fax: +49 228 6845-2907  
E-Mail: [geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de](mailto:geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de)  
Internet: [www.bundesprogramm-oekolandbau.de](http://www.bundesprogramm-oekolandbau.de)

Finanziert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)

**UNIVERSITÄT HOHENHEIM  
INSTITUT FÜR UMWELT UND TIERHYGIENE SOWIE  
TIERMEDIZIN MIT TIERKLINIK  
FACHRICHTUNG UMWELT UND TIERHYGIENE**

Prof. Dr. Reinhard Böhm



**Schlussbericht  
zu  
Untersuchungen praxisrelevanter thermischer Verfahren  
zur Bodendesinfektion am Beispiel ausgewählter Mikroorganismen**

FKZ: 020E150  
Laufzeit/Berichtszeitraum 2002 - 2004

vorgelegt  
von

Tierarzt Krzysztof Wasiak  
Dr. Werner Philipp  
Prof. Dr. Reinhard Böhm

Juli 2004

## NHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
1.1	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	6
1.2	Darstellung des mit der Fragestellung verbundenen Entscheidungshilfe- /Beratungsbedarfs im BMVEL"	8
2	Literatur	9
2.1	Allgemeine Bodenkunde (Begriffsbestimmungen)	9
2.1.1	Anorganische Bodensubstanz	10
2.1.2	Organische Bodensubstanz	12
2.1.3	Organismen im Boden	12
2.1.4	Bodengefüge	12
2.1.5	Bodenwasser	12
2.1.6	Bodenluft	14
2.1.7	Bodentemperatur	14
2.2	Gesetzliche Grundlagen	17
2.2.1	Tierseuchengesetz (TSG)	17
2.2.2	Boden-Naturschutzgesetz (BNSchG)	18
2.2.3	Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG)	18
2.2.4	Wasserhaushaltsgesetz (WHG)	19
2.2.5	Pflanzenschutzgesetz (PflSchG)	20
2.3	Problematik der Kontamination des Bodens mit Mikroorganismen in Freilandhaltung	20
2.3.1	Vorkommen und Tenazität von Mikroorganismen im Boden und anderen Medien	21
2.4	<i>Enterobacteriaceae</i>	33
2.4.1	<i>Escherichia coli</i>	33
2.4.2	Fäkalstreptokokken	34
2.4.3	Salmonellen	35
2.5	<i>Bovines Parvovirus</i> (BPV)	38
2.6	<i>Ascaris suum</i>	39
2.7	Physikalische Methoden der Bodendesinfektion	40
2.7.1	Bodendämpfung	41
2.7.2	Bodenerhitzung mit Propangas	42
2.7.3	Bodenerhitzung mit Sonnenenergie unter Anwendung der Solarfolien	42
2.7.4	Bodenerhitzung mit Mikrowellen	43
3	Eigene Untersuchungen	44
3.1	Material und Methoden	44

3.1.1	Beschreibung der Laboranlage	44
3.1.2.	Beschreibung des „BVS-Gerätes	47
3.2	Bakteriologische Untersuchungen	51
3.2.1	Gesamtbakterienzahl bei 37 °C (GBZ)	51
3.2.2	<i>Escherichia coli</i>	51
3.2.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	52
3.2.4	<i>Salmonella Senftenberg</i>	53
3.2.4.1	Qualitative Bestimmung	53
3.2.4.2	Quantitative Bestimmung	53
3.3	Virologische Methoden	54
3.3.1	Zellkulturen	54
3.3.2	Virusvermehrung	55
3.3.3	Virusnachweis	57
3.4	Parasitologische Untersuchung	59
3.5	Versuche zur "Beimpfung des Bodens" (Einmischverfahren)	63
3.6	Versuche mit Keimträgern	63
3.7	Beschreibung der Anwendung von Mikroorganismen in „freier Suspension“	65
4	Durchgeführte Untersuchungen	66
4.1	Vorversuche	66
4.1.1	Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad	66
4.1.2	Wasserbadversuche mit autoklavierter und nicht autoklavierter Erde bei gleichen Trockensubstanzgehalten	66
4.1.3	Wasserbadversuche mit Erde bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten	66
4.1.4	Tenazitätsversuche bei Zimmertemperatur	67
4.1.5	Versuche zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren	67
4.2	Vorversuche zur thermischen Desinfektion von Boden	67
4.2.1	Versuche zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren	67
4.2.2	Versuche zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik	68
4.3	Großversuche	68
4.3.1	Mikrobiologische Untersuchungen während des Einsatzes des „BVS“- Systems mit dem Injektorbrenner zur Bodendesinfektion	68
4.3.2	Solarfolienversuche	68
4.3.3	Dämpfungsversuche	69
4.3.4	Kalkungsversuche	69
5.	Ergebnisse	73

5.1	Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad	73
5.1.1	Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 55 °C	73
5.1.2	Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 60 °C	73
5.1.3	Ergebnis der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 65 °C	74
5.1.4	Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 70 °C	75
5.2	Ergebnisse der Wasserbadversuche mit Erde	75
5.2.1	Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad mit autoklavierter und nicht autoklavierter Erde	75
5.2.2	Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad in Schottflaschen mit Erde bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten	76
5.2.3	Ergebnisse der Versuche zur Tenazität von Bakterien auf Keimträgern im Wasserbad	77
5.3	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren	81
5.3.1	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 06.06.2002	81
5.3.2	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 19.06.2002	84
5.4	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden	86
5.4.1	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren	86
5.4.1.1	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 27.07.2002	86
5.4.1.2	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 18.10.2002	89
5.4.2	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik	92
5.4.2.1	Ergebnis zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik des Versuches vom 25.11.2002	92
5.4.2.2	Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik des Versuches vom 12.12.2002	96
5.5	Ergebnisse zu mikrobiologischen Untersuchungen während der Bodenerhitzung in Großversuchen	101

5.5.1	Ergebnisse zu mikrobiologischen Untersuchungen während des Einsatzes des Injektorbrenners (BVS-System)	101
5.5.1.1	Ergebnisse zum 1. Versuch mit dem Injektorbrenner	101
5.5.1.2	Ergebnisse zum 2. Versuch mit dem Injektorbrenner	104
5.5.1.3	Ergebnisse zum 3. Versuch mit dem Injektorbrenner	108
5.5.1.4	Ergebnisse zum 4. Versuch mit dem Injektorbrenner	112
5.5.2	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen während des Einsatzes der Solarfolien	117
5.5.2.1	Ergebnisse zum Versuch 1 mit Solarfolien	117
5.5.2.2	Ergebnisse zum Versuch 2 mit Solarfolien	121
5.5.2.3	Ergebnisse zum Versuch 3 mit Solarfolien	125
5.5.3	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen während des Einsatzes eines Dämpfungsgerätes	127
5.5.4	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen bei der Kalkanwendung	131
6	Diskussion	135
6.1	Diskussion der Ergebnisse der Vorversuche	136
6.1.1	Diskussion der Ergebnisse der Wasserbadversuche	136
6.1.2	Diskussion der Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand und Boden	139
6.1.3	Diskussion der Ergebnisse zur thermischen Desinfektion mit dem Einmischverfahren	142
6.1.4	Diskussion der Ergebnisse zur thermischen Desinfektion mit der Keimträgertechnik	143
6.2	Diskussion der Ergebnisse der Großversuche (s. Pkt. 4.3)	143
6.2.1	Diskussion der Ergebnisse beim Einsatz des Injektorbrenners („BVS-System“)	143
6.2.2	Diskussion der Ergebnisse der Versuche mit Solarfolien	150
6.2.3	Diskussion der Ergebnisse der Dämpfung	156
6.2.4	Diskussion der Ergebnisse bei der Kalkung	157
6.2.5	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau	160
6.2.6	Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse, insbesondere Ableitung von Vorschlägen für Maßnahmen, die durch BMVEL weiter verwendet werden können	160
7	Zusammenfassung	161
8	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen	164
9	Literatur	165
	ANHANG	

## 1 Einleitung

Die Tierhaltung im Freiland hat zur Folge, dass sich Krankheitserreger in den oberen Bodenschichten anreichern können. Liegt ein Tierseuchenfall vor, muss der Boden grundsätzlich desinfiziert werden. Bisher sind keine umweltfreundlichen und praktikablen Verfahren zur Bodendesinfektion mit dem Ziel der Eliminierung von Krankheitserregern für Mensch und Tier bekannt. Erfahrungswerte liegen allerdings hinsichtlich der Bekämpfung von Erregern für Pflanzenkrankheiten mit thermischen Verfahren vor.

Um Erkenntnisse zur Desinfektion von menschen- und tierpathogenen Erregern zu erhalten, wurden zunächst Vorversuche zur exakten quantitativen Einmischung ausgewählter Bakterienarten in Sand und Boden im Maßstab durchgeführt. In einer halbtechnischen Anlage zur thermischen Bodendesinfektion (Injektorbrenner) wurden damit erste Erkenntnisse zur thermischen Einwirkung im Boden auf die Tenazität unterschiedlicher Mikroorganismen gewonnen. In Großversuchen schlossen sich Untersuchungen zur thermischen Bodendesinfektion mit der sog. "Haubendämpfung" und einem Injektorbrenner („BVS“-System) in Freilandversuchen an. Dabei wurden unterschiedliche Böden bei verschiedenen Wassergehalten berücksichtigt.

Sporadisch wurde zusätzlich der Einfluss der Sonneneinstrahlung auf die Tenazität von unter einer Solarfolie im Boden lokalisierten Mikroorganismen untersucht. Die Großversuche wurden durch den Einsatz von Kalk zur „Bodendesinfektion“ abgerundet.

Bei den Versuchen zur Desinfektion der Böden wurden diese artifiziell mit unterschiedlichen Erregern kontaminiert. Dazu wurden Salmonellen, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* sowie Parvoviren und Eier des Schweinespulwurm angewandt.

### 1.1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen lag in der Erarbeitung von Daten zum Einsatz alternativen bzw. praxisgerechten, wirtschaftlichen und umweltfreundlichen Bodenbehandlungsmaßnahmen zum Zwecke der möglichen Reduzierung bzw. Eliminierung pathogener Mikroorganismen und Viren auf und im Boden. Die in den zurückliegenden Jahren durch Aufstockungsmaßnahmen vermehrte Umstellung auf alternative Haltungsformen für Legehennen und die Zunahme der Freilandhaltung von Schweinen bringt auch Nachteile mit sich. Eine zunehmende Konzentrierung von Tieren auf unbefestigten, gewachsenen Bodenflächen kann zu einer Zunahme an für das Tier pathogenen Mikroorganismen und damit erhöhten Infektionsdruck für den gesamten Tierbestand führen. Andererseits muss im

Tierseuchenfall für die Freilandhaltung eine effiziente, umweltschonende Methode zur Desinfektion kontaminierter, unbefestigter Auslaufflächen zur Verfügung stehen. Denn der Einsatz von Chemikalien als klassische Desinfektionsmittel zur Bodendesinfektion kann im Sinne einer ökologischen Bodenbewirtschaftung und alternativen Tierhaltung nicht zielführend sein und muss daher äußerst kritisch betrachtet bzw. bewertet werden. Letztendlich sollten die erarbeiteten Ergebnisse und Erkenntnisse dazu dienen, sie in die Empfehlungen des BMVEL zur Desinfektion bei Anzeigepflichtigen Tierseuchen aufnehmen zu können. Die unteren Verwaltungsbehörden (Landratsämter/Veterinärämter) als Überwachungsbehörden brauchen dringend Informationen um im Tierseuchenfall (z. B. Schweinepest bei Auslaufschweinen, Geflügelpest bei Freilandhühnern) rasch, eng und streng und damit effizient handeln zu können. Die Schließung der wichtigen Lücke in der Vorbeuge und Bekämpfung von Tierseuchen bei der Freilandhaltung von landwirtschaftlichen Nutztieren durch eine umweltfreundliche, wirkungsvollen Methode war daher das eigentliche Hauptziel der durchgeführten Untersuchungen.

Die Aufgabenstellung des Projektes um das angestrebte Ziel zu erreichen, lag zunächst in der Erarbeitung von Daten zur Ermittlung der Tenazität ausgewählter Mikroorganismen bei der Erwärmung von Boden und Sand im Wasserbad vergleichend mit einem sog. „Injektorbrenner“ in einer halbtechnischen Versuchsanlage. Bei diesen Erhitzungsversuchen wurde in aller Regel das Verhalten von *Enterobacteriaceen*, *E. coli*, Enterokokken, Salmonellen und Parasitendauerstadien (*Ascaris suum*) sowie Bovines Parvo-Virus (BPV) untersucht. Sie sollten erste Hinweise zum Überlebensverhalten der ausgewählten Mikroorganismen in Böden durch externe Wärmeeinwirkung geben. Die technische Umsetzung des Injektorbrenners als halbtechnische Anlage zum Einsatz für den praktischen Betrieb wurde in Form eines schleppergezogenen Injektorbrenners als sog. „thermisches Bodenverbesserungs und -sanierungssystem BVS“ realisiert. Neben der eigentlichen Hauptaufgabe der Reduzierung bzw. Inaktivierung ausgewählter Mikroorganismen und pathogenen Erregern im Boden stand weiterhin die Ermittlung des Einsatzes dieses Großgerätes bei unterschiedlichen bodenphysikalischen Bedingungen (erhöhte Feuchtigkeit des Bodens, hoher Steingehalt, Bodenfrost) im Vordergrund. Im Hinblick der vielfach flächenmäßig klein ausgelegten Auslaufhaltung von Freilandhühnern war ein weiterer wichtiger Aspekt die Manövrierfähigkeit des „BVS-System“ beim praktischen Einsatz zu beurteilen um bei einer möglichen erfolgreichen Bodendesinfektion den Einsatz des Gerätes unter den vielfältigsten in der landwirtschaftlichen Praxis vorzufindenden Bedingungen uneingeschränkt empfehlen zu können.

Vergleichbare Fragestellungen mussten bei der Untersuchung bzw. des Einsatzes einer „Haubendämpfung“ beantwortet werden.

Mit der Erkenntnis des problematischen Einsatzes sowohl des „BVS-Systems“ als auch der Haubendämpfung beim Vorliegen von nassen und/oder gefrorenen Böden wurden weitere alternative Möglichkeiten zur „Bodendesinfektion“ unter praktischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde sporadisch der Einfluss der Sonneneinstrahlung auf die Tenazität von unter Solarfolien artifiziell auf Versuchsflächen ausgebrachten Mikroorganismen untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse, obwohl in den Sommermonaten bei günstigen äußeren Bedingungen und hoher Strahlungsintensität der Sonne, waren die erzielten Ergebnisse uneinheitlich und nicht zufriedenstellend.

Eine spezielle Bodenbehandlung mit Kalkhydrat (oberflächliches geringes Einarbeiten des Kalkes von ca. 5 cm; nach erfolgter Desinfektionswirkung Umfräsen des Bodens bis zu 15 cm Bodentiefe mit dem Effekt der „Realkalisierung“ des Bodens) sollten die bis zu diesem Zeitpunkt in Erfahrung gebrachten Nachteile des „BVS-Systems“ und der Haubendämpfung kompensieren. Die Versuche des Kalkeinsatzes konnten nur im Ansatz und nur auf einer Versuchsfläche bei relativ trockenen Bodenbedingungen durchgeführt werden. Hier sollten weitere Erkenntnisse erarbeitet werden

## 1.2 Darstellung des mit der Fragestellung verbundenen Entscheidungshilfe-/Beratungsbedarfs im BMVEL"

Bisher liegen dem BMVEL keine aus der Praxis erhobenen Daten zum Einsatz alternativer bzw. praxisgerechter, wirtschaftlicher und umweltfreundlicher Bodenbehandlungsmaßnahmen zum Zwecke der Eliminierung pathogener Mikroorganismen und Viren auf und im Boden vor. Besonders bei der Freilandhaltung von Hühnern und Schweinen muss auf unbefestigten, bewachsenen Bodenflächen bei zunehmender Beweidungsdauer mit einer Konzentrierung an unerwünschten Mikroorganismen und Krankheitserregern gerechnet werden. Durch diesen erhöhten „Infektionsdruck“ des Tierbestandes kann es zu Leistungsdepressionen kommen, die in vielen Fällen eine wirtschaftliche, alternative Tierhaltungsform in Frage stellen können. Daher braucht die ökologische Tierhaltung im Rahmen präventiver Tiergesundheitskonzepte und Hygienemanagementsystemen u.a. ein praktikables Instrumentarium zur Minderung bzw. Verhinderung der Anreicherung unerwünschter Erreger bzw. bakterieller und viraler Krankheitserreger im Boden.

Im Zusammenhang der Bekämpfung von „Anzeigepflichtigen Tierseuchen“ in der konventionellen Tierhaltung ist der Einsatz von Chemikalien (chemische Desinfektionsmitteln)

zur Desinfektion des Stalles, deren Einrichtungen und der Gülle sowie des Festmistes das Mittel der Wahl. Ein Einsatz von Chemikalien zur Desinfektion des Bodens bei der Freilandhaltung (z.B. Formalin, Peressigsäure oder Natronlauge) scheidet neben den hohen Kosten vor allem wegen seiner Umwelttoxizität von vornherein aus. Dem BMVEL als oberste Fachaufsichtsbehörde sollen damit Empfehlungen für eine wirkungsvolle Bodendesinfektion zur Verfügung gestellt werden, damit vor allem die unteren Verwaltungsbehörden (Landratsämter/Veterinärämter) als Überwachungsbehörden im Tierseuchenfall (z. B. Schweinepest bei Auslaufschweinen, Geflügelpest bei Freilandhühnern) eindeutige Handlungsanweisungen geben können.

## 2 Literatur

### 2.1 Allgemeine Bodenkunde (Begriffsbestimmungen)

"Boden ist das mit Wasser, Luft und Lebewesen durchsetzte, unter dem Einfluss der Umweltfaktoren an der Erdoberfläche entstandene und im Ablauf der Zeit sich weiterentwickelnde Umwandlungsprodukt mineralischer und organischer Substanzen mit eigener morphologischer Organisation, das in der Lage ist, höheren Pflanzen als Standort zu dienen und die Lebensgrundlage für Tiere und Menschen bildet. Als Raum-Zeit-Struktur ist der Boden ein vierdimensionales System" (SCHROEDER, 1992).

Böden stellen die belebte oberste Erdkruste des Festlandes dar. Sie bestehen aus Mineralien unterschiedlichen Art und Größe sowie aus organischen Stoffen, dem Humus. Minerale und Humus sind in bestimmter Weise im Raum eingeordnet, bilden miteinander das Bodengefüge mit einem bestimmten Hohlraumsystem. Dieses besteht aus Poren unterschiedlicher Größe und Form, die mit der Bodenlösung, d.h. Wasser mit gelösten Stoffen und der Bodenluft gefüllt sind. Böden weisen charakteristische Horizonte auf. Böden sind Naturkörper unterschiedlichen Alters, die je nach Art des Ausgangsgesteins und Reliefs unter einem bestimmten Klima und damit einer bestimmten streuliefernden Vegetation mit charakteristischen Lebensgemeinschaften (Biozönosen) durch bodenbildende Prozesse entstanden sind (SCHEFFER et al., 2000). Boden selbst wird als eigener Naturkörper im Durchdringungsbereich zwischen Atmosphäre, Hydrosphäre, Biosphäre und Lithosphäre im weiteren Sinne verstanden." (KUNTZE et al., 1994).

Böden haben sich in einem historischen Entwicklungsvorgang, das heißt in Jahrhunderten bis Jahrtausenden, im Spannungsfeld der am jeweiligen Standort wirkenden geologischen, klimatischen und biotischen Faktoren gebildet. Dazu zählen die Art des Ausgangsgesteins, das Relief und die Exposition, die Strahlung und der Wasserhaushalt ebenso wie Pflanzen-, Tier- und

Mikroorganismengesellschaften. Auch der Mensch ist weltweit zu einem entscheidenden bodenbildenden Faktor geworden" (BEESE, 1997).

### 2.1.1. Anorganische Bodensubstanz

Das Material, aus dem der feste Teil der Erdoberfläche besteht, liegt gewöhnlich nicht als Kontinuum vor sondern ist körnig. Die Art der Körner und ihre relative Größenverteilung beeinflussen die Lagerungsverhältnisse und damit auch Größen und Formen der Kornzwischenräume. Von letzteren hängt wiederum das Verhalten von Wasser, Luft und den mit diesen transportierten Stoffen in Boden ab. Schließlich ist die Korngrößenverteilung diejenige Eigenschaft, die sich im Boden als beständiges Merkmal erweist. Dies gilt vor allem für die mineralische Komponente, und deshalb bleibt die organische bei der Bestimmung der Körnung in der Regel unberücksichtigt. Das Ergebnis aller Belastungsvorgänge beeinflusst das Verhalten von Wasser und Luft mit ihren Inhaltsstoffen im Porenraum. Wasser- und Lufthaushalt sind ihrerseits teilweise von der Körnung, teilweise von der Lagerung und darüber hinaus von Umgebungsbedingungen abhängig. Denn das Angebot von Wasser kann hinsichtlich der Frequenz und Amplitude wechseln und damit das Angebot der Luft und deren Zusammensetzung im Boden beeinflussen. In Bewegung befindliches Wasser ist das weitaus wirksamste Transportmittel für Materie innerhalb des Bodenkörpers (HARTGE et al., 1999).

Die Einzelteilchen, aus denen die feste Phase des Bodens besteht, sind hinsichtlich ihrer Größen, Formen und Mischungen sehr unterschiedlich ausgebildet. Die auftretenden Unterschiede sind jedoch nicht willkürlich verteilt, sondern lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten ordnen, so dass Gesetzmäßigkeiten erkennbar werden (HARTGE et al., 1999). Die Größen der in Böden vorkommenden Körner variiert innerhalb eines sehr weiten Bereichs. Die Verteilungen sind sowohl nach der Seite der Blöcke als auch nach der Seite der feinsten Teilchen von kolloidaler Größe hin offen. Diese weite Spanne wird in Fraktionen unterteilt, die Kies, Sand, Schluff und Ton genannt werden. Neben diesen in der heutigen deutschen Bodenkunde gebräuchlichen existieren noch eine Anzahl anderer Bezeichnungen, die aber meist einen Bezug zu einer Form oder einer genetisch bedingten Bildungsweise haben, wie z.B. die Bezeichnungen Grus, Mehlsand oder Staubsand. Auch die Wahl der Grenzen für die genannten Fraktionen wird unterschiedlich gehandhabt. Die meisten Variationen treten dabei innerhalb der Fraktionen Sand und Schluff auf. Die obere Korngrößengrenze des Sandes liegt weitgehend einheitlich bei 2 mm. Die obere Teilchengröße der Tonfraktion liegt auch noch überwiegend einheitlich bei 0,002 (2  $\mu\text{m}$ ), jedoch tauchen hier schon Abweichungen auf. Es ist

deshalb oft notwendig, die Grenzen einer Korngrößenbezeichnung direkt als Zahlwerte anzugeben. In Deutschland ist seit etwa 1955 (HARTGE et al., 1999; BENZLER, J.H., 1986) die in Tabelle 1 angegebene Einteilung der Kontraktionen üblich. Sie ist in der DIN 4220 (1987) verankert und geht auf das von ATTENBERG (1908) logarithmische System zurück, bei dem ursprünglich nur die Ziffer 2 als Klassengrenze angenommen wurde. Jeweils in der Mitte der so entstandenen Klassen wurde später eine weitere Unterteilung installiert, die wegen der geometrischen Einteilung auf die Ziffernfolge 63 fällt. Bei der Wahl der Zahlenwerte für die Fraktionsgrenzen orientierte sich ATTENBERG (1908) für die Sandfraktionsobergrenze an der Korngröße, oberhalb derer die Körnung unter Freilandbedingungen keinen wesentlichen Einfluss mehr auf die Wasserbewegung hat. Die Obergrenze der Tonfraktion wurde von ihm dort eingesetzt, wo Bakterien nicht mehr zwischen dichtgelagerten Körnern einzudringen vermögen.

Tabelle 1: In Deutschland gebräuchliche Einteilung und Bezeichnung der Körnungsklassen sowie der verbreitesten Methoden zur Korngrößenbestimmung (f = fein, m = mittel, g = grob)

Größenklasse	Ton (T)			Schluff (U)			Sand (S)			Kies (K)			Steine (St)	Blöcke (Bl)			
	f	M	G	f	m	g	f	M	g	f	m	g					
Äquivalent-	0,2	0,6	2,0	6,3	20	63	200	630	2000				$6,3 \times 10^4$	$2 \times 10^5$	(in $\mu\text{m}$ )		
Durchmesser				$2 \times 10^{-3}$				$6,3 \times 10^{-2}$				2	6,3	20	63	200	(in mm)

Die Korngrößenverteilung ist das am weitesten bekannte und verwendete Charakteristikum des Bodens. Es wird daher stets in die erste Ansprache miteingeschlossen und gehört in der Regel zu den ersten Informationen, die für die jegliche Arbeit mit oder an Boden erhältlich sind. Dies ist zum Teil eine Folge davon, dass eine Reihe von Bodeneigenschaften und Bodenmerkmalen eng mit der Körnung korrelieren. Es hat seinerseits aber zu Folge, dass diese Zusammenhänge wegen der relativ leichten Zugänglichkeit von Aussagen über Körnung besonders interessant sind. Besonders auffallend und daher bekannt sind die Zusammenhänge zwischen Korngrößenverteilung und dem Wasserhaushalt (HARTGE et al., 1999).

### 2.1.2 Organische Bodensubstanz

Das gesamte im Boden enthaltene tote organische Material wird als Humus (lateinisch: "Erdboden") bezeichnet. Nach SCHRÖDER (1999) ist der Humus eine Gesamtheit der abgestorbenen organischen Bodensubstanz. Die Produktion organischer Ausgangsstoffe, ihr Entzug, Umwandlung durch Verwesung, Mineralisierung und Humifizierung bestimmen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren den Humusspiegel eines Bodens (KUNTZE et al., 1994). Zur organischen Substanz der Böden gehören alle in und auf dem Mineralboden befindlichen abgestorbenen pflanzlichen und tierischen Stoffe und deren organischen Umwandlungsprodukten. Die pflanzliche Streu bildet das Ausgangsmaterial stabiler organischer Substanz im Boden. Gelangen Pflanzreste auf oder in den Boden, so erfolgt zunächst eine schnelle Mineralisierung zunehmend verlangsamt. Der Humusgehalt der Böden kann sowohl direkt durch Zufuhr organischer Stoffe als auch indirekt durch anorganischer Dünger beeinflusst werden. In Deutschland angewandete Stahlmistdüngung erhöht den Humusgehalt der Böden im Vergleich zu den Böden bei ausschließender Mineralisierung (SCHEFFER et al., 2000).

### 2.1.3 Organismen im Boden

Die freilebende Komponente des Bodens stellen Bakterien, Pilze, Algi und Fauna dar (PAUL et al., 1989).

### 2.1.4 Bodengefüge

Minerale und Humus sind in bestimmter Weise im Raum angeordnet, bilden miteinander das Bodengefüge mit einem bestimmten Hohlraumsystem. Dieses besteht aus Poren unterschiedlicher Größe und Form, die mit der Bodenlösung, d.h. Wasser mit gelösten Stoffen und der Bodenluft gefüllt sind (SCHEFFER et al., 2002).

### 2.1.5 Bodenwasser

Als Bodenwasser bezeichnet man den Wasseranteil des Bodens, der durch Trocknung bei 105°C entfernt werden kann (WAGNER, 1993).

Die Wasserleitfähigkeit des Bodens ist eine Materialeigenschaft, die allerdings nicht immer vollständig gleichmäßig ist, weil die Struktur des Bodens und damit der Verlauf der Fließpassagen veränderlich ist. In einem starren, porösen Körper hat die Wasserleitfähigkeit die

Eigenschaft einer Materialkonstanten. Im Boden ändert sich aber die Wasserleitfähigkeit infolge der Auswirkungen des Strömungsdrucks, die ein Wasserdruckgefälle auf die festen Bodenteilchen ausübt. Ein weiterer Grund ist die Tatsache, dass der Quellungszustand im Boden oft nicht im Gleichgewicht mit dem Wassergehalt steht und sich daher bei langanhaltendem hohem Wasserangebot ändert. Dies gilt vor allem, wenn der Salzgehalt des perkolierenden Wassers nicht mit der Zusammensetzung der austauschbaren Kationen und der Dicke der elektrischen Doppelschicht im Gleichgewicht steht. Der Umstand, dass die Struktur des Bodens bzw. die Stabilität ein wesentlicher Faktor für die Wasserleitfähigkeit ist, zeigt sich auch darin, dass das Ausmaß der Veränderung der Wasserleitfähigkeit als Maß für die Strukturstabilität verwendet werden kann. Da die Ausprägung der Bodenstruktur oft stärker variiert als die Textur, verändert sich die Wasserleitfähigkeit im Boden mit ausgeprägtem Sekundärporensystem stärker als im solchem mit vorherrschenden Primärporen. Sie variiert aus dem gleichen Grund auch von Bodenhorizont zu Bodenhorizont sehr stark. Die Art der Bodenstruktur – vor allem die Ausprägung der Sekundärporen – ist also entscheidend, dass ein aggregierter Ton-, Lehm- oder Schluffboden durchaus die Wasserleitfähigkeit eines Grobsandes erreichen kann. Verkleinerungen des Porenvolumens wirken sich vor allem durch ihren Einfluss auf die Wassergehaltsverteilungen aus, denn die feste Phase selbst enthält stets Diffusionspassagen, weil sie körnig ist (HARTGE et al., 1999). Durch die Adsorption gibt das Wasser einen Teil seiner Bewegungsenergie ab, und zwar um so mehr, je dichter es an die Oberflächen der festen Partikel herangetreten kann. Die freiwerdende Energie kann man als Wärme messen (Benetzungswärme). Der Betrag kann bei einem ofentrockenen (105°C) Ton oder feinem Torf so groß sein, dass man die Erwärmung als Folge des Eingießens weniger Wassertropfen mit einem gewöhnlichen Quecksilberthermometer feststellen kann. Diese Benetzungswärme wird fast ausschließlich durch den Vorgang der Hydratation frei. Die Adsorption hat aber noch weitere Folgen für das Wasser. Weil die einzelnen Moleküle in ihrer Bewegungsfreiheit gehemmt sind, können sie nicht in dem gleichen Maße weitere Energie aufnehmen wie freie Wassermoleküle. Dies wirkt sich in einer Verminderung der Wärmekapazität des adsorbierten gegenüber des freien Wassers aus. Gleiches gilt für den Gefriervorgang. Auch hier ist das Wasser um so stärker behindert, die molekulare Konfiguration des Eises anzunehmen, je stärker es adsorbiert, d.h. je näher es an der festen Grenzfläche ist. Dies wirkt sich nach außen hin als Herabsetzung des Gefrierpunkts aus. Bezieht man dieses Verhalten auf die Körnung eines Bodens, so kann man sagen, dass ein Boden bei gleichem Wassergehalt bei um so tieferer Temperatur gefriert, je feinkörniger er ist (HARTGE et al., 1999). Wenn ein trockener Boden mit Wasser in Berührung kommt, so fließt es manchmal mehr oder weniger schnell auseinander, es spreitet. Es kann jedoch auch vorkommen, dass es

längere Zeit in Form von Tropfen auf der Bodenoberfläche liegen bleibt. Hier liegt eine spezielle Wechselwirkung zwischen dem Wasser und den festen Bodenteilchen vor, nämlich eine unterschiedliche Benetzung (FOWKES, 1964; zit. in HARTGE, 1999). Diese Wechselwirkung ist am stärksten bei trockenen Böden zu beobachten. Sie wirkt sich vor allem auf das Verhalten des oberflächennahen Bodens sowie der unmittelbaren Bodenoberfläche gegenüber Wasser aus. Dabei ist insbesondere die Infiltration des Wassers in den Böden betroffen und im Zusammenhang damit die Stabilität von Aggregaten (HARTGE et al., 1999).

#### 2.1.6 Bodenluft

Die Zwischenräume den festen Bodenteilchen können nicht „leer“ im engsten Sinne des Wortes sein. Wenn sie kein Wasser enthalten, müssen sie mit Gas gefüllt sein. Unter Freilandbedingungen sind alle Oberflächen von festen Bodenteilchen mit einem Wasserfilm überzogen, die im Gleichgewicht mit dem Wasserdampfdruck der Luft stehen. Das bedeutet, dass unter diesen Umständen im Boden gar keine Berührung zwischen der Luft und den Feststoffteilchen stattfindet, solange diese feucht bleiben (HARTGE et al., 1999).

#### 2.1.7 Bodentemperatur

Ebenso wie das Verhalten von Wasser und Luft im Boden durch Untersuchung ihrer Masseanteile bzw. deren Verteilung im Boden oder durch deren energetische Situation erfasst werden kann, so gibt es auch für die Wärmeenergie zwei Aspekte der Betrachtung. Im Gegensatz zum Wasser ist in diesem Fall aber der Potentialtherm (hier die Temperatur) messtechnisch leichter zu erfassen als er der Mengentherm, was die Wasserkapazität wäre. Deshalb wird bei der Untersuchung und Beschreibung der gesamten thermischen Situation einschließlich ihrer periodischen oder einmaligen Veränderungen in der Regel vom Potential– also von der Temperatur ausgegangen. Die Temperatur ist daher die bekannteste Größe im Bereich der thermischen Erscheinungen. Die Bodentemperatur ist ein Faktor, der für alle Vorgänge im Boden sehr wichtig ist. Dies gilt sowohl für die Entwicklung der Lebewesen als auch für die Vorgänge der Bodenentwicklung, die als Folge der Organistentätigkeiten beobachtet werden vor allem für den Ab- und Umbau organischer Substanz im Boden. Es trifft aber auch ganz allgemein für den Ablauf aller chemischen und vieler physikalischen Vorgänge zu. Der Wärmehaushalt des Bodens wird in erheblichem Maße von zwei Eigenschaften bestimmt:

durch das Ausmaß der Temperaturerhöhung, die als Folge der Zufuhr thermischer Energie auftritt, und durch das Ausmaß, in dem derartige Zufuhren innerhalb des Bodens weitergegeben werden (HARTGE et al., 1999).

Zwei Mechanismen bewirken im Boden Wärmeausgleichsbewegungen, und zwar die Wärmeleitung und die Wärmekonvektion. Während die erste immer abläuft, ist die zweite an das Vorhandensein eines beweglichen Trägers gebunden. Dieser Träger ist in der Regel das Wasser. In der flüssigen Phase ist es wegen seiner hohen Wärmekapazität ein wirksamer Träger. In der Gasphase hat es zwar eine geringe Kapazität, aber dies wird durch die hohe Verdampfungs- bzw. Kondensationswärme wettgemacht. Im nicht wassergesättigten Boden spielt daher der Wasserdampftransport als Wärmetransportmechanismus eine erhebliche Rolle. Die Wärmeleitung ist stark vom Ausmaß des leitenden Querschnitts im Boden abhängig. Dieser Querschnitt ist wegen der geringen Wärmeleitfähigkeit der Luft stark vom Wassergehalt abhängig. Geringe Wassergehalte bewirken infolge ihrer meniskenartigen Verteilung im Boden besonders starke Zunahmen des Fließquerschnitts und führen damit zu größeren Transportmengen. Dies führt zum schnelleren Temperaturanstieg im gesamten Bodenkörper. Da aber gleichzeitig die hohe Wärmekapazität des Wasser viel Energie zu dessen Erwärmung verbraucht, gibt es ein Punkt, an dem die Transportzunahme infolge Zunahme des Fließquerschnitts und damit der Leitfähigkeit durch die Zunahme der Kapazität kompensiert wird. Letztere verhindert den für ein Weitergehen des Transports notwendigen regionalen Temperaturanstieg und so die Ausbildung starker Temperaturgradienten. Dies führt schließlich zu der Abnahme der Temperaturleitfähigkeit (HARTGE 1999; zit. in SCHEFFER et al., 2000).

Die Konvektion ist von Menge, Fließgeschwindigkeit und Kapazität des transportierenden Mediums abhängig. Als Transportmedien kommen das Wasser und die Gasphase im Boden in Betracht. In den meisten Böden tritt der Wärmetransport durch das Grundwasser weitgehend zurück, weil dieses sich nur relativ wenig bewegt und die Temperaturdifferenzen innerhalb des von ihm passierten Raumes meist klein sind. Großen Einfluss auf den Wärmehaushalt im Boden hat im allgemeinen der Wasserdampftransport, wenn ein solcher infolge hinreichend zusammenhängender Luftvolumina zustande kommt. Er kann in den obersten 2 cm des Bodens 40 bis 60% des gesamten Wärmetransportes ausmachen (KOOOREVAAR et al., 1983; zit. in HARTGE, 1999). Der Wärmetransport kommt dadurch zustande, dass bei hoher Wassersättigung der Bodenluft jede Temperaturänderung relativ eng mit einer Dampfdruckänderung parallel läuft. Die Folge davon ist die Kondensation von Wasserdampf zu Wasser im Bereich der niedrigen Temperatur. Mit diesem konzentrationsbedingten Wasserdampfstrom wird die Verdunstungswärme des Wassers transportiert. Dieser

Mechanismus bleibt wirksam, solange die durch Kondensation freiwerdende Wärmemenge vom Ort der Kondensation so schnell abgeführt wird, dass dort die niedrige Temperatur erhalten bleibt. Dies ist z. B. an einer Bodenoberfläche während der Nacht der Fall, im Unterboden hingegen im Tagesverlauf. Die geringe Wärmekapazität und die gleichzeitig geringe Wärmeleitfähigkeit des Hochmoortorfes erzeugt am Tage einen Wärmeenergiestau nahe der Oberfläche. Daher steigen die Temperaturen dort und auch in der bodennahen Luft. Die Weitergabe nach unten ist gering. Die nächtliche Abstrahlung beginnt mit relativ hoher Intensität, und daher geht ein besonders großer Anteil der tagsüber eingestrahnten Energie verloren. Als Folge der Abkühlung der Bodenoberfläche sinkt die Temperatur der angrenzenden Luftschicht ebenfalls. Dieses Phänomen ist um so stärker ausgeprägt, je trockener der Torf ist. Es führt daher um so öfter zu niedrigen Temperaturen an der Bodenoberfläche, je stärker das Moor gedränt ist und erklärt die relative Häufigkeit von Nacht- und Spätfrösten solcher Lagen. Im Geschiebesand sind die Temperaturunterschiede im Boden und daher auch im unmittelbar angrenzenden Luftraum weit kleiner als im Moor, das tiefere Eindringen der Temperaturwelle in den Boden hinein ist deutlich erkennbar. Der Unterschied zwischen Maximal- und Minimalwert beträgt hier in 50 cm Tiefe noch immer etwa 1°C. Dies ist eine Folge der im Vergleich zum Hochmoor höheren Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit. In dichten Materialien wie Granit reicht die Temperaturschwankung wegen der Kombination von geringer Kapazität und hoher Leitfähigkeit noch tiefer hinunter. Dieser Sachverhalt führt unter anderem dazu, dass die „Frosttiefe“ im Boden unter Steinen größer ist als in gleicher Bodentiefe daneben. Dies ist im Zusammenhang mit dem Hochfrieren von Steinen wichtig. Wärmetransporte werden in jeder Richtung unterbunden, wenn Konvektionsströme – d.h. sowohl Wasserdampf als auch nahe dem Gefrierpunkt fließendes Wasser und Leitungsmöglichkeiten abgeschnitten werden. Lockerlagernde Schichten aus organischem (Torf, Mulch) oder mineralischem (Aggregatschichten) Material mit geringer Leitfähigkeit sind solche Transporthemmer. Durch Lockern und Dränen kann man natürlich auch eine Hemmung erreichen. Die Folge ist bei niedriger Bodentemperatur im Frühjahr ein langsames Erwärmen und unmittelbar an der Oberfläche Spätfrostgefahr (WIERENGA et al., 1982; zit. in HARTGE, 1999)

## 2.2 Gesetzliche Grundlagen

### 2.2.1 Tierseuchengesetz (TierSG)

Dieses Gesetz regelt die Bekämpfung von Seuchen, die bei Haustieren oder Süßwasserfischen auftreten oder bei anderen Tieren auftreten und auf Haustiere oder Süßwasserfische übertragen werden können (Tierseuchen). § 79a bleibt unberührt.

(2) Im Sinne dieses Gesetzes sind

1. Haustiere:

von Menschen gehaltene Tiere einschließlich der Bienen, jedoch ausschließlich der Fische;

2. Vieh:

folgende Haustiere: Pferde, Esel, Maulesel, Maultiere, Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, Kaninchen, Gänse, Enten, Hühner - einschließlich Perl- und Truthühner - und Tauben;

3. Schlachtvieh:

Vieh, von dem anzunehmen ist, dass es zur Verwendung des Fleisches zum Genuss für Menschen alsbald geschlachtet werden soll;

4. Süßwasserfische:

Fische in allen Entwicklungsstadien einschließlich der Eier und des Spermas, die fischereilich genutzt werden und

- a) ständig oder zeitweise im Süßwasser leben oder
- b) im Meerwasser oder Brackwasser gehalten werden;

als Fische in diesem Sinne gelten auch Neunaugen (Cyclostomata), Zehnfußkrebse (Dekapoden) und Weichtiere;

5. verdächtige Tiere:

seuchenverdächtige und ansteckungsverdächtige Tiere;

6. seuchenverdächtige Tiere:

Tiere, an denen sich Erscheinungen zeigen, die den Ausbruch einer Seuche befürchten lassen;

7. ansteckungsverdächtige Tiere:

Tiere, die nicht seuchenverdächtig sind, von denen aber anzunehmen ist, dass sie den Ansteckungsstoff aufgenommen haben;

8. Mitgliedstaat:

Staat, der der Europäischen Gemeinschaft angehört;

## 9. Drittland:

Staat, der der Europäischen Gemeinschaft nicht angehört;

## 10. innergemeinschaftliches Verbringen:

jedes Verbringen aus einem anderen Mitgliedstaat und nach einem anderen Mitgliedstaat sowie das Verbringen im Inland zum Zwecke des Verbringens nach einem anderen Mitgliedstaat;

## 11. Einfuhr:

Verbringen aus einem Drittland in die Europäische Gemeinschaft;

## 12. Ausfuhr:

Verbringen aus dem Inland in ein Drittland.

## 2.2.2 Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG)

Die Ziele des Naturschutzes und der Landschaftspflege beinhalten, die Natur und Landschaft auf Grund ihres eigenen Wertes und als Lebensgrundlagen des Menschen auch in Verantwortung für die künftigen Generationen im besiedelten und unbesiedelten Bereich so zu schützen, zu pflegen, zu entwickeln und, soweit erforderlich, wiederherzustellen, dass

1. die Leistungs- und Funktionsfähigkeit des Naturhaushalts,
2. die Regenerationsfähigkeit und nachhaltige Nutzungsfähigkeit der Naturgüter,
3. die Tier- und Pflanzenwelt einschließlich ihrer Lebensstätten und Lebensräume sowie
4. die Vielfalt, Eigenart und Schönheit sowie der Erholungswert von Natur und Landschaft auf Dauer gesichert sind.

## 2.2.3 Bundes-Bodenschutzgesetz ( BBodSchG)

Zweck dieses Gesetzes ist es, nachhaltig die Funktionen des Bodens zu sichern oder wiederherzustellen. Hierzu sind schädliche Bodenveränderungen abzuwehren, der Boden und Altlasten sowie hierdurch verursachte Gewässerverunreinigungen zu sanieren und Vorsorge gegen nachteilige Einwirkungen auf den Boden zu treffen. Bei Einwirkungen auf den Boden sollen Beeinträchtigungen seiner natürlichen Funktionen sowie seiner Funktion als Archiv der Natur- und Kulturgeschichte soweit wie möglich vermieden werden.

## 2.2.4 Wasserhaushaltsgesetz (WHG)

(1) Die Gewässer sind als Bestandteil des Naturhaushalts und als Lebensraum

für Tiere und Pflanzen zu sichern. Sie sind so zu bewirtschaften, dass sie dem Wohl der Allgemeinheit und im Einklang mit ihm auch dem Nutzen Einzelner dienen, vermeidbare Beeinträchtigungen ihrer ökologischen Funktionen und der direkt von ihnen abhängenden Landökosysteme und Feuchtgebiete im Hinblick auf deren Wasserhaushalt unterbleiben und damit insgesamt eine nachhaltige Entwicklung gewährleistet wird. Dabei sind insbesondere mögliche Verlagerungen von nachteiligen Auswirkungen von einem Schutzgut auf ein anderes zu berücksichtigen; ein hohes Schutzniveau für die Umwelt insgesamt, unter Berücksichtigung der Erfordernisse des Klimaschutzes, ist zu gewährleisten.

(2) Jedermann ist verpflichtet, bei Maßnahmen, mit denen Einwirkungen auf ein Gewässer verbunden sein können, die nach den Umständen erforderliche Sorgfalt anzuwenden, um eine Verunreinigung des Wassers oder eine sonstige nachteilige Veränderung seiner Eigenschaften zu verhüten, um eine mit Rücksicht auf den Wasserhaushalt gebotene sparsame Verwendung des Wassers zu erzielen um die Leistungsfähigkeit des Wasserhaushalts zu erhalten und um eine Vergrößerung und Beschleunigung des Wasserabflusses zu vermeiden.

(3) Durch Landesrecht wird bestimmt, dass der Wasserbedarf der öffentlichen Wasserversorgung vorrangig aus ortsnahen Wasservorkommen zu decken ist, soweit überwiegende Gründe des Wohls der Allgemeinheit nicht entgegenstehen.

(4) Das Grundeigentum berechtigt nicht

1. zu einer Gewässerbenutzung, die nach diesem Gesetz oder nach den Landeswassergesetzen einer Erlaubnis oder Bewilligung bedarf,
2. zum Ausbau eines oberirdischen Gewässers.

### 2.2.5 Pflanzenschutzgesetz (PflSchG)

Zweck dieses Gesetzes ist, Pflanzen, insbesondere Kulturpflanzen vor Schadorganismen und nichtparasitären Beeinträchtigungen zu schützen. Im Sinne dieses Gesetzes sind Schadorganismen: Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen in allen Entwicklungsstadien, die erhebliche Schäden an Pflanzen oder Pflanzenerzeugnissen verursachen können. Viren und ähnliche Krankheitserreger werden den Mikroorganismen, nicht durch Schadorganismen verursachte Krankheiten werden den Schadorganismen gleichgestellt (§ 2 PflSchG).

### 2.3 Problematik der Kontamination des Bodens mit Mikroorganismen in Freilandhaltung

In einer konzentrierten Tierhaltung, wie sie in aller Regel eine ökonomisch zu betreibende Schweinehaltung darstellt (FRIES, 2000) oder auch die Masthähnchenhaltung (BANDICK et al., 1998) können Salmonellen zu einem großen Bestandsproblem werden. Salmonellen sind Erreger von Tierseuchen und sie stellen als Erreger einer Zoonose eine besondere Gefahr für den Menschen dar. Hinzu kommen fäkalcoliforme Keime, Enterobacteriaceen, *Campylobacter* spp. und *Clostridium perfringens*, die in sehr unterschiedlichen Konzentration z.B. bei eigenen Untersuchungen in der Einstreu von Liegeboxen von Milchkühen nachgewiesen werden konnten (BÖHM et al., 2004). In der Freilandhaltung halten sich diese Erreger unterschiedlich lange im Boden mit der Gefahr der oberflächlichen Abschwemmung bei Starkregenereignissen oder der Tiefenverlagerung bei entsprechenden bodengeologischen und bodenphysikalischen Voraussetzungen. Viele Infektionskrankheiten verlaufen mit Beteiligung des Verdauungs- und/oder des Urogenital- und Respirationstraktes. Die Erreger dieser Krankheiten werden von den erkrankten Tieren entweder direkt ausgeschieden (z.B. Nasen-, Pharynx-, Vaginal-, Plazenta- oder Lochialsekrete, Fäzes, Urin, Milch, Sperma, Hautteile) oder gelangen indirekt über Tierkörper, Blut, Schlachtabfälle und -produkte, Eier und Eiprodukte, Milch und Milchprodukte oder Wirtschaftsdünger in die Umwelt. Bei Stallhaltung enden die pathogenen Agentien in aller Regel auf dem Stallfußboden, auch wenn sie nicht über den Verdauungs- oder Urogenitaltrakt emittiert werden. In der Freilandhaltung gelangen sie auf die Bodenoberfläche und werden bei gewaschenem Boden eingebracht. Dort mischen sie sich mit Stallmist, Jauche und Gülle und gelangen bei deren Entfernung aus dem Stall ebenfalls in die Lagerstätten für Fest- und Flüssigmist. Durch die Düngung von landwirtschaftlichen Nutzflächen mit Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft (Gülle, Jauche, Festmist) gelangen fäkale Indikatorbakterien und gegebenenfalls pathogene Keime auf die Bodenoberfläche (STRAUCH,

1992). Wenn infizierte Wirtschaftsdünger landwirtschaftlich verwendet werden, besteht somit die Gefahr einer z.T. weiträumigen Verschleppung von Seuchenerregern oder der Erreger von übertragbaren Faktorenkrankheiten (STRAUCH, 1991). In der Liste einer EG-Arbeitsgruppe werden folgende bakteriellen Infektionserreger besonders erwähnt, die Probleme für die tierische und menschliche Gesundheit verursachen können, wenn sie mit Fäzes auftreten: Salmonellen, Leptospiren, Treponemen, Rotlauf-, Myko- und Milzbrandbakterien, Bruzellen enteropathogene *E. coli*, Rickettsien und Chlamydien (KELLY, 1978; zit. in STRAUCH, 1991). Auch sämtliche Viren, die aus dem infizierten Tierkörper in die Umwelt gelangen, können in den Wirtschaftsdüngern vorhanden sein. Über die Konzentration dieser Viren in den Fäzes gibt es nur wenig Informationen. Nach SELLERS (1981); zit. in STRAUCH (1991) betragen die maximalen Virustiter in Fäzes bei Maul- und Klauenseuche bei Rind, Schaf bzw. Schwein 5,5, 2,7 bzw. 2,9 log. ID<sub>50</sub> je Gramm, bei der vesikulären Schweinekrankheit 6,0 und bei Rinderpest ebenfalls 6,0 log ID<sub>50</sub> je Gramm Fäzes.

Die Viruskonzentrationen z.B. menschlicher Ausscheidungen können durchaus 10<sup>6</sup> infektiöse Einheiten von Enteroviren pro Gramm Stuhl (SABIN et al., 1955) und 10<sup>9</sup> infektiöse Einheiten von Reoviren pro Gramm Stuhl enthalten (KONNO et al., 1977).

In Schweinehaltungen können in vielen Fällen Wirtschaftsdünger als Reservoir für Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, Sarcocystisarten und *Ascaris suum* angesehen werden. In Rinderhaltungen besitzen Wirtschaftsdünger als Vektor für *Eimeria*-Arten, *Cryptosporidium parvum*, *Sarcocystis*-Spezies, *Taenia saginata* und *Fasciola hepatica* eine gewisse Bedeutung (HIEPE et al., 1991).

### 2.3.1 Vorkommen und Tenazität von Mikroorganismen im Boden und anderen Medien

ADE-KAPPELMANN (2004) hat unterschiedliche Mikroorganismen auf Keimträger in eine Pasteurierungsanlage (Laborpasteur) für Gülle eingebracht um deren Tenazität bei verschiedenen Temperaturen und Aufenthaltszeiten zu überprüfen.

Die verwendeten Keimträger entsprechen aufgrund ihrer Bauart verschiedenen praxisnahen Anforderungen (HOFERER, 2001).

Im Laborpasteur, an dem ADE-KAPPELMANN (2004) ihre Versuche zur Hygienisierung durchgeführt hat, wurde ein Temperaturbereich von 70-90 °C erzeugt, bei großtechnischen Untersuchungen maximal 70 °C für eine Stunde.

Bei den Untersuchungen in der Praxis wurden Salmonellen in einer Stunde bei 70 °C in der Gülle inaktiviert. *Enterococcus faecalis* war nach 30 min bei 70°C im Laborpasteur noch

nachweisbar. Erst nach 90 min bei 70 °C konnte *Enterococcus faecalis* eliminiert werden. Bei einer Temperatur von 80 °C wurde *Enterococcus faecalis* nach 20 min vollständig eliminiert (ADE-KAPPELMANN, 2004).

SOLDIERER (1991) konnte deutliche Unterschiede in der Hitzeresistenz zwischen verschiedenen Flüssigmistproben erarbeiten. Während der Nachweis von Salmonellen in Schweinegülle bereits nach 20 min bei 60 °C nicht mehr gelang, konnten Fäkalstreptokokken aus anderen Proben (Rinder- oder Schweinegülle) noch nach 150 min bei 60°C nachgewiesen werden. Die Fäkalstreptokokken haben sich als wärmeresistenter erwiesen. Eine deutsche Arbeitsgruppe (zit. in SOLDIERER, 1991) empfiehlt zur Entseuchung von Klärschlamm folgende Temperatur-Zeit-Kombinationen: 70 °C/25 min.

Nach HAVELAAR (1984), zit. in SOLDIERER (1991) wird dabei meist die Temperatur-Zeit-Kombination 70 °C/30 min zur Pasteurisierung angewandt. Auch für die Pasteurisierung von Flüssigmist (Trockensubstanz unter 10%) wird die Kombination 70 °C/30 min empfohlen (EKESBO, 1985; WHO, 1988, zit. in SOLDIERER, 1991). PHILIPP (2004) empfiehlt die Pasteurisierung des Bioabfalls bei einer Temperatur von 70°C bei einer 1 Stunde.

SOLDIERER (1991) ermittelte die Zeit, in der es zur Inaktivierung von *Salmonella Senftenberg*<sub>775</sub> in Flüssigmist bei verschiedenen Temperaturen kam: bei 50 °C – 56,7 min; bei 55 °C – 11,5 min; bei 60 °C – 2,3 min und bei 65 °C - 0,47min.

Auch dieser Beispiel zeigt, dass niedrige Temperaturen um 50 °C fast 1 Stunde Zeit der Wärmewirkung erfordern, um Salmonellen zu inaktivieren.

Seit langem ist bekannt, dass feuchte Hitze Mikroorganismen wesentlich stärker schädigt als trockene Hitze bei gleicher Temperatur. Eine Erkenntnis, die in der Sterilisationspraxis breite Anwendung findet (JOSLAYN, 1983; WALLHÄUSSER, 1988; zit. in SOLDIERER, 1991).

Eine Bodendesinfektion kann mit Einwirkung von Hitze grundsätzlich durchgeführt werden. Die Frage stellt sich, welche Temperaturen werden über welche Zeitspannen beim Einsatz unterschiedlicher technischer Einrichtungen zur Bodenerwärmung erreicht.

Nach HOF et al. (2000) ist die Desinfektion eine gezielte Entkeimung bestimmter, unerwünschter Mikroben mit dem Zweck, die Übertragung von Krankheitserregern zu verhindern, bzw. eine Reduktion der Anzahl der Mikroorganismen auf dem Objekt um mindestens 5 log-Stufen zu bewirken, so dass von dort keine Infektion mehr ausgehen kann.

Nach Wagner (1993) überlebten Salmonellen zwischen 1 Tag und 13 Monaten, im gefrorenen feuchten Boden über 2 Jahre PIOCH (1989); zit. in WAGNER (1993), in trockener Erde bis 500 Tage (HESS et al., zit. in WAGNER, 1993), in geschlossenen Wassergefäßen sogar bis 16 Jahren (ALTHAUS, zit. in Wagner, 1993).

Nach KÖHLER (1993) kann Bovines Parvovirus (Stamm Haden) in verschiedenen Böden bei Lagerungstemperaturen von 4 °C über einen einheitlich langen Zeitraum, bis zur 44. Woche Überleben bei einer Temperatur von 20 °C bis 28 Wochen. Bei Rotaviren betrug die längste Zeitspanne des Virusnachweises bei 4 °C 60 Wochen und bei 20 °C 28 Wochen. Bei ECBO-Viren waren es 52 Wochen bei Temperaturen von 4 °C und 28 Wochen bei Temperaturen von 20 °C.

Fäkalstreptokokken können im Boden nach 4 Wochen bei einer Temperatur von 20 °C noch nachgewiesen werden und bei der Temperatur von 4 °C bis zur 54. Woche.

Überlebenszeiten von Fäkalkeimen in sandigen Böden unter Laborbedingungen sind in den meisten Fällen bei Lagerungstemperaturen zwischen 20 °C und 25 °C ermittelt worden und reichen von einigen wenigen Wochen bis zu 64 Wochen (WAGNER, 1993).

Nach SOLDIERER (1991) werden bei 65 °C 30 Minuten benötigt um Flüssigmist zu pasteurisieren. Bei 75 °C sind es 20 min und bei 80 °C entsprechend 10 min.

SOLDIERER (1991) macht die Aussage, Flüssigmist bei 70 °C über 25 Minuten sicher unter der Voraussetzung pasteurisieren zu können, wenn eine vorausgehende Zerkleinerung der Bestandteile kleiner als 5 mm Durchmesser gegeben ist.

Nach MOĆE-LLIVINA (2003) reduzierten sich *E. coli* bei Temperaturen von 80 °C nach 30 min um mehr als 3,6 Zehnerpotenzen im Schlamm. Im Vergleich dazu reduzierten sich *E. coli* bei einer Temperatur von 60 °C und 30 min um 6 Zehnerpotenzen im Abwasser. Nach 30 min wurde *Enterococcus faecalis* bei einer Temperatur von 80 °C über 1,4 Zehnerpotenzen im Schlamm reduziert. Zum Vergleich wurde die Zahl von *Enterococcus faecalis* nach 30 min einer Temperatur von 60 °C über 3,4 Zehnerpotenzen im Abwasser reduziert.

Die Inaktivierungsrate von pathogenen Mikroorganismen steigt mit zunehmender Temperatur (DUNHAM, 1977; MARTENS, 1999; WELLINGER 1991; zit. in HOFERER, 2001).

Nach VAN DONSEL et al. (1967; zit. in MITSCHERLICH, 1984) überlebten *Enterococcus faecalis* 70 Tage in schattigen und in ungeschützten Stellen in 8 cm Bodentiefe in der Zeit von März bis April. Die Versuchsstelle war mit Gras bewachsen.

Nach SPYNU et al. (1998) überlebten Polioviren im Boden und an Tomatenpflanzen 60 Tage.

Nach YEAGER et al. (1979) wurde bei Enteroviren (Polioviren), die im trockenen Boden (unabhängig von Temperatur, Bodentyp) 12 Tage bei 37 °C gelagert wurden keine Infektiösität mehr festgestellt. BITTON et al. (1984) haben beobachtet, dass Viren (Poliovirus und Echovirus) während einer warmen und trockenen Saison schneller inaktiviert werden als während einer warmen und feuchten Saison.

Nach GUO et al. (2002) überlebten Salmonellen (*S. Montevideo*, *S. Poona* und *S. Michigan*) 45 Tage im feuchten Boden bei 20 °C.

Nach BEST (1971) ist die Tenazität von Salmonellen in Flüssigmist von ihrer Spezieszugehörigkeit abhängig. In Rindergülle überlebten bei einer Temperatur zwischen 4,5 °C bis 15,4 °C *Salmonella Dublin* 49 Tage und *Salmonella Thyphimurium* 177 Tage. STRAUCH (1991) gibt ein Beispiel der Tenazität von *Salmonella Senftenberg* im Boden in Abhängigkeit von der Jahreszeit in welcher es bei einmaliger Ausbringung eines Klärschlamm auf Waldboden kam. Im Sommer überlebten die Salmonellen bis 820 Tage und im Winter bis 350 Tage.

Es wird dabei eine Erklärung gegeben, warum die Salmonellen bei der Sommerausbringung länger überlebt haben als bei der Winterausbringung des Klärschlammes.

Nach KNOP (1997) konnten Salmonellen noch am 2. Tag bei Temperaturen von bis 65 °C im Kompost nachgewiesen werden. *Salmonella Senftenberg* dagegen 420 min bei 55 °C.

Die hitzeresistente Fraktion überlebt wesentlich länger als der Rest (MOAST et al., 1971 ;zit. in KNOP, 1997).

Bei Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung benutzte GIEß (1992; zit. in KNOP, 1997) *Salmonella Schleißheim* und *S. Senftenberg*<sub>775W</sub> als Testorganismen und konnte nach 24 Tagen trotz Maximaltemperaturen von 70°C noch Salmonellen nachweisen.

KNOP (1997) berichtet, dass *S. Senftenberg*<sub>775W</sub> mit dem höchstem TS-Gehalt des Ausgangsmaterials am längsten nachweisbar war.

In der Literatur wird für Salmonellen und andere Bakterien das Phänomen der Erlangung einer erhöhten Hitzeresistenz durch Adaptation beschrieben (HUMPHREY, 1990; KATSUI et al., 1982; KIM et al., 1989; zit. in KNOP, 1997).

Die Anzüchtung von Mikroorganismen oberhalb ihres Wachstumsoptimums soll zu erworbener Thermoresistenz führen können (NEIDHARDT und VAN BOGELEN, 1987; YAMAMORI und YURA, 1982; zit in KNOP, 1997).

MACKEY und DERRICK (1986) beobachteten, dass sich die Inaktivierungszeit von *S. Typhimurium* bei 55 °C bzw. 59 °C nach 30 min Vorerwärmung bei 48°C um das 2 bis 7-fache verlängerte.

Die mögliche Erklärung für eine Thermoresistenz wird durch die Bildung sogenannter hitzeresistenter Hitzeschockproteine („heat shock proteins“) gegeben (MACKEY und DERRICK, 1986; zit in KNOP, 1997). Nach LEMAUX et al. (1978; zit. in KNOP, 1997) werden solche Proteine gebildet, wenn Bakterienzellen innerhalb ihres Wachstumsbereichs von niederen auf höhere Temperaturen erwärmt werden. Für *E. coli* ist eine vorübergehende Expression solcher Hitzeproteine belegt (YAMAMORI und YURA ,1982; zit. in KNOP, 1997)

MITSCHERLICH und MARTH (1984) zitieren Beispiele verschiedener Wissenschaftler,

die Überlebenszeiten unterschiedlicher Mikroorganismen im Boden bei verschiedenen Temperaturen beinhalten:

Nach VAN DONSEL et al. (1967) überlebte *E. coli* 28 Tage an einer schattigen Stelle von März bis zum April in 8cm Bodentiefe. Auf einer ungeschützten Stelle sind es 40 Tage. Zwischen den Monaten Juni bis August überlebten *E. coli* 43 Tage an einer schattigen Stelle und 20 Tage auf einer ungeschützten Stelle. Dazu sind die Überlebenszeiten in den Monaten September-Oktober: 70 Tage im Schatten und 40 Tage auf einer ungeschützten Stelle. In den Monaten November-Januar- 65 Tage im Schatten und 62 Tage auf einer ungeschützten Stelle. Der Boden wurde nach VAN DONSEL (1967) mit einer Keimsuspension von *E. coli* beaufschlagt, die auf Basis einer „brain-heart infusion“ hergestellt war. *Escherichia coli* überlebte von März bis zum April kürzer auf schattigen Stellen als in ungeschützten Stellen. In den Monaten Juni bis August überlebten die Mikroorganismen länger auf schattigen Stellen, wo es feuchter war im Vergleich zu den ungeschützten Stellen. Die Sonne hat den Boden auf den geschützten Stellen nicht so stark erhitzt als auf den ungeschützten Stellen.

Die Mikroorganismen können auch mittels chemischen Methoden, z.B. Alkalisierung durch Kalkung, mit CaO (Branntkalk) oder Ca(OH)<sub>2</sub> (Löschkalk) reduziert werden.

Zur Schneckenbekämpfung wurde 0,5-1 kg CaO/m<sup>2</sup> auf landwirtschaftlichen Böden ausgebracht (ANONYM, 2003).

Untersuchungen von LANG (1987), zit. in SCHIRM (2003) belegen, dass beim Einsatz von Ca(OH)<sub>2</sub> eine Inaktivierungszeit von drei Stunden angesetzt werden muss um *E. coli* bei einem pH von 12,6 ausreichend reduzieren zu können.

Nach SCHIRM (2003) kann mit einer Kalkmenge von 0,2 kg CaO/kg TS bei Bioabfällen ein pH>12,5 eingestellt werden. Bei einer Lagerung von 24 Stunden bei pH>12,5 kann von einer ausreichenden Reduzierung des ECBO-Virus, *Salmonella Senftenberg* und *E. coli* ausgegangen werden.

Bei der Verwendung von 0,3 kg CaO/kg TS kann *S. Senftenberg* und *E. coli* innerhalb von einer Stunde und Fäkalstreptokokken nach 3-5 Stunden unabhängig vom eingesetzten Substrat um 5 Zehnerpotenzen reduziert werden (SCHIRM, 2003).

Das Bovine Parvovirus kann bei Freisetzung von Ammoniak in kürzer Zeitspannen inaktiviert werden. Im Praxisbetrieb wurde beim Einsatz von 0,9 kg CaO/kg TS im Substrat Gärrückstand eine ausreichende Reduzierung innerhalb von 30 Minuten erreicht. Klärschlamm sollte nach der Einmischung von 0,9 kg CaO/kg TS 24 Stunden gelagert werden, bevor von einer Inaktivierung des BPV ausgegangen werden kann SCHIRM (2003).

Nach PALUSZAK et al. (2003) überlebten Salmonellen, *E. coli* und Streptokokken der D-

Gruppe 28 Wochen, 24,6 Wochen und 16,5 Wochen bei 20°C im Boden der nicht mit Flüssigmist gedüngt wurde. Die Tenazität der untersuchten Mikroorganismen beträgt bei 20°C und zusätzlicher Flüssigmistdüngung 34,5 Wochen, 26,8 Wochen und 24,8 Wochen. Nach Wagner (1993) überlebten Salmonellen zwischen 1 Tag und 13 Monaten, im gefrorenen feuchten Boden über 2 Jahre (PIOCH et al., 1989; zit. in WAGNER, 1993), in trockener Erde bis 500 Tage (HESS et al., 1974; zit. in WAGNER, 1993), in geschlossenen Wassergefäßen sogar bis 16 Jahre (ALTHAUS, 1983; zit. in Wagner, 1993).

Die Fäkalstreptokokken können im Boden nach 4 Wochen bei einer Temperatur von 20°C noch nachgewiesen werden und bei der Temperatur von 4 °C bis zur 54. Woche.

Überlebenszeiten von Fäkalkeimen in sandigen Böden unter Laborbedingungen sind in den meisten Fällen bei Lagerungstemperaturen zwischen 20 °C und 25 °C ermittelt worden und reichen von wenigen Wochen bis zu 64 Wochen (WAGNER, 1993).

Manche Mikroorganismen sind im trockenen Boden durch die Hitze schwerer zu inaktivieren als in einem feuchten Boden. *Sclerotia sclerotiorum* wird in trockenem Zustand bei einer Temperatur von z.B. 80 °C inaktiviert. In einem befeuchteten Boden genügt eine Temperatur von 60 °C um sie in der gleichen Zeit abzutöten (MARISKA et al., 2002).

Tabak-Mosaik-Virus (TMV) gehört zu den stabilsten Pflanzenviren, welche in getrockneten Tabakblättern Temperaturen von 120 °C bis 150 °C überstehen kann (BODE, 1958; zit in LORENZ, 2001). TMV überlebten 21 Tage in einer Anaerobanlage bei Temperaturen von 70 °C mit noch einer schwach ausgeprägten Virulenz. Im feuchtem Pflanzenmaterial wurde TMV zwischen 10 bis 20 Minuten bei Temperaturen von 90°C inaktiviert (BROADBEND et al., 1965; zit. in LORENZ, 2001). Die Thermoresistenz von TMV ist im getrockneten Pflanzenmaterial höher. Bei Temperaturen von 150 °C ist das TMV in wenigen Minuten inaktiviert (SCHMELZER et al., 1977; zit in LORENZ, 2001). In 10 Minuten kommt es im getrockneten Pflanzenmaterial bei Temperatur von 150 °C zur vollständiger Reduktion der Infektiosität des TMV (BODE et al., 1968; zit in LORENZ, 2004). In einer Pasteurisierungsanlage bei der Erhitzung von Bioabfällen kam es innerhalb 1 Stunde bei der Temperatur von 90 °C zur vollständigen Inaktivierung des TMV (LORENZ, 2004).

*Plasmodiophora brassicae* ist als obligater Endoparasit bei Kohlpflanzen ein phytopathologisch bedeutsamer Erreger. *P. brassicae* bildet sehr widerstandsfähige Dauersporen, welche mehrere Jahre im Boden überleben können (BRUNS et al., 1989; zit. in LORENZ, 2001).

Feuchte Hitze inaktiviert Tomatensamen in 10 Minuten bei Temperaturen von 65 °C in Laborversuchen. Trockene Tomatensamen zeigen dagegen eine viel höhere

Widerstandsfähigkeit. Sie verlieren diese nach 15 Tagen bei einer Temperatur von 80 °C, nach 5 Tagen bei einer Temperatur von 90 °C und nach 24 Stunden bei 100 °C (HERMANN et al., 1994; zit in LORENZ, 2001). Gequollene Tomatensamen verlieren nach 24 Stunden ihre Lebensfähigkeit bei einer Temperatur von 60 °C. In Versuchen von POLLMANN (1995) waren die in den Bioabfall eingelegten Tomatensamen mit 45 % Feuchte eingequollen. Es reichte das Einwirken von Temperaturen von über 50 °C 5 Tage lang aus, um Tomatensamen vollständig zu inaktivieren. Waren die Tomatensamen dagegen mit geringerer Feuchte umgeben, reichten diese Temperaturen nicht aus um alle eingelegten Tomatensamen vollständig zu inaktivieren (POLLMANN, 1995). HERMANN et al. (1994), zit. in POLLMANN (1995) haben festgestellt, dass Tomatensamen in großen Kompostierungsanlagen bereits abgetötet waren, bevor die für eine ausreichende Hygienisierung vorgeschriebene Temperatur von 55 °C und die Zeitdauer von 14 Tage einwirkte, sofern die Tomatensamen bei einem Wassergehalt von 45-50 % weitestgehend eingequollen vorlagen. Hatten die Tomatensamen einen geringeren Feuchtegehalt, so wurden sie auch bei Temperaturen von über 55 °C innerhalb 8 Tage nicht vollständig abgetötet. In Reagenzglasversuchen, bei der Hygienisierung von Bioabfall wurde nachgewiesen, dass je geringer der Feuchtegehalt war, desto höhere Temperaturen konnten einwirken ohne zu einem Rückgang der Keimfähigkeit der Tomatensamen zu führen. Bei 100°C und 1 % Feuchte waren Tomatensamen nach 5 Tagen, bei 60 °C und 8 % Feuchte nach 12 Tagen, bei 50 °C und 50 % Feuchte nach 12 Tagen abgetötet. Bei höherem Feuchtegehalt ab etwa 20 % laufen durch den bereits aktivierten Stoffwechsel in Samen aber auch solche Stoffwechselprozesse ab, die die eingetretenen Schäden je nach der Höhe der Temperatur vollständig oder teilweise reparieren können. Ab 60 °C überwiegt wiederum der schädigende Einfluß der Temperatur (POLLMANN, 1995). Bei Temperaturen von 70 °C werden Tomatensamen nach 1 Stunde während der Pasteurisierung des Bioabfalls vollständig inaktiviert. Nach Angaben von LORENZ (2004) kommt es bei der Pasteurisierung des Bioabfalls in 1 Stunde bei Temperaturen von 90°C zur vollständigen Inaktivierung des TMV. Bei 70 °C wird in dieser Zeit *Plasmodiophora brassicae* inaktiviert. *Salmonella senftenberg*, *E. coli*, Fäkalstreptokokken werden sowohl durch die Erhitzung vor der Faulung („Vorpasteurisierung“) als auch durch die Erhitzung nach dem Faulprozess („Nachpasteurisierung“) bei diesen Parametern inaktiviert. Bei dem Bovinen Parvovirus wird in 1 Stunde bei Temperatur von 70 °C der Ausgangstiter bei  $10^6$ KID<sub>50</sub>/ml um max. 5 Zehnerpotenzen reduziert.

Schwarz (2003) macht eine Zusammenstellung von unterschiedlichen Faktoren, die alleine oder im gegenseitigen Zusammenwirken unterschiedliche Einflüsse auf Mikroorganismen im Boden und damit auf ihre Überlebensfähigkeit (Tenazität) ausüben.

Tab. 2: Auswirkung von Umwelteinflüssen auf die Tenazität von Bakterien im Boden (nach SCHWARZ, 2003, modifiziert)

UMELTEINFLÜSSE	AUSWIRKUNG
Temperatur	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sie ist der wesentliche Überlebensfaktor</li> <li>➤ Bei kühlen Wetterlagen ist die Tenazität erheblich größer als bei warmen.</li> <li>➤ Deutliche Abhängigkeit von Temperaturen für Leptospiren, Salmonellen (Gülle, Mist, Boden)</li> <li>➤ Ein entgegengesetztes Verhalten, d.h. ein schnelleres Absterben im Winter für coliforme Bakterien in schlammgedüngten Waldböden</li> </ul>
Bodenfeuchtigkeit	In feuchten Böden und während Regenperioden längere Überlebenszeiten
Bodenwasser Speicherkapazität	➤ Bei hoher Wasserspeicherkapazität längere Überlebenszeiten als in geringerer (z.B. Sandböden)
Gehalt an organischen Stoffen	Ein hoher organischer Gehalt fördert das Überleben Fäzes im Boden vergrößern die Tenazität
pH-Wert	Bei niedrigem pH-Wert ist die Tenazität geringer
Sonnenlicht (UV)	Verkürzung der Tenazität auf der Oberfläche
Bakterienkonkurrenz	Konkurrenz beschleunigt das Absterben von Magen-Darm Bakterien im Klärschlamm Leptospiren werden stark durch die Fäkalkeimflora reduziert
Einflüsse durch limnische Makrophyten	Limnische Makrophyten ( <i>Glyceria maxima</i> , <i>Schoenoplectus lacustris</i> , <i>Alisma plantago</i> ) beschleunigen das Absterben von <i>E. coli</i>

Die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen im Boden hängt insgesamt von biotischen und abiotischen Gegebenheiten am Mikrostandort ab, wobei sich diese Faktoren in Abhängigkeit von der Bodentiefe verändern (STRAUCH, 1992). Neben den physiologischen Eigenschaften der fäkalen Mikroorganismen beeinflussen die Tenazität auch andere Faktoren: pH-Wert, Nährstoffverfügbarkeit, Korngröße, Porenvolumen und -verteilung. Ebenso spielen Witterungseinflüsse wie Temperatur, Sonneneinstrahlung und Niederschläge eine Rolle. Weiterhin ist die antagonistische Wirkung der autochthonen Bodenflora wie auch die Konkurrenz

dieser bodenbürtigen Mikroorganismen um Nährstoffe von Bedeutung (CRANE et al., 1986, zit. in STRAUCH, 1992). Es handelt sich somit um ein multifaktorielles standortabhängiges System, welches die Tenazität der untersuchten Mikroorganismen bestimmt. Dies ist sicher ein Grund für die in der Literatur zum Teil widersprüchlichen Aussagen zur vertikalen Verlagerung und Überlebensfähigkeiten von fäkalen Indikatorbakterien und Pathogene im Boden (STRAUCH, 1992).

Die maximale Konzentrationen von *E. coli* nach 6 bis 12 Tagen nach einer Gülledüngung lagen bei  $10^6$  KBE/100g TS und bei Fäkalstreptokokken bei  $10^5$  und  $10^6$  KBE/100g TS.

Für Salmonellen wird von SCHOMBURG (1987), zit. in SCHWARZ (2003), eine Tenazität beschrieben, die je nach Spezies, Medium und Umweltbedingungen von wenigen Tagen bis zu mehreren Monaten dauern kann.

*Salmonella Anatum* überlebte in Schweinegülle 56 Tage bei einer Temperatur von 4 °C und einem pH-Wert von 7 (AJARIYAKHAJORN et al., 1997).

Die Ausscheidung von Reo- und Picornaviren, aber auch von Adeno- und eventuell Parvoviren über Kot und Harn der infizierten Tiere beinhaltet in der Tierhaltung vor allem die Gefahr der Grundwasserkontamination sowie die Verseuchung von Weidegebieten. Eine Anwendung von nicht entseuchtem Klärschlamm in der Landwirtschaft sowie die heutzutage nicht mehr übliche und erlaubte Klärschlamm entsorgung auf Mülldeponien sind bzw. waren die hauptsächlichen Kontaminationsquellen für Grundwasser mit pathogenen Mikroorganismen.

Den Viren ist gemeinsam, dass sie zu den potenziellen Durchfallerregern gehören und sehr umweltresistent sind. Dies hängt im Wasser von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Temperatur, der Lichteinstrahlung und dem Vorhandensein mikrobieller Enzyme ab. Rotaviren können z.B. im Wasser bei niedrigen Temperaturen monate- bis jahrelang infektiös bleiben.

Der Pseudorabiesvirus überlebt 8 Tage und der Porcine Reproductive Respiratory Syndrom Virus (PRRS) überlebt 14 Tage in Schweinegülle bei einer Temperatur von 4 °C und pH 7 (AJARIYAKHAJORN et al., 1997).

Im Boden können Viren von Bakterien (Bakteriophagen) sowie virale Krankheitserreger von Pflanzen (pflanzenpathogene Viren) und Tieren (tierpathogene Viren) sowie vom Menschen (humanpathogene Viren) vorkommen.

Untersuchungen über humanpathogene Viren im Boden standen meist im Zusammenhang mit der Versickerung von Abwässern. Viren werden hauptsächlich in den oberflächennahen Bodenschichten, d.h. in den oberen 10 cm zurückgehalten. Die Virusgehalte können in diesem

Bereich in Sand- und sandigen Lehmböden zwischen  $0,5$  bis  $9,1 \times 10^3$  PFU/100g schwanken. Auch Spielsand aus von Kleinkindern stark frequentierten Sand- oder Buddelkästen kann gelegentlich Viren enthalten. Die höchste bisher festgestellte Konzentration betrug 60,4 MPNCU/100g Feinsand (WALTER et al., 2000).

Die Hauptquellen für die Verseuchung des Bodens mit Darmviren sind das Auf- oder Einbringen von menschlichen Fäkalien, rohen Abwässern, nicht hygienisiertem Abwasserschlämme sowie Abfällen. Besonders in Ländern mit angespanntem Wasserhaushalt spielt das Recycling-Prinzip eine wichtige Rolle. Die Abwasserlandbehandlung stellt eine Form der biologischen Reinigung dar, bei welcher der natürlich gewachsene Boden als biologisches Filtersystem genutzt wird und wobei es gleichzeitig zur Grundwasseranreicherung kommt. Dieses Filtersystem kann sich erschöpfen, so dass dann mit einem Viruseintritt in das Grundwasser zu rechnen ist. So können in Grundwasser aus 30 bis 40 m Tiefe, das offenbar von einem 3 km entfernten Rieselfeld beeinflusst war, Viren in einer Konzentration bis zu 14 MPNCU/10 l nachgewiesen werden (Walter et al., 2000). Abwässer und Abwasserschlämme können vor allem auf Waldböden, Golfplätzen, Weideflächen und Feldern für die Tierfutterproduktion mittels Verregnung oder Überstauung auf oder in die Furche eingebracht werden. Weitere Quellen für die Viruskontamination des Bodens sind undichte Abwasserkanäle, Fäkalgruben oder Abwassertanks. Nach SANTAMARIA et al., (2003) sind viele pathogene Mikroorganismen, die im Boden vorkommen mit Abwässern assoziiert, z.B.: *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* sp., *Escherichia coli* O 157:H7), Enteroviren (*Hepatitis A*, *Hepatitis E*, Enteroadenovirus, Poliovirus Typ 1 und 2, Echoviren, *Coxsackievirus*) und Protozoen (*Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* und *Cryptosporidium parvum*).

Auch jene Hausmülldeponien, die nicht vorschriftsmäßig gegen den Untergrund abgedichtet sind, können zur Viruskontamination des Bodens beitragen. Seit der Einführung von Wegwerfwindeln sowie von Katzen- und Hundestreu stellt Hausmüll eine Kontaminationsquelle für human- bzw. tierpathogene Viren dar. So können über das Sickerwasser Viren in den Boden gelangen (WALTER, 2000). Erst nach einer Verweildauer von mehr als 2 Jahren ist mit einer Virusinaktivierung zu rechnen (HUBER et al., 1994; zit. in WALTER, 2000).

Von infizierten Nutz-, Haus- und freilebenden Tieren können enterale Viren über Kot und Sekrete ausgeschieden werden. Problematisch dürfen vor allem Mist und Gülle aus großen Tierhaltungen sowie Abwässer aus Schlachthöfen sein. Gülle kann trotz 200-tätiger Lagerung hinsichtlich boviner Rotaviren noch ein Infektionspotenzial besitzen (PESARO et al., 1995; zit. in

WALTER 2000). Porcine Enteroviren wurden im Fluss- und Grundwasser in der Nähe einer Schweinezuchtanlage nachgewiesen (PAVMENT, 1989; zit. in WALTER, 2000).

Unter Freilandbedingungen konnten Polioviren bei winterlichen Temperaturen noch 96 Tage nach Beendigung der Abwasserversickerung nachgewiesen werden, während dies im Sommer nur bis zum 11. Tag gelang (LARKIN et al., 1976; TIERNEY et al., 1997; zit. in WALTER, 2000). Viruspersistenz ist von einer Bodenart abhängig (YEAGER, et al., 1979).

Tonhaltige Böden haben eine protektive Wirkung. Hepatitisvirus A wurde im Zeitraum von 84 Tagen in Bentonit um weniger als 90% und lehmigem Sand oder Kies zwischen 90 und 99% inaktiviert. Poliovirus 1 und Echovirus 1 hielten sich zwar ebenfalls am besten in Bentonit und Kaolinit, wurden aber in kürzerer Zeit, d.h. innerhalb von 70 bzw. 77 Tagen, um 99 % vermindert (WALTER et al., 2000).

Der obere Bodenhorizont, wo das Pflanzenmaterial abgebaut wird, ist reich an Humus. Die Huminsäuren begünstigen die Virusaggregation was einen protektiven Effekt erzeugen und damit Viren gegenüber Umwelteinflüssen stabilisieren kann (BITTON et al., 1984; zit. in WALTER 2000). Eine zunehmende Belastung mit organischen Verbindungen, z.B. über Abwässereinbringung, kann die Desorption bereits adsorbierter Viren bewirken und so die Virusmigration in das Bodenwasser ermöglichen. Proteinhaltige Pflanzenextrakte können Viren vollständig mit einer Kolloidschicht umgeben und sie von Umwelteinflüssen schützen (Walter, zit. in KONOWALCHUK et al., 1974; zit. in WALTER 2000). Da diese Pflanzenextrakte bei pH 4,5 unlöslich werden und ausflocken, und erst bei pH 7,5 wieder in Lösung gehen, ist ein protektiver Effekt der umhüllten Viren im sauren Milieu denkbar (WALTER et al., 2000). Kläranlagenabläufe sind seuchenhygienisch bedenklich insbesondere dann, wenn der Vorfluter für Badezwecke genutzt wird bzw. wenn er nach relativ kurzer Fließstrecke in ein Badegewässer mündet (LEISSNER, 1988).

Die Bodenfeuchte beeinflusst ebenfalls die Viruspersistenz. Die Virusinaktivierung geht im warmen und trockenen Boden schneller vonstatten als in einem warmen und feuchten (BITTON et al., 1984; zit. in WALTER, 2000). Unter Feldbedingungen waren Poliovirus1 und Echovirus1 während einer Trockenperiode bei Temperaturen zwischen 18 und 27 °C bis zu 8 Tage nachweisbar und während einer feuchtwarmen Periode mit mehreren Regenfällen bei Temperaturen zwischen 23,5 °C und 29 °C sogar bis zu 35 Tage. Die Bodenfeuchtigkeit begünstigt die Quellung der organischen und anorganischen Bodenbestandteile, verbessert damit die Virusadsorption durch Vergrößerung der aktiven Oberflächen und wirkt auf diese Weise protektiv gegenüber einer Thermoinaktivierung. Bei gleicher Bodenfeuchtigkeit ist die

Virusinaktivierung im feintexturierten tonigen Lehm geringer als in dem gröberen sandigen Lehm. Dieses Phänomen wurde auf einen protektiven Effekt der größeren Wasserbindungskapazität des Ton im Vergleich zum Sand zurückgeführt. Je höher der Wassergehalt wird, umso länger ist die Persistenz. Bei 23 °C und 50 °C Sättigung des Bodens kam es nach 10 Tagen zu einer über 99,9% igen Virusinaktivierung, während bei gleicher Temperatur und 100 % Sättigung nach 15 Tagen nur eine 99,9 % ige Inaktivierung zu beobachten war. Hepatitisvirus A und Poliovirus 1 waren unter diesen Bedingungen nach 20 Tagen nicht bzw. nur um 1,5 log-Stufen inaktiviert (BLANC und NASSER, 1996; zit. in WALTER, 2000).

Bei Untersuchungen im Freiland bei einer Bodenfeuchtigkeit unterhalb von 5% wurde die Inaktivierung hauptsächlich von der Temperatur bestimmt, der Virustyp spielte dabei eine untergeordnete Rolle: bei 15°C wurden diverse Virustypen innerhalb von 7, bei 27°C binnen 3 und bei 40 °C in 2 Tagen vollständig zerstört (WALTER et al., 2000).

Auch bei pflanzenpathogenen Viren besitzt die Adsorption an Tonpartikel einen protektiven Effekt. Pflanzenpathogene Viren können einige Jahre im Boden infektiös bleiben (FARRACH und BITTON, 1990; zit. in WALTER, 2000). Das Tabakmosaikvirus verlor nach 2 Wochen bei 25 °C ca. 80 % seiner Infektiosität. Niedrige Temperaturen (5 °C), ein schwaches saures Milieu und ein biologisch nur schwach aktiver Boden begünstigten seine Stabilität (KEGLER et al., 1991; zit. in WALTER, 2000). Neben der Temperatur ist zumindest beim Tabakmosaikvirus die biologische Aktivität des Bodens wichtig. Die Infektiosität geht nach 5 Wochen in biologisch hochaktiven Boden zu mehr als 80%, im biologisch schwach oder nicht aktivem dagegen zu weniger als 40% verloren.

Nach KÖHLER (1993) ist der Nachweis des Bovinen Parvovirus (Stamm Haden) in verschiedenen Böden bei einer Lagerungstemperatur von 4°C über einen Zeitraum von 44 Wochen möglich. Bei der Temperatur von 20°C bis 28 Wochen. Bei Rotaviren betrug die längste Zeitspanne des Virusnachweises 60 Wochen bei Temperaturen von 4 °C und 28 Wochen bei Temperaturen von 20 °C. Bei ECBO-Virus waren es 52 Wochen bei 4 °C und 28 Wochen bei 20 °C.

Die Tenazität, die immer in Zusammenhang mit der Virusadsorption an Bodenpartikel gesehen werden muß, hing dabei im wesentlichen von der Temperatur ab. Bei einer Temperatur von 20 °C beeinflussten Bodenzusätze wie Rindergülle und Kälberfestmist die verschiedenen Testagenzien hinsichtlich ihrer Nachweisdauer im Boden teilweise unterschiedlich stark. Die Tenazität unabhängig von der Bodenart ist im wesentlichen von der Temperatur abhängig. Die Untersuchungen von KÖHLER (1993) ergaben Unterschiede in der Tenazität der untersuchten

Testagenzien im Boden wenn Gülle vorhanden war. Bei ECBO-Virus war eine Erhöhung der Tenazität, bei Rotavirus und Bovinem Parvovirus kein Einfluß bzw. nur eine geringe Tenazität bei einer Lagerungstemperatur von 20 °C zu verzeichnen. Da bei den Untersuchungen zum Boden zusätzlich Kälberfestmist verwendet wurde, ist nicht auszuschliessen, dass sich der hohe Proteingehalt im Kälberkot gerade bei einer Lagerungstemperatur von 20°C sowohl bei ECBO-Virus als bei Rotavirus positiv auf die Widerstandsfähigkeit bzw. des Adsorptionsverhalten auswirkte. Zahlreiche Labor und Feldstudien weisen darauf hin, dass das Überleben der Viren in der Umwelt in Zusammenhang damit steht, ob sie von Partikel umhüllt werden oder an Partikel adsorbiert sind (GEBRA et al.,1975). Nach SOBSEY et al. (1987) ist die Temperatur der Hauptfaktor, der die Viruspersistenz beeinflusst, wobei eine steigende Überlebensrate der Viren bei tieferen Temperaturen vorhanden ist. Zudem beeinflusst nach deren Meinung die Bodenfeuchtigkeit das Überleben der Viren mit sinkender Überlebensrate im trockenen oder trocknenden Boden.

## 2.4 Enterobacteriaceae

Die Familie der *Enterobacteriaceae* bilden eine große Gruppe von fakultativ anaeroben, nicht sporenbildenden, gramnegativen, geraden Stäbchen. Sie sind 2-3µm lang und 0,5µm breit. Manche sind begeißelt und somit beweglich. *Enterobacteriaceae* besiedeln vorwiegend den Darmtrakt von Menschen und warmblütigen Tieren (SCHWARZ, 2003).

### 2.4.1 *Escherichia coli*

Entsprechend der Beschreibung von ROLLE et al.(1993) handelt es sich bei *Escherichia coli* um ein gramnegatives nicht sporenbildendes Stäbchen mit abgerundeten Enden. Es weist eine Länge von 2.6µm und eine Breite von 1-1,5µm auf. Die meisten Keime haben eine Kapsel und sind begeißelt. Die Keime besiedeln hauptsächlich den Darmtrakt von Mensch und Tier. Sie kommen nach Untersuchungen von WEIGEL (1995); zit. in SCHWARZ (2000) im Festmist und in Gülle in einer Anzahl von  $10^5$  bis  $10^6$  KBE/g und nach KOWAL (1985); zit. in SCHWARZ (2003) mit mehr als  $10^8$  KBE/g in menschlichen Fäkalien vor.

Nach HOFERER (2001) reduzierte sich die Zahl von Escherichia (EHEC) in Wasserbadversuch innerhalb 30 min von  $10^{10}$  KBE/ml auf  $10^9$  um 1 Zehnerpotenz. Bei *Enterococcus faecium* kam es innerhalb 30 Minuten in 55 °C bei einer Ausgangszahl  $10^9$  KBE/ml nicht zur Keimzahlreduktion, während die Zahl von *S. senftenberg* sich in dieser Zeitspanne um über eine Zehnerpotenz reduzierte.

Nach HOFERER (2001) kam es in einer Rindergülle innerhalb von 20 min bei 55 °C zu einer

Keimzahlreduktion bei EHEC um ca. 5 Zehnerpotenzen. In einer Schweinegülle waren bereits nach 15 min in 3 von 4 Proben keine EHEC mehr nachweisbar. In Schweinegülle bei einem kleineren TS-Gehalt erfolgte die Reduktion der Zahl von EHEC schneller als in Rindergülle bei einem größeren TS-Gehalt.

Nach TURNER (2002) reichen 2 Stunden für die Inaktivierung von *E. coli* im Stroh und Abfällen von Schwein bei 55 °C aus.

Im Boden liegt die Tenazität bei weniger als 10 Wochen, wobei innerhalb der ersten 10 Tagen eine Keimreduktion von bis zu 90% stattfinden kann. Bei kühler und humider Umgebung ist ein Überleben von mehreren Monaten beschrieben. Bei heißer Witterung sterben *Escherichia coli* nach LEISSNER (1988), zit. in SCHWARZ (2003) innerhalb kurzer Zeit vollständig ab.

Epidemiologisch gesehen können *E. coli*-Stämme sowohl Enteropathien als auch Septikämien auslösen. Eine Infektion kann über Vektoren, wie kontaminierte Nahrungsmittel oder direkt von Mensch zu Mensch erfolgen. Bei Erwachsenen treten häufiger Harnwegsinfektionen auf. Meist handelt es sich um Faktorenkrankheiten. *Enterohämorrhagische Escherichia coli* (EHEC) aus nicht hitzebehandelter Vorzugsmilch, die durch tierische Fäkalien kontaminiert wurde, sind nach BEUTIN (1995,1996), zit. in SCHWARZ (2003) vermehrt Ursache für schwere Nierenerkrankungen bei Kindern.

#### 2.4.2 Fäkalstreptokokken

Fäkalstreptokokken gehören zur Familie der *Enterococcaceae* und zur Gattung *Enterococcus*. Es handelt sich um grampositive, unbewegliche Bakterien, deren runde bis ovoide Zellen meist diploid, in Kettenform oder als Tetraeden vorkommen. Ihr Durchmesser beträgt ca. 2µm.

Fäkalstreptokokken gehören ebenfalls zur natürlichen Darmflora von Mensch und Tier. Charakteristisch ist das Vorhandensein des Lancefield-GruppeD –Antigens, weshalb auch oftmals die Bezeichnung D-Streptokokken verwendet wird. Die Bezeichnung Enterokokken steht als Synonym für Fäkalstreptokokken.

Hinsichtlich der Hygiene nehmen *Enterococcus faecalis* und ähnliche Enterokokken eine besondere Stellung ein, da sie im Darm und den Ausscheidungen von Mensch und Tier vorkommen. Ihnen kommt nach TISLER (1987), zit. in SCHWARZ (2003) durch ihre besondere pH-Wert und Hitzeresistenz lebensmittelhygienische Bedeutung zu. Dort gelten sie als Indikatoren für fäkalen Verunreinigungen und sind Ursache für unspezifische Nahrungsvergiftungen. Beim Tier werden sie nach ROLLE (1993), zit. in SCHWARZ (2003) primär bei unspezifischen Infektionen nachgewiesen.

Im Gegensatz zu anderen Streptokokken weisen die Fäkalstreptokokken eine hohe Tenazität in der anaeroben Faulung, der Kompostierung, der Kalkbehandlung, der Gammabestrahlung oder der Desinfektion mit Peressigsäure auf. Auch während verschiedener Klärschlammbehandlungsverfahren haben sie sich als sehr resistent erwiesen. Nach LAMBERT (2003) liegt eine Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* bei 60 °C.

Nach HOFERER (2001) kam es bei *Enterococcus faecium* in einer Rindergülle in 24 Stunden bei 55 °C bei einem Ausgangswert von  $10^7$  KBE/ml zu einer Keimzahlreduktion von 6 bis 7 Zehnerpotenzen. In einer von vier Proben war nach dieser Zeit noch ein Nachweis von *Enterococcus faecium* möglich. In einer Schweinegülle waren bereits nach 12 Stunden nur noch in zwei von vier Proben *Enterococcus faecium* nachweisbar.

Fäkalstreptokokken dienen nach LANG (1987), zit. in SCHWARZ (2003), als Indikatoren für fäkale Verunreinigungen von Trink-, Brauch- und Meerwasser. Sie sind als Indikatorkeime besonders geeignet, da sie in relativ großer Anzahl in menschlichen und tierischen Ausscheidungen vorkommen. Sie sind nach SLANETZ (1964), zit. in SCHWARZ (2003), im Abwasser und Klärschlamm immer vorhanden, dürfen jedoch in reinem Trinkwasser, auf nicht gedüngtem Boden und an Standorten ohne menschlichen und tierischen Kontakt nicht anzutreffen sein. Sie überleben außerhalb des Körpers, ohne sich zu vermehren. Sie sind im Allgemeinen gegenüber toxischen und chemischen Verunreinigungen resistenter als koliforme Keime. Wegen ihrer hohen Resistenz gegenüber Chlor sind sie gute Indikatoren für Abwasserverunreinigungen in chloriertem Wasser wie z.B. Leitungswasser. Werden sie dort nachgewiesen, kann von einer fäkalen Verunreinigung ausgegangen werden. Da sie in weitaus höherer Konzentration als pathogene Organismen vergleichbarer Tenazität vorkommen, kann bei einer Elimination von Fäkalstreptokokken erst recht von der Elimination dieser pathogenen Organismen ausgegangen werden.

Nachgewiesen werden mit dem beschriebenen Verfahren Enterokokken der Lancefield-Gruppe D, dabei exakter *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Werden diese in Abwasser nachgewiesen, kann man davon ausgehen, dass diese fäkalen Ursprungs sind.

### 2.4.3 Salmonellen

Salmonellen zählen weltweit zu den wichtigsten bakteriellen Infektionserregern bei Menschen und Tieren ROLLE et al. (2002). Die Gattung *Salmonella* wird repräsentiert durch eine einzige Art *Salmonella enterica*. Die Salmonellen sind 2-3 µm lange, plumpe, gramnegative, sporenlöse, mit einer Ausnahme in (*Serovar Galinarum*), bewegliche, peritrich begeißelte Stäbchen ROLLE et al. (1993). Sie sind morphologisch von anderen Darmbakterien wie *E. coli* nicht zu

unterscheiden. Mehr als 2000 verschiedene Salmonellenserovare können weiter nach ihrer Antigenstruktur unterschieden werden.

Im Bereich der Abwasserentsorgung gehören Salmonellen daher zu den am besten untersuchten Krankheitserregern. Sie kommen FEACHEM (1983), zit. in SCHWARZ (2003), weltweit ubiquitär in Ab- und Oberflächengewässer vor. SILLI (1990) und SCHINDLER (1991), zit. in SCHWARZ (2003), beschreiben umfangreich die Salmonellenvielfalt in Vorflutern und in kleinen Oberflächengewässern. Nach SCHMIDT (1960), zit. in SCHWARZ (2003), spiegelt das Vorkommen von Salmonellen im Abwasser die Seuchenlage der jeweiligen Bevölkerung wieder. MÜLLER (1981), zit. in SCHWARZ (2003), stellte fest, dass ab einer Siedlungsdichte von 4 000 Einwohnern regelmäßig Salmonellen im Abwasser nachgewiesen werden können. Mit Hilfe eines neuen, sensibleren Nachweisverfahrens konnte KARUNIAWATI (2000) sogar in über 70% der Abwasserproben einer konventionellen Kläranlage Salmonellen nachweisen.

Salmonellen sind außerhalb des tierischen (und menschlichen) Organismus lange lebensfähig. In offenen Gewässer, im Abwasser, in Jauchengruben, im Brunnenschlamm und auf gedüngtem Boden können sie sich wochenlang am leben halten. 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. Je trockener das Material ist, desto größer ist die Tenazität. Gegen Kälte sind sie resistent. Die Widerstandsfähigkeit gegen trockene Wärme ist größer als gegen feuchte Wärme (ROLLE et al. 1984). Für den Temperaturbereich, in dem sich Salmonellen vermehren können, werden meist 47 °C als obere und 5 °C als untere Grenze genannt. Das Optimum liegt bei 35-37 °C (SELBITZ et al., 1995; zit in KNOP, 1997). Die Hitzeempfindlichkeit von Salmonellen ist abhängig von Serovar und Substrat. Salmonellen sterben in der Regel bei 60 °C innerhalb weniger Minuten, bei 70 °C innerhalb weniger Sekunden ab (DEDIE et al., 1993; zit in KNOP, 1997). Nach ROLLE et al. (1993) sterben die Erreger bei 55 °C nach 1 Stunde, bei 60 °C nach 30 Minuten ab in Bouillonkultur bei 80°C nach 10 Minuten. Nach LAMBERT (2003) liegt die thermische Inaktivierung bei *Salmonella Anatum* bei 55°C und bei *Salmonella Bedford* bei über 50 °C-58 °C. Nach HOFERER (2001) kam es in einer Rindergülle innerhalb von 30 min bei 55 °C zu einer Keimzahlreduktion bei *Salmonella Senftenberg* um ca. 4 bis 5 Zehnerpotenzen. In einer Schweinegülle waren bereits nach 30 min in 3 von 4 Proben keine Salmonellen mehr nachweisbar.

Die weltweite seuchenhygienische Bedeutung der Salmonellose liegt in der Eigenschaft der Übertragbarkeit zwischen Mensch und Tier.

Bei diesen pathogenen Mikroorganismen erfolgt in der veterinärmedizinischen Bakteriologie eine Unterscheidung in 3 Gruppen: *Salmonella Durans*, *Salmonella Bovis* und *Salmonella Equinus*. Sie sind in der Lage, Hämolysin, Bakteriozine und autolytische Enzyme zu produzieren.

Die Verbreitung von Salmonellen in der Außenwelt findet häufig durch den Kot von Kleintieren und Vögeln statt. Die Gefährdung des Menschen besteht nach ROLLE et al.(1993), weniger in der direkten Ansteckung durch das Tier, sondern eher in der Kontamination von Nahrungsmitteln und der anschließenden Vermehrung von Salmonellen bei mangelnder Küchenhygiene. Ein interessantes Beispiel dazu ist die von HARMSEN (1954), zit. in SCHWARZ (2003), untersuchte Typhusepidemie in Stuttgart und Wien, die ihren Ursprung in der Düngung von Gemüse mit Abwässer hatte. PAHEN (1979), zit. in SCHWARZ (2003), bestimmt die minimale Infektionsdosis je nach Salmonellenspezies mit Keimzahlen zwischen  $10^5$  bis  $10^7$  KBE/ml, wobei diese in Einzelfällen auch geringer liegen könnten.

Als klinische Erscheinung kommt es bei Menschen zu fieberhaften Brechdurchfällen, die bei Personen mit einer Immunsuppression zum Tode führen können. Nach KIST (1991, 1992), zit. in SCHWARZ (2003), sind für die Erkrankungen beim Mensch hauptsächlich *Salmonella Typhimurium* und *Salmonella Enteritidis* verantwortlich, wobei von FEACHEM (1983) und TSCHÄPE (1996), zit. in SCHWARZ (2003), eine jahreszeitliche Spitze im Sommer und Herbst festzustellen ist. *Salmonella Thyphi* und *Salmonella Paratyphi* kommen hingegen äußerst selten vor.

Die klinische Erscheinungen zeigen sich bei Tieren je nach Serovar entweder als Aborte (*Salmonella Abortus Equi*, *Salmonella Abortus Ovis*), Durchfallerkrankungen, Organerkrankungen oder fieberhafte Septikämien. Im Vordergrund des Infektionsgeschehens stehen immer die latenten Infektionen mit anschließender, monatelanger unregelmäßiger Erregerausscheidung als ständige Kontaminationsquelle. Obwohl die wirtschaftliche Bedeutung im Allgemeinen nicht so groß ist, wie es bei dem Durchseuchungsgrad mancher Tierbestände und der Verbreitung der Erreger in Futtermittel anzunehmen wäre, können Salmonellen bei mangelndem Hygienemanagement im Einzelfall zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten für den Tierhalter führen. Unter anderem deshalb, weil die Rindersalmonellose bei amtlicher Feststellung als anzeigepflichtige Tierseuche behördlicherseits bekämpft werden muss. Hier können neben kostenintensiven Entseuchungsmaßnahmen auch Zwangstötungen von wertvollen Zuchttieren angeordnet werden. Die Bekämpfung der Enteritis-Salmonellosen des Menschen beruht auf die Senkung des Infektionsdrucks in den Haustierbeständen und die

Vermeidung der Kontamination in Verbindung mit der Verhinderung der Vermehrung und Anreicherung der Salmonellen im Lebensmittel (ROLLE et al., 2002).

## 2.5 *Bovines Parvovirus* (BPV)

Die Familie der *Parvoviridae* ist in drei Genera untergliedert: *Parvovirus*, *Dependovirus* und *Densovirus*. Alle Virusarten dieser Familie enthalten lineare, einsträngige DNS. Parvoviren (parvus = klein) gehören zu den kleinsten bekannten Viren (18 bis 26nm). Sie sind außerordentlich resistent gegen äußere Einflüsse und Detergentien. Entweder haben sie ein enges Wirtsspektrum und einen ausgeprägten Tropismus für die Infektion von sich teilenden Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums (Genus *Parvovirus*), oder ihre Vermehrungsfähigkeit ist von der Anwesenheit von Helferviren abhängig (BACHMANN et al., 1984; LIEBERMANN, 1992; MODROW et al., 1998, zit. in HOFERER, 2001).

Werden Tiere während des letzten Drittels der Trächtigkeit mit dem bovinen Parvovirus infiziert, überleben Feten in der Regel die Infektion und bilden einen aktiven Immunschutz aus. Bei älteren Rindern verursachen bovine Parvoviren dagegen meist inapparente Infektionen. Sie sind weltweit verbreitet. Antikörper gegen BPV lassen sich bei einem hohen Prozentsatz von Rindern nachweisen. Da nur wenige Untersuchungen über Infektionen mit bovinen Parvoviren vorliegen, lässt sich ihre Bedeutung derzeit allerdings nur schwer abschätzen. Bei Kälbern findet man Parvoviren häufig im Zusammenhang mit Mischinfektionen von Rotaviren, Coronaviren und *E. coli*, die sich als schwere Diarrhoen manifestieren (BACHMANN et al., 1984; zit. nach HOFERER, 2001).

Infektionen mit bovinen Parvoviren führen vor allem bei neugeborenen Kälbern sowie bei Feten während der ersten zwei Drittel der Trächtigkeit zu Erkrankungen bzw. Schäden. Neugeborene Kälber entwickeln schwere, wässrige Diarrhoen. In den Feten vermehrt sich das Virus in allen Organen. Bei schweren Verlaufsformen kommt es zum intrauterinen Fruchttod mit Abort (BACHMANN et al., 1984; LIEBERMANN, 1992; zit. in HOFERER, 2001)

Das bovine Parvovirus (BPV) hat einen Durchmesser von 23-25 nm und eine mittlere Dichte im CsCL-Gradienten von 1,39 g/cm<sup>3</sup>. Erythrozyten von einer Reihe verschiedener Spezies werden durch das Virus hämagglutiniert (Mensch, Meerschweinchen, Hamster, Katze). BPV vermehrt sich in schnell wachsenden Zellkulturen boviner Herkunft mit einem gut ausgeprägten cpE (BACHMANN et al., 1984; zit. in HOFERER, 2001).

Parvoviren besitzen eine große Stabilität gegenüber Chloroform- und Ätherbehandlungen sowie Hitze (56°C) und Säure (pH 3-9) (ABINATI et al., 1961; BACHMANN et al., 1984; LIEBERMANN, 1992; zit. in HOFERER, 2001). Nach BRAUNIGER (2000) ist das Bovine Parvovirus sehr resistent gegenüber trockener Hitze bei 100°C. BRAUNIGER (1994) hat die thermische Stabilität des Bovinen Parvovirus Stamm Haden bei feuchter Hitze im Wasser mit standardisierter Härte bei 75 °C bis 90 °C bestimmt. Nach MONTEITH et al. (1986) wird Bovines Parvovirus in Ziegengülle bei 70 °C in 30 min nicht inaktiviert. Bei Versuchen zur Temperaturstabilität von bovinem Parvovirus gegenüber feuchter Wärme im Temperaturbereich von 75 °C bis 90 °C wurde festgestellt, dass die Resistenz sehr stark von dem Milieu (Aqua dest., Wasser standardisierter Härte (WSH), Plasma) abhängt, in dem die Viren beim Erhitzen suspendiert sind (BRÄUNINGER, 1994; zit in HOFERER, 2001). Nach ROBERTS et al. (2000) liegt die Inaktivierung des Bovinen Parvovirus bei konzentriertem Factor VIII in trockener Hitze und 80 °C bei 72 Stunden. ROBERTS (2000) meint, dass eine Resistenz des Bovinen Parvovirus vom Virustyp und vom Medium abhängig ist. SPILMANN et al (1987) haben bei der Pasteurisierung von tierischen Abfällen eine Inaktivierung des Parvovirus bei 70 °C in 30 min um 0,72 Zehnerpotenz ( $0,72 \log_{10}$ ) erzielt. Nach MARTENS (2003) wurde Tabak-Mosaik-Virus in Bioabfällen bei 70 °C und 60 min Einwirkzeit nicht inaktiviert.

## 2.6 *Ascaris suum*

Ein Weibchen des Schweinespulwurms kann nach der Beschreibung von BOCH (1992), zit. in SCHWARZ (2003), bis zu  $1,6 \times 10^6$  Eier täglich ausscheiden. Die Eier sind 65-85µm x 40-60µm groß, dickschalig und haben mikroskopisch betrachtet eine braune Farbe. Charakteristisch für Askariden sind hellbraune bis gelbe, glasige Buckel an der Oberfläche der Eihülle.

Die Embryonalentwicklung im Freien endet bei optimalen Bedingungen nach ca. 24 Tagen mit der Bildung des zweiten Larvenstadiums im Ei. Bereits wenige Stunden nach der oralen Aufnahme entwicklungsfähiger Eier schlüpfen die Larven im Dünndarm, bohren sich in die Mesenterialvenen ein und gelangen durch Pfortader, Leber, Lebervene, Hohlvene und rechtes Herz in die Lunge. Im Kapillargebiet der Lunge bohren sie sich durch die Alveolen, gelangen mit dem Bronchialsekret über Bronchien und Trachea zum Pharynx, werden abgeschluckt und siedeln sich endgültig im Dünndarm an.

Über die ausgeprägte Tenazität der Askarideneier hinsichtlich hoher pH-Werte berichten SCHUH (1984) und WASMUS (1986), zit. in SCHWARZ (2003).

Weitere Autoren wie MICHELS (1986) und POHLIG (1987) führten Untersuchungen zur chemischen und thermischen Resistenz der Eier von *Ascaris suum* durch. Für die Eliminierung der Testmikroorganismen wurde ein Zusammenhang zwischen Temperatur und pH-Wert festgestellt. Die Inaktivierung erfolgte bei niedrigen Temperaturen um 37 °C und bei pH-Werten von 12,5.

BLACK (1982), zit. in SCHWARZ (2003) stellte fest, dass die Infektionsfähigkeit von *Ascaris suum* Eiern bei mesophiler, anaerober Schlammfäulung nicht beeinträchtigt wird. In einem Versuch nach O'DONNEL (1984), zit. in SCHWARZ (2003) war auch nach zweijähriger Lagerung von Faulschlämmen keine ausreichende Inaktivierung zu erreichen.

Spulwurmeier haben im Temperaturbereich von 46 °C – 48 °C erst nach einer Einwirkungszeit von mehreren Tagen ihre Entwicklungsfähigkeit verloren, bei Temperaturen > 50 °C sterben sie jedoch innerhalb kurzer Zeit ab.

Diese hohe Widerstandsfähigkeit macht sie nach Erfahrungen von LANG (1987), LEWIS (1984) und FORSTNER (1970), zit. in SCHWARZ (2003) zu idealen Indikatororganismen, um die Effizienz verschiedener Verfahren zur Abtötung parasitärer Dauerstadien zu überprüfen.

## 2.7 Physikalische Methoden der Bodendesinfektion

Bei der Anwendung von Hitze zur Bodenentseuchung bestimmen die Temperatur und ihre Einwirkungsdauer den Erfolg der Verminderung unerwünschter Mikroorganismen im Boden. Abtötungstemperaturen sind für einzelne Krankheitserreger zu ermitteln. Dabei schwanken die Angaben über die ebenso wichtige Einwirkungsdauer der Hitze sehr stark oder fehlen ganz. Der Erfolg einer Entseuchung ist innerhalb gewisser Grenzen proportional dem Produkt aus Temperatur und Zeit. Das bedeutet, dass bei einer niedrigen Temperatur und langer Einwirkungsdauer das gleiche Abtötungsergebnis erzielt werden kann, wie bei hoher Temperatur und kurzer Einwirkungsdauer. So verlieren Angaben über Abtötungstemperaturen an Bedeutung, wenn nichts über die Einwirkungsdauer ausgesagt ist (HEGE et al., 1972).

Leider fehlen in der Literatur Daten bezüglich Absterbetemperaturen von Bodenorganismen bei einer bestimmten Einwirkungsdauer. Eine enger abgegrenzte Darstellung von Absterbetemperaturen einiger Bodenorganismen gibt BOLLEN (1969), zit. in HEGE et al. (1972), der eine Behandlungsdauer mit der jeweiligen Temperatur von 30 min zugrunde legt. Beim Vergleich zeigen sich Pflanzenkrankheitserreger empfindlicher als ein Teil der Saprophyten. Innerhalb der

pilzlichen Krankheitserreger treten große Unterschiede in der Hitzeresistenz auf. Die Fäulnis verursachenden Arten von *Phytium*, *Rhizoctonia* und *Botrytis* sind nach dreißigminütiger Einwirkung von 55 °C abgetötet. Auch die morphologische Form der Pilze kann für die Absterbetemperatur mitbestimmend sein. *Verticillium dahliae* unterscheidet sich zum Beispiel von *Verticillium albo-atrum* durch das Ausbilden kleiner schwarzen Sclerotiten. Die Differenz in der Absterbetemperatur beider Formen beträgt wenigstens 5 °C. *Rhizoctonia* kann dagegen, trotz vorhandener Sklerotienformen, nur 52 °C aushalten. *Penicillium* und Aspergillusarten, von denen viele als Antagonisten zu pathogenen Pilzen auftreten, sind ziemlich hitzeresistent. Parasitäre und saprophage Nematoden sterben bei Temperaturen unten 50 °C ab, nur ein Teil von *Pratylenchus* konnte 55 °C überleben. Sporenbildende Bakterien sind ausgesprochen resistent gegenüber Hitze und können Temperaturen bis 100 °C ertragen. Darunter ist besonders *Bacillus subtilis* von Bedeutung, bei dem nachgewiesen werden konnte, dass bestimmte Stämme gute Voraussetzungen für die biologische Bekämpfung von *Rhizoctonia* bieten. Phytopathogene Bakterien, die eine Behandlung bei 70 °C für die Dauer von 30 min überleben, sind bisher nicht bekannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der größte Teil der Erreger von Pflanzenkrankheiten bei 70 °C abgetötet wird, vorausgesetzt, dass die Behandlungsdauer ausreichend ist. Das ist auch der Grund für Bestrebungen, bei der Bodenentseuchung mit Temperaturen unter 95 °C-98 °C auszukommen. Dann bliebe ein Teil der saprophytischen Organismen am Leben und könnte den Pflanzen durch Antagonismen zu neu eingedrungenen Krankheitserregern einen gewissen natürlichen Schutz geben. Ebenso blieben die biologischen Wirkungen der Mikroflora weitgehend erhalten. Ein Problem stellen allerdings die Viren dar, die zum Teil erst bei sehr hohen Temperaturen absterben, z.B. Tomatenmosaikvirus – bei über 80 °C und Tabakmosaikvirus – bei über 90 °C.

### 2.7.1 Bodendämpfung

Die Anwendung von Dampf für die Sterilisation des Bodens ist die wirksamste Methode zur Vernichtung von Schädlingen und Krankheiten, gleichgültig, ob es sich dabei um tierische oder pilzliche Schädlinge oder um Viren handelt. Allerdings ist es zugleich die kostspieligste Methode (MORRIS, 1956).

Man wendet Wasserdampf an, der durch Sieden von Wasser in einem geschlossenen Dampfkessel erzeugt wird. Es bildet sich über der Flüssigkeit eine Dampfströmung, deren Dichte zunimmt, bis ein Gleichgewicht zwischen dem Druck des Dampfes und dem Dampfdruck des Wassers herrscht. Dann kann kein weiteres Wasser mehr Verdampfen. Jeder Dampf, der

mit dem Wasser in Verbindung bleibt, ist bei Erreichen des Gleichgewichtszustandes Sattedampf. Bei zunehmendem Druck steigt die Sattedampftemperatur. Enthält ein Raum weniger Dampf als er bei gegebener Temperatur aufnehmen könnte, entsteht ungesättigter Dampf, der aber nur ungesättigt bleibt, wenn er nicht mehr mit seiner Flüssigkeit in Verbindung steht. Heißdampf oder überhitzter Dampf, wie er bei der Bodendämpfung verwendet wird, ist ungesättigter Dampf. Der größte Teil der Pflanzenkrankheiten wird durch pilzliche Erreger verursacht (HEGE et al. 1972). Man dämpft daher Böden um sie von Pilzen frei zu machen.

### 2.7.2 Bodenerhitzung mit Propangas

Die Bekämpfung der bodenbürtiger Pflanzenkrankheiten und Schädlinge durch Erhitzen des Bodens ist keine neue Erfindung. Schon Ende des 19. Jahrhunderts wurde in den USA von dieser Maßnahme zur Entseuchung von Kulturböden berichtet. Es entwickelten sich parallel zwei Verfahren um dem Boden die entsprechende Wärme zuzuführen: das Abbrennen von Pflanzenrückständen auf dem Boden und das Rösten des Bodens in einer offenen Flamme oder in einer Pfanne, in die der Boden geschaufelt wurde oder durch das Dämpfen des Bodens mit Wasserdampf.

Um 1920 entstanden interessante Bauarten von Bodenröstern, die den Boden auf verschiedenste Arten erhitzen. Bei einem Apparat wurde die Erde in einer rotierenden Trommel einer offenen Flamme ausgesetzt, wobei sie eine Temperatur von 80 °C erreichte.

Bei allen Röst- und Direktbefeuerungsverfahren schützt die Bodenfeuchte vor Überhitzung und Zerstörung der organischen Masse (HEGE, 1972). Die Nachteile des Abflammens bestehen in einem relativ hohen Energieverbrauch und CO-Ausstoss und einer Gefährdung der bodenbewohnenden Nützlinge ist nicht auszuschließen.

Außerdem ist im Umgang mit Gas besondere Vorsicht geboten.

### 2.7.3 Bodenerhitzung mit Sonnenenergie unter Anwendung der Solarfolien

Die Bodensolarisation ist das Abdecken der Bodenflächen mit einer schwarzen Plastikfolie, wobei Temperaturen bis auf 60 °C ansteigen können. In der Folge trieben aus Samen junge *Cotoneaster dammeri* aus, die aber leicht zu entfernen waren. Es wurde eine schwarze PE-Folie 100 MY benutzt. Die Maße der Folie betragen: 50 x 3 Meter, Dicke: 0,1 mm. Zur Befestigung am Boden dienten Drathhaken und mit Kies gefüllte Silosäcke. Letztere sorgten für eine lückenlose Abdichtung. Um ein Abrutschen der Säcke an der steilen Böschung zu vermeiden, mussten sie mit einem Seil angebunden werden. Die Temperatur unter der Folie und in 10 cm Bodentiefe

wurde mit je einer Messsonde überwacht (Datenlogger OPUS) und mit Sonden ausserhalb der Folie verglichen. Bei Beschädigungen (Marderbiß, Umwetter) wurde die beschädigte Stelle mit einer neuen Folie überdeckt, der Zeitaufwand dafür war gering, weil das Befestigungsmaterial bereits am Ort war. Unter der Folie wurden an Sommertagen Temperaturwerte bis 60 °C erreicht. Die Bodensolarisation ist eine kostengünstige Methode um den Wiederaustrieb von *Cotoneaster dammeri* zu verhindern. Nachteilig ist die verhältnismässig lange Dauer der Anwendung der Folien. Sie ist ungeeignet für sehr schattige Standorte und Böschungen mit Hindernissen (Bäume, Büsche). Die Bodensolarisation ist eine Bodenentwesungsmethode, die zuerst von KATAN (1976) für steuernde „Soilborne“-Krankheitserreger und Unkräuter beschrieben wurde. Die Solarisation des Bodens hat einen geringen negativen Einfluss auf chemische, physikalische oder mikrobielle Eigenschaften des Bodens (CHEN et al., 1991; zit. in MARISKA C.A. VAN LOENEN, 2002). Diese relativ neue Desinfektionstechnik wurde als nicht chemische Alternative zu Methylbromid betrachtet (UNEP, 1998; zit. in MARISKA C.A. VAN LOENEN, 2002). Erfahrungen der Solarisation des Bodens zur möglichen Inaktivierung von Fäkalkeimen und Krankheitserregern tierischer Herkunft liegen bisher in der Literatur nicht vor.

#### 2.7.4 Bodenerhitzung mit Mikrowellen

Unter Mikrowellen wird eine elektromagnetische Strahlung verstanden, deren Wellenlänge im Zentimeter- und Milimeterbereich liegt.

Die Mikrowellenerwärmung setzt sich aus Generatoren, Leitungen Hohlleitern und Energieüberträgern zusammen. Die für den Erwärmungsprozess notwendige Energie wird von einem Röhrengenerator geliefert. Das Mikrowellengerät besteht in der Regel aus einer abgeschlossenen Bestrahlungskammer, in welcher sich das zu erwärmende Gut befindet (BUTZ, 1993).

Eine Möglichkeit der Pasteurisierung von Flüssigmist besteht (außer der direkten Erhitzung) in der Anwendung von Mikrowellen. In einer Versuchsanlage (11 kW, 2450 MHz) konnten von BÖHM et al.(1984) sowie von NIEDERWÖHRMEIER et al. (1986), zit. in SOLDIERER (1991) bakterielle, parasitäre und virale Krankheitserreger zuverlässig inaktiviert werden.

Mikrowellen wurden benutzt zur Inaktivierung von Viren im Flüssigmist (KUHLMANN, 1982). Mikrowellen wurden auch zur Abtötung von Krankheitserregern im Klärschlamm verwendet (BUTZ, 1993).

Nach MOOSMANN et al., 1986 (zit. in BUTZ, 1993) werden freilebende Erdnematoden nach einer Mikrowellenbehandlung des Erdreichs, wobei Temperaturen zwischen 75 °C und 90 °C erreicht werden, abgetötet.

Nach VELA et al., 1976; KOCH et al., 1982; HOESCHLE, 1984; BENZ, 1986, zit. in BUTZ (1993) wird ein weiteres Anwendungsgebiet für Mikrowellen in der Landwirtschaft gesehen. Hier sollen die Mikrowellen durch direkte Bestrahlung des Ackerbodens Unkraut und Unkrautsamen sowie tierische Schädlinge und deren Dauerformen vernichten.

Es ist wahrscheinlich, dass durch die direkte Bestrahlung des Bodens auch tierpathogene Keime abgetötet werden. Bisher fehlen allerdings wissenschaftliche Veröffentlichungen zu dieser Problematik.

LECHOWICH et al., (1969), zit. in KUHLMANN (1982) kommen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass durch Mikrowellen allein keine Abtötung von *Streptococcus faecalis* oder *Saccharomyces cerevisiae* in einer Suspension herbeigeführt werden kann. Sie sei allein auf die Hitze zurückzuführen, die durch die Mikrowellen in der Suspension erzeugt wird.

MAHNEL et al., (1981) zit. in KUHLMANN (1982) führten Untersuchungen zur Thermoinaktivierung von Virus mit Mikrowellen durch und stellten fest, dass bei Erwärmung auf 45-50°C bei keiner der mit Mikrowellen behandelten Virusarten deutliche Verluste auftreten. Im einzelnen werden nach diesen Angaben die vorgegebenen Virustiter von Paramyxovirus bei Temperaturen um und bis über 60 °C, Reo- und Sindbis-Virus sowie Picornavirus, vor allem aber das Herpesvirus bei der Erhitzung auf Temperaturen von 54-57 °C und bovinem Parvovirus bei einer vergleichsweise hohen Temperatur von 95 °C (Einwirkungsdauer 60 s) reduziert.

### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material und Methoden

##### 3.1.1 Beschreibung der Laboranlage

Anwendung des Injektorbrenners in einer halbtechnischen Versuchsanlage

Prinzipieller Aufbau

Die manuell zu betätigende Anlage besteht aus einer Thermokammer, zwei Laufschienen, zwei Transportketten, einer Stahlwanne und einem Trägergestell.

Thermobox

An einem Stahlprofilrahmen, geschweißt und verzinkt, ist der Injektorbrenner angebracht und gegen die Umgebung mit hitzebeständigem Material isoliert. Als Außenverkleidung dient verzinktes Stahlblech. Beide Injektorbrenner sind mit Schnellanschlüssen ausgestattet und werden mit handelsüblichem Propangas sowie einem Kompressor betrieben.

### Trägergestell mit Laufschielen

In einem Trägergestell mit Transportketten ist eine sog. „Testwanne“ integriert. Über eine Kurbel für den manuellen Antrieb kann die „Testwanne“ durch die Propangasflamme des Injektorbrenners gezogen werden.

### Testwanne

Die Stahlblechwanne wurde in verzinkter Ausführung (700 x 700 x 30mm) zur Aufnahme des zu erhitzenden Bodens hergestellt.

Zum Betrieb der Anlage wird eine handelsübliche Propangasflasche (Füllmenge 33 kg) und ein Kompressor mit einem Luftvolumen von mind. 600 l/min bei einem Druck von ca. 4,0 bar benötigt.

### Funktionsprinzip:

Das Bodenmaterial wird in einer Testbodenwanne dem Injektorbrenner zugeführt und erhitzt (Heizung mit Propangas).

Die Eindringtiefe der Hitze und damit die Erwärmung der Bodenpartikel wird über die Laufgeschwindigkeit der Transportketten manuell reguliert.

In Tabelle 3 sind die Versuchsvarianten aufgelistet.

Tabelle 3: Versuchsvarianten des halbtechnischen Versuches:

1. Biologische	2. Technische Parameter Parameter	3. Bodenphysikalische Parameter Parameter
<i>Salmonellen</i> (mittelschwer)	Injektorbrenner:	Sandiger Lehm
<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> Gehalt)	-Variation der Schichthöhe -Variation der Durchlauf - Geschwindigkeit -Variation der Temperatur	Sandboden (leicht) Variation des TS-Gehaltes (hoher und geringer TS-
<b>Konzentration:</b> 10 <sup>8</sup> KBE/g Boden 10 <sup>4</sup> KBE/g Boden		
Parvo-Viren Ascaris suum mit „Keimträgern“		

### 3.1.2 Beschreibung des „BVS-Gerätes“

Im Rahmen der Erarbeitung einer praktikablen und zuverlässigen Methode zur Bodendesinfektion wurde das „BVS“-System unter praktischen Bedingungen im Feld (Ackerboden) untersucht. Das Gerät wurde ursprünglich zur Sanierung von Böden bzw. zur Eliminierung von Unkräutern, Samen und Nematoden entwickelt (Abb.1).



Abb. 1: „BVS-Bodensanierungsgerät“ mit Zugmaschine in Vorbereitung zum praktischen Einsatz

In wieweit die Fäkalflora und andere Mikroorganismen durch die Hitzeeinwirkung bei Einsatzes dieses Systems beeinflusst werden, galt es in den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zu erarbeiten.

Der Erfolg des „Hygienisierungseffektes“ durch das „BVS-System“ wurde anhand der Reduzierung bzw. Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren überprüft.

In insgesamt 4 Untersuchungsreihen wurden zu unterschiedlichen Terminen und den dabei jeweilig vorherrschenden Witterungsbedingungen die praktischen Untersuchungen auf einem Feld am Stadtrand einer süddeutschen Großstadt durchgeführt. Das Feld wird von einer Staudengärtnerei bewirtschaftet. Dementsprechend werden dort neben Rosen und Stauden eine Vielzahl der unterschiedlichsten Bäume und Sträucher herangezogen.

Während der Versuche zur Ermittlung des Einflusses des „BVS-Systems auf in den Boden eingebrachter Fäkalkeime wurde zu Beginn der Untersuchungen ein Versuchsfeld von ca.1,40 m Breite und ca. 30 m Länge vorbereitet, indem diese Fläche mit einer üblichen Ackerfräse aufgelockert wurde (Abb. 2).



Abb. 2: Mit einer Ackerfräse zur „Bodendesinfektion“ vorbereitetes Feld.

Das Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem („BVS-Gerät“) wurde von der Firma „Pedosan“ entwickelt. Es ist ein mobiles Fahrzeug mit 1,4 m Breite und zunächst konzipiert für den Einsatz im Freiland. Die Arbeitsweise des „BVS“ ist rationell, sehr umweltfreundlich. Es gliedert sich in folgende Arbeitsschritte:

- 1 Von großer Bedeutung für den erfolgreichen Einsatz des thermischen Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem ist das Lockern des zu behandelten Bodens. Dies erfolgt durch 3 am Gerät angebrachte schnell laufende Umkehr-Bodenfräsen mit variabler Tiefeinstellung von 0-20 cm (Abb. 3).



Abb. 3: Umkehrbodenfräse mit Rotation gegen die Arbeitsrichtung zur besseren Zerkleinerung der Bodenpartikel bei variabler Tiefeneinstellung

- 2 der feinkrümelige Boden wird durch die Schneidmesser der Umkehr-Bodenfräse auf ein geschlossenes Edelstahlscharnier-Transportband geschleudert und über eine Abzieheinrichtung in gleichmäßiger Höhe verteilt.
- 3 danach durchläuft der Boden eine Thermokammer in der er in nur wenigen Sekunden auf eine durchschnittliche Temperatur von ca. 70 °C und mehr erhitzt wird.



Abb. 4: Thermokammer, in der die Bodenpartikel mit Hilfe der Umkehrfräsen geschleudert werden und somit hohen Temperaturwerten ausgesetzt sind

- 4 Die Thermokammer kann von einer auf die Aufnahmebreite abgestimmten Anzahl von Injektorbrennern auf eine Temperatur von ca. 800 °C – 1000 °C erhitzt werden. Als Brennstoff dient umweltfreundliches und auf dem Markt erhältliches Propangas.
- 5 Nach dem Verlassen der Thermokammer fällt der erhitzte Boden „auf den Rücken“, so dass ein nochmaliges Durchdringen der Hitze erfolgt und zu einem hohen Abtötungsgrad der Mikroorganismen beitragen kann.



Abb. 5: Erhitzter Boden mit starker Rauchentwicklung



Abb. 6: Temperaturwerte in den oberen Bodenhorizonten (1-15 cm) bis 90 °C

Mit der Anlage ist eine Flächenleistung, je nach Bodenbeschaffenheit (trockener, lockerer Boden) von ca. 2000 m<sup>2</sup>/Tag möglich. Dabei wird vom Einschichtbetrieb und einer Bearbeitungstiefe von 10 cm ausgegangen.



Abb. 7: Überprüfung der Eindringtiefe der Bodenfräse und der Bodentemperaturwerte

### 3.2 Bakteriologische Untersuchungen

#### 3.2.1 Gesamtbakterienzahl bei 37 °C (GBZ)

Zur Vorverdünnung wurde 20g Probe in 180 ml Natriumchlorid (0,9 %-ige Kochsalzlösung) eingewogen und ca. 20h bei 4 °C auf den Schüttler gebracht. Nach ausreichender Durchmischung wurde je 1ml der Probe in geometrischer Reihe bis zur Verdünnungsstufe  $10^7$  jeweils 9 ml NaCl-Lösung pipettiert. Anschließend wurde jeweils 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe auf zwei parallele Standard-I-Agarplatten (Merck, Art. Nr. 7881) pipettiert und mit einem ausgeglühten Drahtspatel bzw. Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt, bei 37 °C 24 h bebrütet (Koch'sches Oberflächenverfahren).

Augezählt wurden die Platten, auf denen 50 - 250 (mindestens 30 - 40) Kolonien gewachsen sind. Aus beiden parallelen Platten wird der Mittelwert errechnet und auf 1g (0,1 ml) der Probe bezogen.

#### 3.2.2 *Escherichia coli*

Probenaufbereitung (20 g) und Vorverdünnung wie unter Pkt. 3.2.1

Der Nachweis der *E. coli* bzw. Fäkalcoliformen erfolgt quantitativ mit Hilfe des "Most-Probable-Number" (MPN)-Verfahrens. Dazu wird eine Verdünnungsreihe (1 ml der Vorverdünnung in 9 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung in geometrischer Reihe bis zur Verdünnungsstufe  $10^6$  bzw.  $10^7$ ) angesetzt. Anschließend erfolgt zur Anreicherung aus jeder Verdünnungsstufe die Überimpfung

von je 1 ml in drei parallele Röhren MUG-Laurylsulfat-Bouillon (Merck, Art. Nr. 12588). Die Inkubation erfolgt 48 h bei 37 °C. MUG-Spaltung unter Fluoreszenzentwicklung (erkennbar an einer hellblauen Fluoreszenz unter langwelligen UV-Licht bei 366nm) sowie Indolbildung erfolgt bei positivem Nachweis.

Zur Fluoreszenzablesung werden alle positiven "Gasbildner-Röhren" mit 0,5 % 1 n NaOH realkalisiert (dies ist notwendig, da einige Stämme von *E. coli* aufgrund stärkerer Säurebildung die Fluoreszenzintensität mindern). Zum Indolnachweis werden die MUG-positiven Ansätze mit 0,5 ml Kovac's Reagenz (Merck, Art. Nr. 9293) überschichtet. Rotfärbung des Kovac's Reagenz aufgrund der Indolbildung gilt bei *E. coli* als positiv.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der MPN-Tabelle.

### 3.2.3 *Enterococcus faecalis*

Probenaufbereitung (20 g) und Vorverdünnung wie bei den Mikroorganismen zuvor beschrieben. Der Nachweis der Fäkalstreptokokken erfolgte auch hier quantitativ mit Hilfe des „Most-Propable-Number“(MPN)-Verfahrens. Dazu wurde wie bei dem quantitativen Nachweis von „*E. coli*“ (siehe oben) eine Verdünnungsreihe (1 ml der Vorverdünnung in 9 ml 0,9 %-ige-NaCl-Lösung in geometrischer Reihe bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-7}$ .) angesetzt. Zur Anreicherung der Fäkalstreptokokken erfolgte dann aus jeder Stufe der Verdünnungsreihe die Überimpfung von jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe parallel in drei Röhren Azid-Glukose (AD)-Bouillon (Merck, Art. Nr. 1590) à 9 ml, Inkubation 37 °C für 48 h. Die enthaltene Konzentration von Natriumazid unterdrückt das Wachstum von gramnegativen Bakterien. Es kommt somit zur selektiven Vermehrung der grampositiven Fäkalstreptokokken, was durch eine Trübung der sonst klaren, gelblichen Bouillon deutlich wird. Aus jeder hergestellten Verdünnungsstufe (3 Parallelen) der bebrüteten AD-Bouillon wurde eine Öse auf Kanamycin-Äsculin-Azid (KAA)-Agar (Merck, Art. Nr. 5222) ausgestrichen. Die Agarplatten werden auf den Rückseiten so markiert, dass auf jeder Platte drei Felder zu erkennen sind. Beim Ausstreichen werden dann jeweils die drei parallelen Ansätze einer Verdünnungsstufe auf je eines der drei Felder der gleichen Platte ausgestrichen und 48-72 h bei 37°C inkubiert. Stichprobenweise wurde von den gewachsenen Kolonien Reinkulturen angezüchtet und es erfolgte die Agglutination mit Phadebact Strep D Test (Innogenetics GmbH, Art. Nr. 5586-12) als serologischer Nachweis. Die Anzahl der im Grenzbereich des Wachstums nachweisbaren positiven Parallelansätze von drei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurden zum Erstellen eines 3-stelligen MPN-Codes herangezogen.

Die Auswertung erfolgte anhand der korrigierten MPN-Tabelle nach J. C. d Man.

### 3.2.4. *Salmonella Senftenberg*

#### 3.2.4.1 Qualitative Bestimmung

Zur Voranreicherung wurden 50 g Erde in 450 g gepuffertes Peptonwasser eingewogen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 0,1 ml dieser Voranreicherung wurden anschließend in 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon überführt, 24 h bei 37 °C und 43 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Ausstreichen der Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillons auf Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar) und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) und bei 37 °C über 24 h inkubiert. Auf dem BPLS-Agar bilden sich blassrosafarbene und durchscheinende Kolonien. Die Bakterienkolonien, die auf dem XLD-Agar schwärzlich erscheinen, gelten als "verdächtig" für Salmonellen. Diese verdächtigen Bakterienkolonien werden auf Standard I-Agar, BPLS- und XLD-Agar mittels eines Drei-Ösen-Ausstrichs vereinzelt und anschließend erneut bei 37 °C 24 h lang bebrütet. Bestätigt sich der Verdacht auf Salmonellen durch die morphologische Auswertung der Bakterienkolonien, erfolgt die Verifizierung des Befundes durch Bestimmung der Antigenstruktur des Salmonellen-Serovars mittels Objektträgeragglutination.

#### 3.2.4.2 Quantitative Bestimmung

Probenaufbereitung (20 g) und Vorverdünnung wie bei den Mikroorganismen zuvor beschrieben. Bei den „Keimträgerversuchen“ wurden die jeweiligen Keimträger in 9 ml Natriumchlorid (0,9 %-ige Kochsalzlösung) verbracht und ca. 20 h bei 4 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte beim quantitativen Nachweis der Salmonellen mittels der MPN-Technik die Herstellung einer Verdünnungsreihe, als Nährbouillon wurde gepuffertes Peptonwasser (9 ml) verwendet wobei die drei Parallelen in doppelter Ausführung angefertigt wurden um sie bei 37 °C und bei 43 °C 24 Stunden bebrüten zu können. Aus dieser sog. „Voranreicherung“ wurden jeweils 0,1 ml in eine sterile Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon pipettiert. Das in Rappaport-Bouillon enthaltene Malachitgrün und Magnesiumchlorid sowie die Inkubation bei 43 °C hemmen das Wachstum der normalen Darmflora und erlauben Salmonellen eine ungehinderte Vermehrung. Bakterienwachstum ist in der sonst klaren, blauen Lösung durch eine Trübung zu erkennen.

Aus der Selektivanreicherung wurden anschließend von allen Verdünnungsstufen bei den mindestens eines der drei Reagenzgläser trüb gefärbt war, Parallelausstriche angefertigt, wobei die Agarplatten zu diesem Zweck in je drei gleich große Abschnitte unterteilt wurden. Diese erfolgten auf XLD- und BPLS-Agar. Die Inkubation der Selektivplatten erfolgte 24 Stunden bei 37°C. Ergaben sich daraus salmonellenverdächtige Kolonien (blassrosa auf BPLS-Agar,

schwarze Kolonien auf XLD), wurde von einer verdächtigen Kolonie ein „Drei-Ösen-Ausstrich“ auf Standard-I-Agar angelegt, um damit eine Reinkultur zu erhalten. Danach erfolgte eine weitere Inkubation 24 Stunden bei 37 °C. Der Befund kann 20-24 Stunden später verifiziert werden, indem die Antigenstruktur des Salmonellen-Serovar durch Objektträgeragglutination bestimmt wird.

Die Anzahl der im Grenzbereich des Wachstums nachweisbaren positiven Parallelansätze von drei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurden zum Erstellen eines 3-stelligen MPN-Codes herangezogen.

Die Auswertung erfolgte anhand der korrigierten MPN-Tabelle nach J. C. d Man.

### 3.3 Virologische Methoden

#### 3.3.1 Zellkulturen

BPV<sup>1</sup> wurde auf bovinen embryonalen Lungenzellkulturen (BEL) im Kultivierungsmedium DMEM + 10 % FBS gezüchtet.

<sup>2</sup> und <sup>3</sup> (seh Seite 62)

Wasserbad (37 °C)

Zentrifuge<sup>4</sup>

Mikroskop<sup>5</sup>

Brutschrank<sup>6</sup>

Zentrifugenröhrchen (50 ml)<sup>7</sup>

Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium (DMEM, siehe Anhang)<sup>8</sup>

Foetales Kälberserum (FBS 126L)<sup>9</sup>

nichtessentielle Aminosäuren (NEA)<sup>10</sup>

Zellkulturflaschen (50 ml/24 cm<sup>2</sup> <sup>11</sup> + 200 ml/80 cm<sup>2</sup> <sup>12</sup>)

Versen -Tripsin-Lösung (0,125 %, 37 °C, siehe Anhang)

Das Auftauen erfolgte jeweils möglichst rasch bei 37 °C im Wasserbad. Nachdem die gefrorene Zellsuspension auf ein erbsengroßes Stück zusammengeschmolzen war, wurde der gesamte Inhalt des Einfrier cups in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 30 ml Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) und einem Zusatz von 10% foetalem Kälberserum gegeben. Nachdem die Zellsuspension vollständig geschmolzen war, schloss sich eine Zentrifugation bei 175 g / 25 °C für 7 min an. Das Medium wurde nun möglichst vollständig abgezogen und das Zellpellet in 5 ml DMEM mit einem Zusatz von 10% FBS vorsichtig resuspendiert. Diese Virussuspension

wurde nun in eine kleine Zellkulturflasche (50 ml) verbracht und im Brutschrank (37 °C, 4,5 % CO<sub>2</sub>) bis zur Entstehung eines konfluenten Zellrasens bebrütet. Die Zellen wurden für die spätere Verwendung zur Virusvermehrung und -titration in mittlere Zellkulturflaschen (200 ml) umgesetzt. Dazu wurde das Zellkulturmedium aus der Flasche entfernt, der Zellrasen mit 2 ml Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %, 37 °C) gespült und erneut 1 ml Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %, 37 °C) auf die Zelle gegeben. Nun erfolgte eine Inkubation von 5 bis 20 min im Brutschrank bis zum Abkugeln und Lösen der Zellen. Die abgelösten Zellen wurden in 15 ml des entsprechenden Mediums (siehe unten) vorsichtig suspendiert und in mittlere Zellkulturflaschen überimpft. Die weitere Verwendung der Zellen fand dann statt, wenn eine Konfluenz des Zellrasens erreicht war.

### 3.3.2 Virusvermehrung

Die Vermehrung von Bovinem Parvovirus<sup>1</sup> (Stamm Haden) erfolgte auf primären bovinem embryonalen Lungenzellkulturen (BEL-Zellen). Das Anzuchtmedium für diese Zellen bestand aus DMEM mit 10% FBS.

Für die Virusvermehrung wurde folgendes benötigt:

DMEM (37 °C)

FBS (37 °C, siehe Anhang)

Gewebekulturschalen<sup>13</sup>

Brutschrank (37 °C, 4,5 % CO<sub>2</sub>)

Zentrifuge<sup>14</sup>

Zentrifugenröhrchen (50 ml + 15 ml<sup>15</sup>)

Zur Virusvermehrung wurden die BEL-Zellen zunächst in Gewebekulturschalen mit oben beschriebenem Medium bis zur Konfluenz vermehrt. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellrasen jeweils mit 5 ml einer auf 37 °C vorgewärmten phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) zweimal vorsichtig gewaschen. Nun wurde jeweils 1 ml Virussuspension auf die Zellen gegeben, die Kulturschalen geschwenkt und für eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gelagert. Während dieser Zeit, in der es zur Adsorption von Viren an die Zellen kam, wurden die Kulturschalen weiterhin regelmäßig geschwenkt, um ein Austrocknen des Zellrasens zu verhindern.

Nach einer Stunde wurde die Suspension wieder abgesaugt, der Zellrasen ein weiteres Mal vorsichtig mit PBS (37 °C) gespült und anschließend mit 25 ml eines Erhaltungsmediums (DMEM + 2% FBS) überschichtet. Es folgte nun eine weitere Bebrütung im Brutschrank bei 37 °C sowie die tägliche Kontrolle des Zellrasens. Die Virusernte erfolgte erst dann, wenn 2/3 des Zellrasens einen cytopathischen Effekt (CPE) zeigten. Dies dauerte beim Bovinen Parvovirus 36 bis 48 Stunden. Das Medium mit den zerstörten Zellen wurde nun einem dreimaligen Gefrier- (-80 °C) Tau- (25°C) Zyklus unterzogen. Nach dem Auftauen wurden die Suspensionen zur Separierung und Entfernung der Zellreste in 50 ml-Zentrifugenröhrchen 20 min bei 2800-3000 U/min 20min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand stellte nun die Ausgangssuspension für weitere Untersuchungen und wurde bis zur weiteren Verwendung portionsweise in 15 ml-Zentrifugenröhrchen bei -80 °C tiefgefroren.

Die Keimträger wurden aus ZETA – PLUS Membranen mit einer Stanze ausgestanzt und autoklaviert.

Beladen der Keimträger

Für das Beladen der Keimträger wurde folgendes benötigt

Virussuspension 1:10 verdünnt

ein Zetapor (bzw. Virosorb) – Blättchen<sup>2</sup>

Filtervorsatz

Dichtungsring

Pinzette

Erlenmeyerkolben

Spritzen 2ml

Pertrischale

Pipetten

1 ml Virussuspension wurde vorsichtig durch die Filter gegeben. Die mit Virussuspension durchtränkte Keimträger wurden sofort in die Tütchen aus Polycarbonat-Membranen<sup>3</sup> eingeschweißt.

Aufbereitung der Proben

Die Elution der Viren erfolgte in Beef-Extract-Lösung (siehe Anhang) bei pH 8,5 im Ultraschallbad in 5min um die Viren in die Lösung zu bringen.

Entsprechend der Anzahl der Keimträger wurden Schraubgläschen vorbereitet, die mit jeweils 1ml Beef-Extract-Lösung befüllt und beschriftet wurden. Die PC-Briefchen wurden mit einer Pinzette am Rand gehalten, mit einer Schere aufgeschnitten und die im Briefchen sich befindenden Keimträger wurden in das bereitgestellte Schraubgläschen gegeben. Die Gläschen wurden anschließend auf Eis im Ultraschall für 5min beschallt (eluiert).

Nach der Elution wurde die Beef-Extrakt-Lösung mit BPV aus den Schraubgläschen mit einer Pipette abgesaugt, in Eppendorfröhrchen überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Vor der Titration wurden die eluierten Proben aufgetaut und bei ca. 3000 U/min 20 min zentrifugiert.

### 3.3.3 Virusnachweis

Die Virustitration diente der quantitativen Bestimmung der Infektiosität des Virus vor und nach der Hitzeeinwirkung.

Für die Titration nach der Endpunktverdünnungsmethode in Röhrchen wurden folgende Materialien benötigt:

Eppendorfröhrchen mit Virussuspension

Zellkultur (Flasche mit Monolayer) BEL

DMEM

Penicillin-Lösung<sup>16</sup>

Streptomycinsulfat-Lösung<sup>17</sup>

Amphotericin-Lösung<sup>18</sup>

FBS

sterile Glasröhrchen<sup>19</sup>

96-well-Mikrotiterplatte<sup>20</sup>

Mikroskop

Zur Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe wurden 0,2 ml der zu untersuchenden Virussuspension in ein steriles Glasröhrchen überführt, in welches zuvor 1,8 ml Zellkulturmedium (DMEM mit einem Zusatz von 0,4 % Gentamycinsulfat-Lösung, 0,4% Penicillin-G-Lösung, 0,4 % Streptomycinsulfat-Lösung, 0,8 % Amphotericin-Lösung und 5 % FBS) vorgelegt wurden. Es schlossen sich weitere Verdünnungsschritte (jeweils 1:10 bis zu einer Verdünnungsstufe  $10^{12}$  bei Viren) an, bei denen jeweils 0,2 ml der vorherigen Suspension in 1,8 ml vorgelegtes Zellkulturmedium weiterpipetiert wurden. Je 100  $\mu\text{l}$  jeder Verdünnungsstufe

wurden nun in jeweils vier parallele Kavitäten einer 96-well-Mikroplatte überführt. In diese 96-well-Mikroplatte wurde Kulturmedium (siehe oben bei Zellkulturen) zugegeben. Außerdem wurden in die erste Reihe der Platte pro Kavität 100 µl Titrationsmedium ohne Virus pipettiert. Die Kavitäten dieser Reihe dienten bei der späteren Auswertung als Zellkontrolle.

Die Zellen wurden 1 Tag vor der Titration in die Platten angesät, wobei in jede Kavität der Mikrotiterplatte jeweils 100 µl einer Verdünnungsrate der Zellsuspension pipettiert wurde. Die Dichte der Zellsuspension wurde dabei so bemessen, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Titration bereits am Plattenboden angeheftet und einen noch nicht ganzgeschlossenen Zellrasen gebildet haben. Nach Zugabe der Proben aus den jeweiligen Verdünnungsstufen folgte eine Inkubation der Mikrotiterplatte 5 bis 7 Tage bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>).

Die Zellrasen in der Mikrotiterplatte wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Als infiziert galt eine Vertiefung, wenn mindestens ein Herd mit cytopathisch veränderten Zellen erkennbar war. Die Endablesung erfolgte erst dann, wenn keine Veränderung des Zellrasens mehr zu erwarten war. Als Titer wird der positive dekadische Logarithmus derjenigen Verdünnung bezeichnet, bei welcher statistisch die Hälfte der Einsätze reagiert (Angabe in log<sub>10</sub> KID<sub>50</sub>/Testvolumen).

Ermittelt wurde dieser Wert nach dem Schätzverfahren von SPEARMAN und KAERBER (KAERBER, 1931).

Der Titer wird es berechnet nach Spearman und Kärbel Formel:

$$KID_{50} = (X_0 - d/2 + d \sum r/n)$$

Berücksichtigt werden die positiven Wells ab der höchsten Verdünnungsstufe, in der alle Ansätze positiv sind.

X<sub>0</sub> = dek. Logarithmus der höchsten Verdünnung in alle Wells einen CPE sichtbar ist

d = log<sub>10</sub> des Verdünnungsfaktor (hier: log<sub>10</sub> 10 = 1)

r = Anzahl der positiven Wells pro Stufe

n = Anzahl der Ansätze pro Stufe

Die Ermittelte Virusmenge in 100 µl wurde auf 1 ml umgerechnet.

### 3.4 Parasitologische Untersuchung

Spulwurmeier wurden in den Laborversuchen bzw. in den großtechnischen Versuchen mit Hilfe von speziell angefertigten Keimträgern in den Boden eingebracht und deren Überlebensfähigkeit nach der Hitzeeinwirkung überprüft.

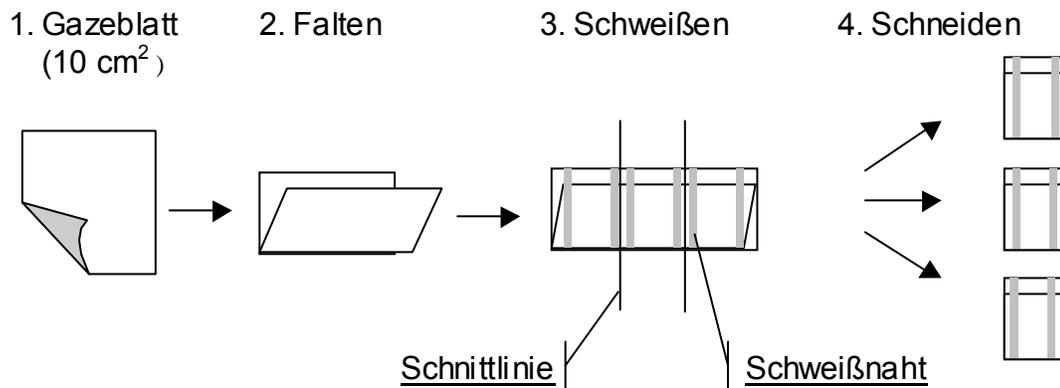


Abb.8: Herstellung der Gazekeimträger für die Spulwurmeier (SCHWARZ, 2003)

Für die Herstellung der Gaze-Keimträger werden folgende Materialien benötigt:

- eine Bogen Seidegaze
- Schere
- Zangenförmiges Folienschweißgerät mit variabler Temperatureinstellung

Zur Herstellung der Gazekeimträger wird ein Bogen Seidengaze in ca. 10 cm<sup>2</sup> große Blätter geschnitten (Abb. 8) und anschließend in der Mitte gefaltet. Mit einem Folienschweißgerät werden die Ränder verschweißt. Das Gerät wird dazu auf eine mittlere Temperaturstufe eingestellt und anhand von Probeschweißungen wird die optimale Schweißzeit ermittelt. Eine gute Schweißnaht ist durchgehend geschlossen und darf sich bei leichtem Ziehen nicht ablösen. Durch weitere Schweißnähte im Abstand von 3 cm ergeben sich aus einem Blatt drei Keimträgetaschen, die einzeln ausgeschnitten werden. Jede Schweißnaht ist durch Ziehen auf Festigkeit zu überprüfen.

Frische Askarideneier werden in einzelne Gazesäckchen verfrachtet und diese durch Kabelbinder verschlossen. Die Abbildung 9 zeigt die fertigen „Askaridenkeimträger“.



Abb. 9: Fertige „Gazesäckchenkeimträger“ zum Einbringen der Askarideneier in den Boden (SCHWARZ, 2003)

Nach einer weiteren Verpackung zum mechanischen Schutz werden die Keimträger in den Boden eingebracht.

Nach jedem Versuch wurden die Keimträger entleert und unmittelbar mikroskopisch auf sich entwickelnde Stadien (Larve II) kontrolliert. Nach einer Inkubationszeit von ca. drei Wochen bei 29°C erfolgt eine zweite Kontrolle sowie die Bewertung der prozentualen Entwicklungsfähigkeit der Spulwurmeier.

Gewinnung der Eier aus den weiblichen Spulwürmern

Zur Gewinnung von Spulwürmern werden insgesamt folgende Materialien benötigt:

- a) Präparationsbesteck zur Spulwurmsektion: eine kleine Schere, zwei Pinzetten
- b) große Schere
- c) ca. zehn Petrischalen
- d) zwei Erlenmeyerkolben (für Aufbewahrung der Eisuspension)
- e) Trinkwasser

Als effektivste Methode zum Erhalt weiblicher Spulwürmer hat sich das manuelle Sammeln von Dünndärmen frisch geschlachteter Schweine im Schlachthof bewährt. Weibliche Spulwürmer unterscheiden sich von männlichen im Wesentlichen durch ihre Größe. Erst Spulwürmer ab einer Länge von 15 cm lohnen für eine weitere Präparation. Kleinere Spulwürmer sind oft unbefruchtet und enthalten keine entwicklungsfähigen Eier. Die entnommenen Spulwurmeier können gekühlt - nicht gefroren - bis zur Präparation nur wenige Tage aufbewahrt werden.

Autolytische Prozesse zersetzen den Uterus und erschweren danach die Präparation der Eier erheblich.

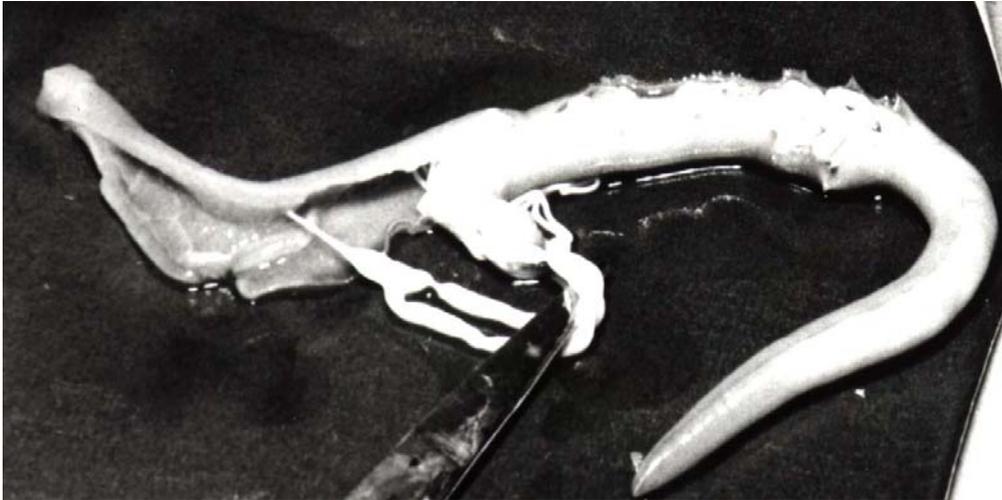


Abb. 10: Präparation der Spulwurmeier aus dem Uterus weiblicher Askariden (SCHWARZ, 2003)

Zunächst werden die Spulwürmer längs geteilt (Abb. 10). Der Hauptteil des Inneren besteht aus unterschiedlich starken Uterusschlingen. Nach dem Auffinden der Bifurkation, welche sich im ersten Drittel des Wurmes befindet, werden beide Uterusschlingen nur in einer Länge von 3cm abgesetzt, um eine möglichst hohe Zahl von befruchteten Eiern zu gewinnen.

In einer Petrischale wird ein ca. 3mm hoher Wasserfilm gefüllt. Die Eier werden anschließend mit dem stumpfen Ende einer Pinzette aus dem Uterusstück herausgestrichen. Die so gewonnene Eisuspension wird durch eine Gazemembran filtriert. Uterusreste bleiben in der Gaze zurück und die ausgewaschenen Spulwurmeier werden in Wasser resuspendiert.

Die Suspension wird abschließend 24 h bei 4 °C geschüttelt um eine gleiche Verteilung der Eier aus verschiedenen Spulwürmern zu erhalten. Die auf diese Weise gewonnene Eisuspension kann bei 4°C gekühlt ein Jahr für die Herstellung von Keimträgern aufbewahrt werden.

#### Befüllung der Gaze - Keimträger

Zur Befüllung der Gaze - Keimträger werden folgende Materialien benötigt:

- a) Gaze - Säckchen
- b) Pipette mit Pipettierhilfe

- c) 2 Petrischalen als Unterlage
- d) Kabelbinder in kleiner Stärke
- e) Kabelbinder - Pistole
- f) Erlenmeyerkolben mit der Eisuspension
- g) Folienschweißgerät mit variabler Temperatureinstellung

Die hergestellte Suspension wird aufgeschüttelt und so weit verdünnt, bis sie eine errechnete Konzentration nach mikroskopischer Auszählung von ca. 1 Million Eiern/ml Suspension enthält. Von dieser Suspension wird 1ml in die „Gaze-Keimträger“ verfrachtet. Das Wasser läuft durch die Maschenweite der Gaze und wird in den Petrischalen aufgefangen.

Mit Kabelbindern wird die Tasche oben geschlossen und ergibt so die Form eines Säckchens.

#### Öffnung und Auswertung der Gaze - Keimträger

Für die Öffnung der Gaze - Keimträger werden folgende Materialien benötigt:

- a) große Schere
- b) Spritzflasche mit Trinkwasser
- c) Petrischalen (jeweils eine pro Keimträger)
- d) Inkubationsschrank mit 29 °C konstanter Temperatur
- e) Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung
- f) Elektronische Zählhilfe

Nach dem Spülen der Gazetaschen unter klarem Wasser werden die Keimträger unterhalb des Kabelbinders, anschließend die seitlichen Schweißnähte abgeschnitten, so dass die Tasche aufgefaltet werden kann. Mit einem schwachen Wasserstrahl aus einer Spritzflasche können nun die Eier in eine Petrischale ausgespült werden.

Unter einem Mikroskop werden die Eier bei 40 x facher Vergrößerung direkt nach dem Ausspülen auf ihre Entwicklung durchgemustert. Als positiv gelten dabei die potentiell entwicklungsfähigen Eier, die das zweite Larvenstadium erreicht haben.

Als negativ gelten alle anderen Eier, unabhängig davon, ob sie sich noch nicht entwickelt haben oder als zerstörte Reste erkennbar sind.

Anschließend werden die Eier in den ständig feucht zu halten Petrischalen bei 29 ° für 4 Wochen inkubiert und danach erneut überprüft.

### 3.5 Versuche zur "Beimpfung" des Bodens (Einmischverfahren)

Dazu wurden zunächst ausgewählte und definierte Bodenarten mit den o. g. Mikroorganismen gleichmäßig kontaminiert, so dass pro Gramm Boden eine definierte Anzahl der zu überprüfenden Mikroorganismen vorhanden war.

Begonnen wurden die Versuche mit einer hohen Mikroorganismenkonzentration eines Bodens bzw. reinen Sandes, um einen Reduktionserfolg durch die Hitzeeinwirkung eindeutig nachweisen zu können.

Als unbedingte Voraussetzung zur quantitativen Aussage der Versuche muss das optimale und gleichmäßige Einmischen der verschiedenen Mikroorganismen in den Boden bzw. Sand gegeben sein.

Vorversuche haben gezeigt, dass dies mit entsprechendem Aufwand durch den Einsatz eines handelsüblichen Betonmischers erfolgreich praktiziert werden kann.

Zum Versuch wurden die nachstehenden „Indikatororganismen“ verwendet: *Escherichia coli*, *Salmonella senftenberg* W 7775 und *Enterococcus faecalis*.

Kolonienmaterial von jeder obengenannten Bakterienart wurde in Standard-I-Bouillon 24 h bei 37 °C gezüchtet und anschließend mit dem Sand vermischt. Jede Mischung enthielt etwa 15 Liter Sand und 0,33 Liter Bakteriensuspension der obengenannten Bakterienarten. Es wurden insgesamt 3 vergleichbare Mischungen angesetzt. Jeder Mischungsvorgang dauerte 20 min.

Es wurden die Ausgangszahlen der „Indikatororganismen“ im Boden nach der gründlichen Einmischung im Betonmischer ermittelt. Jede Mischung wurde auf das Blech des Gerätes gebracht und mit verschiedenen Geschwindigkeiten unter der Flamme des Injektorbrenners durchgezogen. Bei der Probenahme wurde differenziert nach oberen (0 bis 0,5 cm) und unteren (1,5 bis 2 cm) Bodenschichten (siehe Tab.1). Von jeder Schicht wurden 3 Proben entnommen. Es wurde die Tenazität der untersuchten Mikroorganismen nach den in Pkt. 2.2 beschriebenen Methoden untersucht.

### 3.6 Versuche mit Keimträgern

#### Metallkeimträgertechnik für Bakterien

Als Metallkeimträger wurden rostfreie Stahlblättchen mit einem Durchmesser von 20 mm verwendet. Vor Gebrauch wurden die Metallkeimträger mit 70 % Ethanol 2-3 Stunden gereinigt, mit Aqua dest. gespült, auf eine Glasperlenschicht in einer Petrischale horizontal gelagert und hitzesterilisiert. Die Metallkeimträger wurden mit je 0,05 ml (50 µl) bakterieller Suspension beimpft und bei 37 °C 1 Stunde getrocknet. Für die Nullproben wurde jeder Keimträger mit der

kontaminierten Oberfläche nach unten in eine Schottflasche gegeben, die 6 g Glasperlen und 10 ml Trypton-NaCl enthielt.

Zur Durchführung der Großversuche wurde die sog. „Plättchenkeimträgertechnik“ mit „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern angewandt. Die Keimträger sind aus Aluminium, 1 cm breit, 5 cm lang und 1 mm dick.

Für die Nullproben wurde je Keimträger in einem Glasröhrchen mit 10 ml Trypton-NaCl-Lösung versenkt und auf einem Rundschüttler über Nacht geschüttelt, um die an der Oberfläche der KT haftende Mikroorganismen in die Lösung zu bringen. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der abgeschwemmten Mikroorganismen.

Vor der Hitzebehandlung wurden „offene“ und „geschlossene“ Keimträger in den Boden zwischen 5 – 10 cm Tiefe eingebracht. Geschlossene Keimträger bedeutet, umwickelt mit einer Aluminiumfolie. 50 % der beimpften KT wurden mit Alufolie umwickelt, und 50 % offen gelassen.

#### Holzkeimträgertechnik für Bakterien

Als Holzkeimträger dienten 20 x 10mm große Pappelholzstreifen, die vor Gebrauch im Trockensterilisator sterilisiert wurden. Die Holzkeimträger wurden in Petrischalen auf einer Glasperlenschicht ausgelegt, mit je 0,1 ml Keimsuspension beimpft und für 60 min bei 37 °C in einem Brutschrank getrocknet.

Bei dem Versuch zur Bodendesinfektion wurden die mit bakterieller Suspension kontaminierten Metall- und Holzkeimträger (jede bakterielle Suspension enthielt nur eine Bakterienart; jeder Keimträger wurde nur mit einer Bakterienart kontaminiert) der Hitze bzw. der Temperaturentwicklung im Boden unterschiedlichen Zeiten ausgesetzt und danach mit einer sterilisierten Pinzette in eine Petrischale gebracht um die noch abschwemmbar bzw. vermehrungsfähigen Mikroorganismen nachzuweisen.

Die Holzkeimträger wurden zum quantitativen Nachweis der noch lebensfähigen „Indikatororganismen“ in die für die einzelnen Bakterienarten entsprechenden Röhrchen a 9ml gebracht und kurz gevortext. Anschließend wurden sie im Ultraschallbad zum Ablösen der Bakterien für 5min beschallt. Dann folgte der übliche MPN - Arbeitsgang.

#### Keimträgertechnik für Viren

Eine definierte Menge des Indikatorvirus *Bovines Parvovirus* (BPV)<sup>1</sup> wurde an ZETA- PLUS (Virosorb1- MDS, AMF, Cuno Div., Meriden, Connecticut)- Membranen<sup>2</sup> adsorbiert und so in

Tütchen aus Polycarbonat-Membranen<sup>3</sup> (Kantenlänge 25 mm) eingeschweißt, sog. *Sandwich*-Keimträger. Die Polycarbonatmembranen wiesen Poren einer definierten Größe von 10 nm auf (Infiltec, Speyer).

Aufgrund dieser geringen Porengröße kann kein Virus aus dem System entweichen und die Umgebungserde kontaminieren. Um die empfindlichen Prüfkörper im Boden vor mechanischen Beschädigungen durch die Fräswerkzeuge zu schützen, wurden sie mit einer Alufolie umwickelt. Der Virustiter in der Ausgangssuspension betrug  $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml.

Die beladenen Keimträger wurden mit der sie umhüllenden Aluminiumfolie ca. 5 cm tief in die Erde eingelegt bevor die Hitzebehandlung durch das BVS-System erfolgte. Nach Beendigung des jeweiligen Versuches erfolgte die Entnahme der virologischen Keimträger zur Untersuchung des Virustiters im Laboratorium der Universität Hohenheim.

### 3.7 Beschreibung der Anwendung von Mikroorganismen in „freier Suspension“

Zusätzlich erfolgte in den Großversuchen 2-4 die Anwendung einer Mikroorganismensuspension (ca. 1 m<sup>2</sup> Bodenfläche wurde mit je einem Liter einer Suspension von *E. coli* Typ 63/K12, *Salmonella Typhimurium* (Typ Zoosal) und *Enterococcus faecalis* Typ 13, KBE>10<sup>8</sup>/ml kontaminiert).

Vor dem eigentlichen Erhitzungsversuch wurden von jeder mit den drei Mikroorganismenarten kontaminierten Bodenfläche 5 Proben („Nullproben“) gezogen und qualitativ auf Salmonellen, *E. coli* und Fäkalstreptokokken untersucht. Zur Untersuchung der Salmonellen gelangten 50 g Boden in 450 ml Peptonwasser. Die weiteren Identifizierungsschritte erfolgten wie in Pkt. 3.2.4 beschrieben. Zum Nachweis der *E. coli* wurden 10 g Erde in 9 ml Fluorocult-Bouillon überführt; zum Nachweis der Fäkalstreptokokken 10 g Erde in 9 ml AD Bouillon. Die weitere Identifizierung erfolgte wie unter den Punkten 3.2.2 bzw. 3.2.3 beschrieben.

## 4 Durchgeführte Untersuchungen

### 4.1 Vorversuche

#### 4.1.1 Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad

Es wurde das Absterbeverhalten von Bakterien (*Escherichia coli*, *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis*) im Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen und Einwirkungszeiten untersucht. In einer Anzahl der Mikroorganismen zwischen  $10^8$  und  $10^9$  KBE/ml wurden diese in einem Wasserbad Temperaturen von 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C unterschiedlichen Zeiten ausgesetzt.

Bei den Wasserbadversuchen mit Erde wurden solche Aluminiumkeimträger angewandt, wie sie auch bei den großtechnischen Versuchen bei der Bodenerhitzung mit dem Injektorbrenner zum Einsatz kamen (siehe Pkt. 4.3). Nachdem die Keimträger mit den entsprechenden Mikroorganismen kontaminiert waren, wurden sie in mit Erde angefüllten Schottflaschen vorgewärmt in ein Wasserbad verbracht. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Keimträger aus den Schottflaschen entnommen und quantitativ die Anzahl von *E. coli*, *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* bestimmt. Die Nullproben gelangten ohne Hitzewirkung in Trypton-NaCL zur quantitativen Untersuchung.

#### 4.1.2 Wasserbadversuche mit autoklavierter und nicht autoklavierter Erde bei gleichen Trockensubstanzgehalten

13 mit *Enterococcus faecalis* beimpfte Alu-Keimträger wurden zusammen mit Erde mit gleichen Trockensubstanzgehalten verbracht und im Wasserbad einer Temperatur von 65 °C unterschiedlichen Zeiten ausgesetzt. Danach wurden die Keimträger aus dem Wasserbad entnommen, in Trypton-NaCL-Lösung gebracht und quantitativ untersucht.

#### 4.1.3 Wasserbadversuche mit Erde bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten

Mit *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium* Typ „Zoosa“ und *E. coli* 63;Typ K/12 beimpfte Alu-Keimträger wurden in Schottflaschen mit Erde bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten verbracht und im Wasserbad Temperaturen von 50 °C, 57 °C, 65 °C, 67 °C und 70 °C ausgesetzt. Nach verschieden langen Zeiten der Erwärmung wurden die Keimträger aus dem Wasserbad entnommen, in Trypton-NaCL gebracht und quantitativ untersucht.

#### 4.1.4 Tenazitätsversuche bei Zimmertemperatur

Mit *E. coli* 63/K12 und *Salmonella typhimurium* Typ „Zoosal“ beimpfte Keimträger wurden bei Zimmertemperatur bis 18 h in Trypton-NaCl-Lösung verbracht. Nach jeder Stunde bis insgesamt 18 Stunden wurde ein Keimträger aus der Lösung entnommen und quantitativ auf *E. coli* und *Salmonella typhimurium* untersucht.

#### 4.1.5 Versuche zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, bei denen *Salmonella Senftenberg* und *Escherichia coli* in einem Betonmischer in Sand eingemischt wurden. Das gleichmäßige Einmischen von Mikroorganismen in Boden- und Sandproben ist sehr wichtig, um eindeutige Aussagen zur Reduktionsleistung auf die „Indikatororganismen machen zu können. Die Einmischzeit von 10 Minuten reichte nicht aus, um ein homogenes Gemisch herzustellen. Erst nach 20 min war das Ergebnis zufriedenstellend.

Der erste Versuch zur Bodendesinfektion mit Sand mittels Injektorbrenner wurde am 06.06.2002 durchgeführt. Am 19.06.02 erfolgte der zweite Versuch mit Sand. Für beide Versuche wurde ein Gerät der Firma „Pedosan“ eingesetzt.

#### 4.2. Vorversuche zur thermischen Desinfektion von Boden

##### 4.2.1 Versuche zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren

Am 27.07.02 wurde ein Versuch zur Bodendesinfektion durchgeführt. Für diesen Versuch wurde Erde (Ackerboden, Lehm) verwendet. Der Versuchsaufbau ist vergleichbar mit dem Sandversuch (siehe Pkt. 4.1.5). Allerdings wurden hierbei zwei unterschiedliche Wassergehalte des Bodens berücksichtigt.

Am 18.10.02 wurde der zweite Versuch zur Bodendesinfektion durchgeführt. Für diesen Versuch wurde Erde (Ackerboden) verwendet.

Für die Versuche wurden die nachstehenden „Indikatororganismen verwendet : *Escherichia coli*, *Salmonella senftenberg* und *Enterococcus faecalis*.

#### 4.2.2 Versuche zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik

Am 25.11.02 wurde der erste Versuch zur Bodendesinfektion mit Keimträgern durchgeführt. Für diesen Versuch wurde Erde (Ackerboden) verwendet. Die Proben wurden etwa 5 mm tief in die Erde gelegt. Am 12.12.02 wurde der zweite Versuch zur Bodendesinfektion mit Keimträgern durchgeführt. In diesem Versuch kam Ackerboden von Flächen des Versuchsgutes der Universität Hohenheim zur Anwendung.

#### 4.3 Großversuche

##### 4.3.1 Mikrobiologische Untersuchungen während des Einsatzes des „BVS“- Systems mit dem Injektorbrenner zur Bodendesinfektion

In einem 1. Versuch, der als „Vorversuch“ zur Überprüfung der Keimträgertechnik und vor allem der „Wiederfindungsrate“ der Keimträger unter Praxisbedingungen galt, wurden 10 Keimträger (beimpft mit *Enterococcus faecalis*) in 5-10 cm Bodentiefe eingebracht.

Bei den Versuchen 2-4 wurden neben „offenen“ Keimträgern, sog. „geschlossene“ (mit Aluminiumfolie umwickelte) Keimträger parallel eingesetzt. Diese dienten dazu, einen möglichen beschützenden Effekt auf die Mikroorganismen mit zu erfassen. Denn die in diesen Versuchen zusätzlich auf speziellen Keimträgern eingebrachten Parvoviren konnten nur in Aluminium eingewickelt angewandt werden. Bei einem gleichgeschalteten Einsatz der „Keimträgertechnik – geschlossen“ war somit ein direkter Vergleich der Tenazität der untersuchten Bakterien und Viren gegeben.

Außerdem wurden in den Versuchen 2 bis 4 jeweils auf „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern, die mit *E. coli* (63/K12), *S. Thyphimurium* (Typ Zoosal) und *Enterococcus faecalis* beaufschlagt waren, zusätzlich diese 3 Mikroorganismen mit je einem Liter in freier Suspension auf ca. 1 m<sup>2</sup> auf der Versuchsfläche ausgebracht

##### 4.3.2 Solarfolienversuche

Auf einem freien Wiesengelände der Universität Hohenheim wurden Versuche mit Solarfolien durchgeführt um die Tenazitäten unterschiedlicher Mikroorganismen zu überprüfen.

Es wurden Keimträger aus Aluminium 1 cm x 5 cm beimpft mit *Enterococcus faecalis*, *E. coli* 63, Typ K-12 und *Salmonella Thyphimurium* Typ „Zoosal“ in 2 cm und 5 cm Bodentiefe auf drei unterschiedlichen Flächen ausgebracht. Das Bovine Parvovirus wurde an speziellen

Keimträgern absorbiert, zum mechanischen Schutz in Plastiksäckchen gepackt und ca. 2-5 cm unter die Erdoberfläche eingebracht.

Eine der drei Versuchsflächen wurde mit schwarzer Folie abgedeckt, die zweite mit weißer Folie. Als Kontrollfläche diente eine nicht abgedeckte Wiesenfläche direkt neben den beiden Versuchsflächen. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns war ein ca. 5 cm hoher Grasbestand vorhanden. Die Vorbereitung der Keimträger als auch die Auswertung erfolgte analog den Großversuchen bei der Bodenerhitzung.

Ein erster Versuch wurde mit Salmonellen und Fäkalstreptokokken (*Enterococcus faecalis*) durchgeführt.

In einem zweiten Versuch wurde das Überlebensverhalten von *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* und Parvoviren überprüft.

In einem dritten Versuch wurden nochmals *Salmonella Typhimurium* eingesetzt.

#### 4.3.3 Dämpfungsversuche

Am 17.09.2003 wurde ein Großversuch zur Bodendämpfung mit einem Dampfgerät in der Nähe von Stuttgart durchgeführt. Der Versuch hat auf einem Feld mit leichtem Boden (Löß-Lehm) stattgefunden. Die untersuchten biologischen Parameter, der Versuchsansatz und die Art der Probenahmen in diesem Versuch waren identisch mit den Versuchen des Injektorbrenners (siehe Versuch Pkt. 4.3.1).

Der Versuch wurde bei guten Witterungsbedingungen mit Lufttemperaturen um 25 °C durchgeführt. Vor der Hitzebehandlung wurde neben der Bestimmung des Wassergehaltes des Bodens, die Bodentemperatur in verschiedenen Zeitabständen während und nach der Hitzeeinwirkung in verschiedenen Bodentiefen untersucht über eine Zeitspanne von insgesamt 40 Minuten (Versuchsende).

In dem Versuch wurden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Thyphimurium* und Parvoviren (BPV-*Bovine Parvovirus*) als Indikatororganismen eingesetzt.

In den Boden wurden „offene“ und „geschlossene“ Keimträger eingebracht. Zusätzlich erfolgte die Anwendung einer Keimsuspension.

#### 4.3.4 Kalkungsversuche

In Untersuchungen wurde der Einfluss einer Kalkbehandlung des Bodens (pro m<sup>2</sup> Boden wurden in parallelen Versuchsansätzen 0,8 und 1,6 kg Ca(OH)<sub>2</sub> ausgebracht) auf relevante

Mikroorganismen untersucht. Abbildung 11 zeigt die mit unterschiedlichen Kalkmengen beaufschlagten Versuchsflächen.



Abb. 11: 6 Versuchsflächen mit Kalk (im Vordergrund  $0,8 \text{ kg CaOH}_2/\text{m}^2$ ; im Hintergrund  $1,6 \text{ kg CaOH}_2/\text{m}^2$ )

Anschließend wurde die Bodenoberfläche (je  $1 \text{ m}^2$ ) mit einem Liter Keimsuspension von *E. coli*, *Enterococcus faecalis* sowie einem apathogenen Salmonellen-Serovar kontaminiert und danach bis 5 cm Bodentiefe mit einer Ackerfräse eingearbeitet. Gleichzeitig wurden die 3 unterschiedlichen Mikroorganismen auf „Keimträgern“ (jeweils 5 pro Erregerart) in die oberen 5 cm Bodentiefe eingelegt, um dem Einfluss des Kalkes auf die Mikroorganismen auf den Keimträgern zu untersuchen (Abb. 12). Vor dem Versuch wurden Bodenproben entnommen um den pH-Wert des Bodens zu messen und auf den nativen Gehalt jener Mikroorganismen zu untersuchen, die in freier Suspension bei der Kalkanwendung auf die Bodenoberfläche der Versuchspartellen ausgebracht wurden.



Abb. 12: Einbringung der mit den „Prüfkeimen“ kontaminierten Keimträgern in ca. 5 cm Bodentiefe der jeweils gekalkten Versuchsflächen

Primäres Ziel war es, in Erfahrung zu bringen, ob relevante Mikroorganismen, die stellvertretend für pathogenen Erreger angewandt wurden, durch die Kalkung der Versuchsböden reduziert bzw. inaktiviert werden können. Ein weiteres Ziel lag darin zu ermitteln, ob nach Versuchsende durch ein Fräsen des Bodens bis 15 cm Bodentiefe der Kalk soweit mit Bodenmaterial verdünnt wird, damit der pH-Wert des Bodens vom stark alkalischen Bereich wieder zum Neutralpunkt gesenkt werden kann. Daher wurden sechs Tage nach Versuchsbeginn die gekalkten Flächen mit der Bodenfräse 15 cm tief gefräst. (Abb. 13).



Abb. 13: Fräsen der Versuchsflächen bis ca. 15 cm Bodentiefe zur „Realkalisierung“ des Bodens

Diese Untersuchungen waren ursprünglich im Projekt nicht vorgesehen. Sie wurden deshalb zusätzlich durchgeführt, weil sich die Versuchsansteller mit dieser Art der Bodenbehandlung eine für die Praxis erfolgreiche Bodenbehandlung zum Zwecke der Desinfektion versprochen und sie unter den verschiedensten Gegebenheiten der unterschiedlichsten Betriebsarten als erfolgreiche, praktikable und ökonomisch machbare Methode erschien.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad

#### 5.1.1 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 55 °C

Bei 55 °C reduzierte sich die Anzahl von *Escherichia coli* innerhalb 30 Minuten um 1-2 Zehnerpotenzen.

*Enterococcus faecalis* zeigten nach 30 min keine Reduktion, während sich die Anzahl von *S. senftenberg* in dieser Zeitspanne um eine Zehnerpotenz reduzierte (Tab. 4).

Tabelle 4: Zeitdauer des Überlebens von *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Senftenberg* im Wasserbad bei 55 °C (Angaben in KBE/ml)

Dauer der Wärmebehandlung	"Indikatororganismen"		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>
Ausgangswert	2,1 x 10 <sup>9</sup> 1,6 x 10 <sup>9</sup>	6,6 x 10 <sup>8</sup> 9,5 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>9</sup> 3,1 x 10 <sup>9</sup>
10 min	2,4 x 10 <sup>8</sup> 1,4 x 10 <sup>8</sup>	9,6 x 10 <sup>8</sup> 9,4 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup> 9,9 x 10 <sup>9</sup>
20 min	5,9 x 10 <sup>8</sup> 4,3 x 10 <sup>8</sup>	9,3 x 10 <sup>8</sup> 9,3 x 10 <sup>8</sup>	6,8 x 10 <sup>8</sup> 1,1 x 10 <sup>9</sup>
30 min	9,5 x 10 <sup>7</sup> 1,3 x 10 <sup>8</sup>	3,5 x 10 <sup>8</sup> n.d.	2,5 x 10 <sup>8</sup> n.d.

KBE: Koloniebildende Einheiten

n.d.: nicht durchgeführt

#### 5.1.2 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 60 °C

Bei einer Temperatureinwirkung von 60 °C reduzierte sich die Zahl der *Escherichia coli* innerhalb einer Zeitspanne von 30min von 10<sup>8</sup> auf 10<sup>1</sup> und damit um sieben Zehnerpotenzen.

Die Zahl der *Enterococcus faecalis* reduzierte sich innerhalb 30min allerdings nur um zwei Zehnerpotenzen von 10<sup>8</sup> auf 10<sup>6</sup> KBE/ml.

Bei der Anzahl der *Salmonella Senftenberg* konnte eine Reduktion von 10<sup>9</sup> KBE/ml innerhalb von 30min auf 10<sup>5</sup> KBE/ml festgestellt werden (Tab. 5).

Tabelle 5: Zeitdauer des Überlebens von *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Senftenberg* im Wasserbad bei 60 °C (Angaben in KBE/ml)

Dauer der Wärmebehandlung	"Indikatororganismen"		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella senftenberg</i>
Ausgangswert	$7,1 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$
10 min	$6,8 \times 10^4$	$5,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
20 min	$4,0 \times 10^1$	$3,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^6$
30 min	$9,0 \times 10^1$	$2,5 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$

KBE: Koloniebildende Einheiten

### 5.1.3 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 65 °C

Bei der Temperatureinwirkung von 65 °C konnten nach 10 min keine *E. coli* mehr nachgewiesen werden. Innerhalb dieser kurzen Zeitspanne fand damit eine Keimreduktion um 9 Zehnerpotenzen statt.

*Enterococcus faecalis* reduzierte sich innerhalb von 30 min um 5 Zehnerpotenzen von  $10^8$  KBE/ml auf  $10^3$  KBE/ml.

*Salmonella Senftenberg* waren nach 10 min noch in einer Konzentration von  $10^2$  KBE/ml nachweisbar. Nach 20 min konnte kein Nachweis mehr geführt werden (Tab. 6).

Tabelle 6: Zeitdauer des Überlebens von *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Senftenberg* im Wasserbad bei 65 °C (Angaben in KBE/ml)

Dauer der Wärmebehandlung	"Indikatororganismen"		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella senftenberg</i>
Ausgangswert	$1,4 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^9$
	$1,6 \times 10^9$	$8,2 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$
10 min	n. n.	$8,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^2$
20 min	n. n.	$7,1 \times 10^3$	n. n.
30 min	n. n.	$2,3 \times 10^3$	n. n.

KBE: Koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

#### 5.1.4 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad bei 70 °C

Während die Zahl an *Enterococcus faecalis* innerhalb von 10 min von  $10^8$  auf  $10^4$  abnahm und diese Mikroorganismen nach 20 min nicht mehr nachgewiesen werden konnten, waren *S. Senftenberg* bereits nach 10 min Wärmeeinwirkung nicht mehr anzüchtbar. Versuche mit *E. coli* wurden bei 70 °C nicht durchgeführt, weil die vorhergehenden Tenazitätsstudien mit *E. coli* eine geringere Temperaturbeständigkeit bescheinigten als wie sie bei *Enterococcus faecalis* und *S. senftenberg* nachgewiesen werden konnte (Tab. 7).

Tabelle 7: Zeitdauer des Überlebens von *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Senftenberg* im Wasserbad bei 70 °C (Angaben in KBE/ml)

Dauer der Wärmebehandlung	"Indikatororganismen"	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>
Ausgangswert	$6,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
10 min	$3,1 \times 10^4$	n. n.
20 min	n. n.	n. n.
30 min	n. n.	n. n.

KBE: Koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

#### 5.2 Ergebnisse der Wasserbadversuche mit Erde

##### 5.2.1 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad mit autoklavierter und nicht autoklavierter Erde

Die Versuche an der halbtechnischen Anlage zur Bodendesinfektion haben zwar gezeigt, dass kein großer Unterschied im Überlebensverhalten der untersuchten Mikroorganismen besteht wenn man autoklavierte und nicht autoklavierte Erde erhitzt. Aus der Tabelle 8 wird ersichtlich, dass bei 65 °C *Enterococcus faecalis* in nicht autoklavierter Erde einer schnelleren Reduktion unterliegt als in autoklavierter Erde. Das lässt zunächst den Schluss zu, für die weiteren Tenazitätsversuche gewachsene Erde zu verwenden, weil davon auszugehen ist, dass sich durch den Wasserbadversuch keine Hinweise auf mögliche Interaktionen zwischen der vielfältigen Mikroorganismenpopulation in gewachsener Erde ergeben haben. Andererseits werden durch die angewandte Methodik zum Nachweis von *Enterococcus faecalis* auch andere Enterokokken, möglicherweise hitzeresistentere erfasst, wodurch sich die höhere Zahl der Enterokokken bei 65 °C und 30 minütiger Erhitzung ergeben könnte. Eine klare Abgrenzung der

*Enterococcus faecalis* von anderen Enterokokken lässt sich uneingeschränkt nur durch eine molekularbiologische Differenzierung bewerkstelligen.

Tabelle 8: Ergebnisse zur Tenazität von *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen Überlebenszeiten im Wasserbad bei 65 °C mit autoklavierter und nicht autoklavierter Erde, Ausgangskonzentration:  $2,4 \times 10^6$  KBE/ml

Substrat	Temperatur	TS-Gehalt	Konzentration nach verschiedenen Zeiten		
			10 min	20 min	30 min
autoklavierte Erde	65 °C	85,0 %	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
nicht autoklavierte	65 °C	85,5 %	$8,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

#### 5.2.2 Ergebnisse der Tenazitätsversuche zum Absterbeverhalten von Bakterien im Wasserbad in Schottflaschen mit Erde bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten

Die Tabelle 9 zeigt, dass bei einer Erhitzung im Wasserbad bei 70 °C der Trockensubstanzgehalt bzw. dessen Unterschied von ca. 10 % im Überlebensverhalten von *Enterococcus faecalis* kaum einen Unterschied ausmacht, während bei nur 3 Grad weniger (bei 67 °C) die Überlebensrate von *Enterococcus faecalis* sehr hoch ist und nach 30 Minuten Einwirkzeit noch  $1,5 \times 10^4$  bzw.  $4,8 \times 10^4$  KBE/ml an *Enterococcus faecalis* nachgewiesen werden können. Der verschiedene TS-Gehalt der Bodenproben scheint keinen Einfluss auf die Tenazität der untersuchten *Enterococcus faecalis* auszuüben (Tab. 10).

Tabelle 9: Ergebnisse zur Tenazität von *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen Überlebenszeiten im Wasserbad bei 70 °C bei unterschiedlichem TS-Gehalt der Erde, Ausgangskonzentration:  $2,4 \times 10^6$  KBE/ml

TS-Gehalt der Erde	Temperatur	Konzentration nach verschiedenen Zeiten		
		10 min	20 min	30 min
75 %	70 °C	n. n.	n. n.	n. n.
86 %	70 °C	$2,3 \times 10^0$	n. n.	n. n.

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

n.n.: nicht nachweisbar

Tabelle 10: Ergebnisse zur Tenazität von *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen Überlebenszeiten im Wasserbad bei 67 °C bei unterschiedlichem TS-Gehalt der Erde, Ausgangskonzentration:  $3,0 \times 10^8$  KBE/ml

TS-Gehalt der Erde	Temperatur	Konzentration nach verschiedenen Zeiten		
		10 min	20 min	30 min
77 %	67 °C	$4,6 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$
86 %	67 °C	$8,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^3$	$4,8 \times 10^4$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

Im Boden mit geringerem Trockensubstanzgehalt wurde die Keimzahl nach 30 min mehr reduziert als im Boden mit höherem TS-Gehalt, dabei waren die Unterschiede in der Anzahl der Mikroorganismen nach 30 min bei 77% und 86% TS-Gehalt der Erde gering.

### 5.2.3 Ergebnisse der Versuche zur Tenazität von Bakterien auf Keimträgern im Wasserbad

Die Tabellen 11 und 12 zeigen die Ergebnisse von *S. Typhimurium*, die auf „Keimträgern“ zusammen mit Erde bei einem TS-Gehalt von 76 (77) bzw. 86 (87) % in ein Wasserbad gebracht und bei 50 °C 50 Minuten bzw. bei 55-57 °C 60 Minuten lang erhitzt wurden. Es wird ersichtlich, dass bei 50 °C sich die Anzahl der Salmonellen innerhalb 50 Minuten reduziert, allerdings nur zwischen 1-2 Zehnerpotenzen. In Proben mit dem höheren TS-Gehalt in den Erdproben ist der Keimgehalt höher (Tab. 11). Bei Temperaturwerten in den Bereichen zwischen 55-57 °C kann eine weitergehende Keimreduktion erreicht werden, wobei in den Proben mit dem höheren TS-Gehalt eine um ca. 1 Zehnerpotenz höherer Wert nach einstündiger Erhitzung zu verzeichnen ist als bei einem TS-Gehalt von 77 % (Tab. 12).

Tabelle 11: Konzentration von *Salmonella Typhimurium* in KBE/ml bei verschiedenen Überlebenszeiten im Wasserbad bei 50 °C

Zeit (min)	Konzentration bei TS 87 %	Konzentration bei TS 76 %
0	$4,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
10	$4,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^7$
20	$4,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
30	$4,6 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$
40	$4,6 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$
50	$4,6 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

Tabelle 12: Konzentration von *Salmonella Typhimurium* in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten im Wasserbad bei 55-57 °C.

Zeit (min)	Konzentration bei TS 88 %	Konzentration bei TS 77 %
0	$8,6 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$
10	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$
20	$8,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
30	$8,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$
45	$4,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^4$
60	$4,6 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

Die Tabellen 13, 14 und 15 zeigen die Tenazität von *Enterococcus faecalis* im Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen und TS-Gehalten der Bodenproben, in das die Keimträger zur Überprüfung der Überlebensfähigkeit von *Enterococcus faecalis* eingelegt wurden. Bei 65 °C und 67 °C sind die Unterschiede im Überlebensverhalten gering, es wurden vergleichbare Ergebnisse dokumentiert. Nach 30 Minuten reduziert sich die Zahl von *Enterococcus faecalis* um 4-5 Zehnerpotenzen, diese Werte wurden auch bei einer Erhitzung über eine Stunde festgestellt (Tab. 13).

Tabelle 13: Konzentration von *Enterococcus faecalis* (KBE/ml) bei verschiedenen TS-Gehalten im Wasserbad bei 65 °C

Zeit (min)	Konzentration bei TS 87 %	Konzentration bei TS 76 %
0	$8,6 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$
10	$8,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$
20	$1,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
30	$8,6 \times 10^3$	$8,6 \times 10^3$
45	$1,8 \times 10^5$	$8,6 \times 10^4$
60	$4,6 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

Tabelle 14: Konzentration von *Enterococcus faecalis* (KBE/ml) bei verschiedenen TS-Gehalten im Wasserbad bei 67 °C

Zeit (min)	Konzentration bei TS 88 %	Konzentration bei TS 77 %
0	$3,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
10	$8,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
20	$8,6 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$
30	$4,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

Steigen die Temperaturwerte auf 70-75 °C ist innerhalb von 10 Minuten eine Keimreduktion um 6 Zehnerpotenzen zu erreichen (Tab. 15).

Tabelle 15: Konzentration von *Enterococcus faecalis* (KBE/ml) bei verschiedenen TS-Gehalten im Wasserbad bei 70-75 °C

Zeit (min)	Temp.	Konzentration bei TS 88 %	Konzentration bei TS 75 %
0	70 °C–75 °C	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
10		n. n.	$2,3 \times 10^0$
20		n. n.	n. n.
30		n. n.	n. n.

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

n. d.: nicht durchgeführt

Die Tabelle 16 dokumentiert die Ergebnisse des Verhaltens von *E. coli* bei 50 °C im Wasserbad über eine Zeitspanne von 50 Minuten bei TS-gehalten von 75 bzw. 86 %.

Während bei hohen TS-Gehalten innerhalb der Erhitzungsphase von 50 Minuten keine Reduktion an *E. coli* zu verzeichnen ist, wird innerhalb dieser Zeitspanne von 50 Minuten bei TS-Gehalten von 75 % eine Reduktion um 2 Zehnerpotenzen deutlich (Tab. 16).

Tabelle 16: Konzentration von *E. coli* (KBE/ml) bei verschiedenen TS-Gehalten im Wasserbad bei 50°C. Angaben der Konzentration der Mikroorganismen in KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 86 %	Konzentration bei TS 75 %
0	$8,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$
10	$8,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^3$
20	$1,8 \times 10^6$	$8,6 \times 10^3$
30	$8,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$
40	$4,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^3$
50	$4,6 \times 10^5$	$8,6 \times 10^3$

KBE: Koloniebildende Einheiten

TS: Trockensubstanz

Die Tabelle 17 zeigt das Verhalten von *E. coli* und *Salmonella Typhimurium* während einer Lagerzeit von 18 Monaten bei Zimmertemperatur. Ausgehend von einer Keimzahl von  $10^6$  KBE/ml zu Beginn des Versuches ist innerhalb den 18 Stunden bei beiden Mikroorganismen eine Reduktion in ihrer Anzahl um 3 Zehnerpotenzen festzustellen. Die Ergebnisse waren entscheidend für die Vorbereitung der „Keimträgerversuche“ und den Transport zu den Beprobungsstellen der großtechnischen Versuche.

Tabelle 17: Verhalten von *E. coli* und *Salmonella Typhimurium* bei Zimmertemperatur  
Ausgangswerte:  $10^6$  KBE /ml Keimsuspension)

Mikroorganismen	Zimmertemperatur	Konzentration der Mikroorganismen nach 18 h	
<i>E. coli</i>	30 °C	$7,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$
<i>Salmonella Typhimurium</i>	30 °C	$2,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$

KBE: Koloniebildende Einheiten

### 5.3 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren

#### 5.3.1 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 06.06.2002

Bei diesem Versuch wurden *Escherichia coli*, *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* mittels eines Betonmischers in Sand eingemischt. Die Zeiten der Wärmeeinwirkung waren wie folgt: 15 s, 20 s, 25 s. Die Anzahl an *E. coli* lag nach dem Einmischen in die Sandproben vor der Erhitzung bei  $> 10^6$  KBE/g; *S. Senftenberg* bei  $> 10^6$  KBE/g und *Enterococcus faecalis* bei  $> 10^7$  KBE/g.

Bei dem ersten Versuch mit dem Injektorbrenner sollten zunächst die Handhabung und Funktionalität des Gerätes geprüft werden. Die erreichten Temperaturen waren niedrig, weil nur ein kurzer Hitzekontakt mit dem Sand gegeben war. Folglich konnten nur geringe Reduktionsleistungen der untersuchten Mikroorganismen erzielt werden.

Es werden einige Ergebnisse beispielhaft zu den Keimzahlen bei unterschiedlichen Kontaktzeiten dargestellt.

#### **Proben mit *Escherichia coli* bei 15 s Wärmeeinwirkung**

Probe 1:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 3:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^6$  KBE/g Sand

**Proben mit *Escherichia coli* bei 20 s Wärmeeinwirkung:**

Probe 1:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 3:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^6$  KBE/g Sand

**Proben mit *Escherichia coli* bei 25 s Wärmeeinwirkung:**

Probe 1:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 3:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^5$  KBE/g Sand

**Proben mit *Enterococcus faecalis* bei 15 s Wärmeeinwirkung:**

Probe 1:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 3:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^6$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^6$  KBE/g Sand

**Proben mit *Enterococcus faecalis* bei 20 s Wärmeeinwirkung:**

Probe 1:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^7$  KBE/g Sand

Probe 3:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^6$  KBE/g Sand

**Proben mit *Enterococcus faecalis* bei 25 s Wärmeeinwirkung:**

Probe 1:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 3:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^4$  KBE/g Sand

Die Untersuchungen mit *Salmonella Senftenberg* brachten folgende Ergebnisse:

In Proben bei **15 s Wärmeeinwirkung** wurden folgende Salmonellenkonzentrationen erzielt:

Probe 1:  $>10^6$  KBE/g Sand

Probe 2:  $>10^6$  KBE/g Sand

Probe 3:  $>10^6$  KBE/g Sand

Probe 4:  $>10^6$  KBE/g Sand

Probe 5:  $>10^6$  KBE/g Sand

In Proben bei **20 s Wärmeeinwirkung** wurden folgende Salmonellenkonzentrationen erzielt:

Probe 1:  $>10^5$  KBE/g Sand

Probe 2:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe3:  $>10^5$  KBE/g Sand

Probe4:  $>10^5$  KBE/g Sand

Probe 5:  $10^6$  KBE/g Sand

In Proben bei **25 s Wärmeeinwirkungszeit** wurden folgende Salmonellenkonzentrationen erzielt:

Probe 1:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 2: (nicht auswertbar)

Probe 3  $>10^5$  KBE/g Sand

Probe 4:  $10^5$  KBE/g Sand

Probe 5  $>10^5$  KBE/g Sand

Aus den dargestellten Untersuchungsergebnissen wird deutlich, dass durch die geringen Kontaktzeiten der Flamme mit dem Injektorbrenner die Temperaturwerte nicht entscheidend hoch genug waren um die untersuchten Mikroorganismen auch nur annäherungsweise zu reduzieren.

### 5.3.2 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 19.06.2002

Die Tabelle 18 zeigt den Ausgangskeimgehalt nach dem Mischen im Betonmischer ohne Hitzeinwirkung und die Reduktionsrate der Keime nach der Wärmebehandlung in einer Zeit von 25, 35 und 50 sek. Die Anzahl an *E. coli*, *S. Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* nach dem Einmischen ist starken Schwankungen unterworfen (s. Tab. 18). Die Konzentrationen schwanken zwischen  $10^4$  und  $10^7$  KBE/g (*E. coli*);  $10^6$ - $10^8$  KBE/g (Salmonellen) und zwischen  $10^5$  und  $10^6$  KBE/g (*Enterococcus faecalis*).

Nach einer Hitzeinwirkung von 25 s können aus den Proben, die von der Oberfläche (0,5 - 1 cm) des Sandes genommen wurden keine *Escherichia coli* mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu reichte die Zeit der Wärmeeinwirkung von 25 s bei Proben aus der Tiefe (1,5 - 2 cm) nicht aus, um die Keime in den unteren Sandschichten abzutöten.

Salmonellen konnten in 2 von 3 der aus der oberen Schicht entnommenen Proben nicht mehr nachgewiesen werden. Bei einer Probe wurde nur eine geringe Anzahl an Mikroorganismen nachgewiesen. Die Konzentration betrug lediglich  $10^4$  KBE/g. In den unteren Sandschichten waren alle drei Proben positiv bei einer Keimzahl von  $> 10^6$  KBE/g Sand.

Tabelle 18: Anzahl an Mikroorganismen in Sandproben vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Angaben in KBE/g Sand; 3 Parallelproben)

Einwirkzeit in s	Proben	Proben - Nr.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
0	nach Mischen	1	$9,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$
		2	$4,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^6$
		3	$7,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$
25	Oberfläche	1	$3,0 \times 10^{-1}$	$9,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^4$
		2	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^2$
		3	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$2,4 \times 10^4$
25	Tiefe 1,5 –2 cm	1	$9,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$
		2	$2,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$
		3	$4,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
35 s	Oberfläche	1	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
		2	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
		3	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
35	Tiefe 1,5 –2 cm	1	$9,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^4$
		2	$4,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$
		3	$3,0 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$
50	Oberfläche	1	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
		2	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
		3	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
50	Tiefe 1,5 –2 cm	1	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$2,3 \times 10^3$
		2	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^4$
		3	$3,0 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$9,3 \times 10^4$

KBE = Koloniebildende Einheiten

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich bei zwei oberflächlich entnommenen Proben von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen und von  $10^4$  auf  $10^2$  KBE/g.

Bei Proben aus der tiefen Schicht lag die Konzentration der Keime in zwei Proben bei  $10^4$  KBE/g Sand, in einer Probe bei  $10^5$  KBE/g.

Nach einer Wärmeeinwirkung über 35 s werden in Proben aus der Oberfläche *Escherichia coli*, Salmonellen und Enterokokken in einer Konzentration von  $3,0 \times 10^{-1}$  KBE/g nachgewiesen (Tab. 18).

Bei Proben aus der tieferen Sandschicht waren sehr uneinheitliche Reduktionsraten zu verzeichnen. Während in zwei Proben die Keimzahlen für *E. coli* unverändert bei  $10^6$  registriert werden konnten, ließen sich in einer Probe keine *E. coli* mehr nachweisen.

Salmonellen und *Enterococcus faecalis* wurden um max. 2 Zehnerpotenzen gegenüber den Ausgangswerten reduziert und konnten in den Größenordnungen zwischen  $10^4$  bis  $10^6$  KBE/g Boden nachgewiesen werden (Tab. 18).

Nach 50 s Wärmeeinwirkung zeigen alle oberflächlich entnommenen Proben kein Wachstum mehr, d.h. die zugegebenen Bakterienarten wurden bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Ein in etwa vergleichbares Ergebnis lieferten die Proben aus den tiefen Schichten. Während *E. coli* und Salmonellen nicht mehr nachgewiesen werden konnten, war bei *Enterococcus faecalis* lediglich eine Reduktion um zwei bis drei Zehnerpotenzen zu erreichen.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass eine Wärmeeinwirkzeit von 50 s ausreicht, um *E. coli* und *Salmonellen* deutlich zu vermindern, während die Einwirkzeit von 50 s bei *Enterococcus faecalis* nicht ausreicht, um eine ausreichende Desinfektionswirkung zu erzielen.

#### 5.4. Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden

##### 5.4.1. Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren

###### 5.4.1.1 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 27.07.2002

Die Tabelle 19 zeigt den Ausgangswert nach dem Mischen im Betonmischer ohne Wärmeeinwirkung und die Reduktionsrate der Mikroorganismen nach der Wärmeeinwirkung von 25, 35 und 45sek bei einem Trockensubstanzgehalt von 80% und 50%.

Bei der Probenahme wurde differenziert zwischen Proben der oberen Erdschicht (0 bis 0,5cm) und den Proben der unteren Erdschicht (1,5 bis 2cm).

Von jeder Bodenschicht wurden zwei Parallelproben entnommen und untersucht.

Tabelle 19: Konzentrationen unterschiedlicher Mikroorganismen in Bodenproben vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Angaben in KBE/g Boden)  
(Versuch vom 27.07.2002)

Einwirkzeit	Probenentnahmestelle	TS-Gehalt	Proben-Nr.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>
0 s	nach dem Mischen im Betonmischer	n. d.	I	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$
			II	$9,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$
			III	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$
25 s	80 %	Oben 1	1	$3,6 \times 10^0$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^1$
		Oben 2	2	$3,0 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
		Unten 1	3	$9,2 \times 10^0$	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
		Unten 2	4	$1,5 \times 10^3$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$
	50 %	Oben 1	5	$1,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$
		Oben 2	6	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
		Unten 1	7	$7,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
		Unten 2	8	$4,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
35 s	80 %	Oben 1	9	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
		Oben 2	10	$1,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
		Unten 1	11	$4,3 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
		Unten 2	12	$9,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
	50 %	Oben 1	13	$3,0 \times 10^{-1}$	$9,3 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$
		Oben 2	14	$3,0 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$
		Unten 1	15	$3,6 \times 10^0$	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
		Unten 2	16	$2,1 \times 10^4$	$7,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
45 s	80 %	Oben 1	17	$9,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$
		Oben 2	18	$1,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
		Unten 1	19	$2,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$
		Unten 2	20	$3,6 \times 10^0$	$9,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^6$
	50 %	Oben 1	21	$3,0 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^5$	$4,3 \times 10^1$
		Oben 2	22	$3,0 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$
		Unten 1	23	$1,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
		Unten 2	24	$4,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$
Kontrolle (24 h nach dem Einmischen)		n. d.	IV	$9,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$
Bällchen aus Erde		n. d.	V	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$

KBE: = Koloniebildende Einheiten

TS: = Trockensubstanzgehalt

Bei einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem Trockensubstanzgehalt von 80 % können aus Proben, die von der Oberfläche der "Keimträgerwanne" genommen wurden, keine *Escherichia coli* mehr nachgewiesen werden.

Bei den Proben aus der Tiefe reicht die Zeit der Wärmeeinwirkung von 25 s nicht aus, um die Mikroorganismen abzutöten. Eine von zwei untersuchten Proben zeigt eine Reduktionsrate um drei Zehnerpotenzen von  $10^6$  auf  $10^3$  KBE/g Boden.

*Escherichia coli* zeigen insgesamt ein undeutliches Bild in den unteren Erdschichten bei der Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS von 80 % im Vergleich zur Reduktion bei einer Wärmeeinwirkung von 35 s und einem TS-Gehalt von 80 %.

*Enterococcus faecalis* wurden in den oberen und unteren Erdschichten in gleichen Konzentrationen ( $10^5$ ) nachgewiesen, bei einer Reduktionsrate von ca. einer Zehnerpotenz.

*Salmonellen* wurden in den oberen und unteren Erdschichten nachgewiesen.

In einer Probe aus der oberen Schicht des Sandes ist geringes Wachstum bei einer Konzentration von lediglich  $10^1$  KBE/g zu verzeichnen.

Bei einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 50 % lag die Anzahl insgesamt höher als bei einem TS-Gehalt von 80 %. Besonders deutlich zeigt sich dieser Trend in den Proben von *E. coli*.

Bei einer Wärmeeinwirkung von 35 s und einem TS-Gehalt von 80 % werden diese Mikroorganismen mit gewissen Schwankungen vergleichbar in der Höhe der Ausgangswerte nachgewiesen.

Nach einer Wärmeeinwirkung von 35 s und einem TS-Gehalt von 50 % zeigen sich in 3 von 4 Proben bei den nachgewiesenen *E. coli* deutliche Reduktionen. In einer Probe aus der unteren Schicht wurden allerdings noch Werte an *E. coli* von  $>10^4$  KBE/g Erde nachgewiesen (Tab. 19).

Die Konzentration an *Enterococcus faecalis* bei den Proben aus der Oberfläche wurde bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe um eine Zehnerpotenz von  $10^6$  auf  $10^5$  reduziert.

Die Konzentration der *Salmonellen* in einer der Proben aus der Oberfläche lag bei  $10^2$  und wurde damit um drei Zehnerpotenzen reduziert, bei der zweiten Probe um eine Zehnerpotenz. Die Anzahl der Mikroorganismen in den Proben aus der Tiefe blieb unverändert bei  $10^5$  KBE/g.

Nach einer Wärmeeinwirkung 45 s und einem TS-Gehalt von 80 % ist bei beiden Proben aus der Oberfläche die Zahl an *Escherichia coli* von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen gesunken. Bei einer Probe aus der unteren Erdschicht wurde die Konzentration von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen reduziert. Bei der Parallelprobe reduzierte sich *E. coli* von  $10^6$  auf  $10^0$ , folglich um sechs Zehnerpotenzen.

Die Konzentration der *Enterococcus faecalis* wurde bei beiden Proben der Oberfläche um zwei Zehnerpotenzen von  $10^6$  auf  $10^4$  reduziert.

Bei einer Probe aus der Tiefe hat die Anzahl um eine Zehnerpotenz von  $10^6$  auf  $10^5$ , bei der anderen Probe um zwei Zehnerpotenzen von  $10^6$  auf  $10^4$  abgenommen.

Bei *Salmonella Senftenberg* ist die Anzahl der Mikroorganismen in den Proben aus der Oberfläche in einer Probe von  $10^5$  auf  $10^3$  um zwei Zehnerpotenzen gesunken. Bei der anderen Probe ist sie bei  $10^5$  geblieben.

Bei den Proben aus der Tiefe ist keine Reduktion in der Anzahl der Mikroorganismen zu verzeichnen.

Nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und bei einem TS-Gehalt von 50 % können aus Proben, die von der Oberfläche stammen, keine *Escherichia coli* mehr nachgewiesen werden. Dagegen reicht die Zeit der Wärmeeinwirkung von 45 s bei TS-Gehalt von 50 % nicht aus, um die in tiefere Bodenschichten eingelegte *E. coli* zu inaktivieren.

Das gleiche Ergebnis wurde mit *Enterococcus faecalis* und Salmonellen erzielt. Bei 45 s Wärmeeinwirkung und bei einem TS-Gehalt von 50 % wurden diese Mikroorganismen noch in allen Erdschichten nachgewiesen.

#### 5.4.1.2. Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit dem Einmischverfahren des Versuches vom 18.10.2002

Die Tabelle 20 zeigt den Ausgangswert nach dem Mischen im Betonmischer ohne Wärmeeinwirkung und die Reduktionsrate der Mikroorganismen nach der Wärmeeinwirkung von 40, 50 und 60 s bei der Trockensubstanzwerten von 78 %.

Bei der Probennahme wurde differenziert zwischen Proben der oberen Erdschicht (0 bis 0,5cm) und den Proben der unteren Erdschicht (1,5 bis 2 cm).

Von jeder Bodenschicht wurden zwei Parallelproben entnommen und untersucht.

Zum Versuch wurden die nachstehenden Mikroorganismen verwendet: *Escherichia coli*, *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis*.

Tabelle 20: Konzentrationen unterschiedlicher Mikroorganismen in Bodenproben vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Angaben in KBE/g Boden und in KID<sub>50</sub>/ml) (Versuch vom 18.10.02 – „Einmischverfahren“)

Einwirkzeit	Temperaturspanne	Probenahmestelle	Proben-Nr.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>	Proben-Nr.	Parvo-Virus (Keimträger)
0 s		nach dem Mischen (Betonmischer)	I	$1,5 \times 10^5$	$4,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	I	$10^{5,5}$
			II	$1,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	II	$10^{5,0}$
			III	$9,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$		
40 s	oben: 45-50 °C	Oberfläche	1	$2,3 \times 10^2$	$2,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	1	$10^5$
			2	$9,2 \times 10^0$	$3,6 \times 10^3$	$7,2 \times 10^0$	2	$10^{4,5}$
							3	n. d.
							4	$10^{2,25}$
	unten: 50-60 °C	Tiefe: 1,5-2 cm	3	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	5	$10^{5,5}$
			4	$2,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	6	$10^{5,5}$
							7	n. d.
							8	n. d.
50 s	oben: 60 °C	Oberfläche	5	$4,3 \times 10^1$	$2,9 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	9	$10^{3,75}$
			6	n. n.	$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	10	$10^3$
							11	$10^5$
							12	n. d.
	unten: 55 °C	Tiefe: 1,5-2 cm	7	$4,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	13	$10^{4,5}$
			8	n. n.	$2,3 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$	14	$10^{5,5}$
							15	$10^{3,75}$
							16	n. d.
60 s	oben: 45-70 °C	Oberfläche	9	$2,3 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	17	$10^5$
			10	$9,3 \times 10^3$	$2,9 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^6$	18	$10^{4,75}$
							19	$10^{4,5}$
	unten: 45-60°C	Tiefe: 1,5-2 cm	11	$7,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	20	$10^{4,75}$
			12	$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	21	n. d.
							22	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: Koloniebildende Einheiten

KID: Kultur Infektiöse Dosis

Bei einer Wärmeeinwirkung von 40 s und einem Trockensubstanzgehalt von 78 % bei einer Probe aus der oberen Erdschicht wurde die Konzentration der *E. coli* von  $10^5$  auf  $10^0$  KBE/g um fünf Zehnerpotenzen reduziert. Bei der Parallelprobe reduzierte sich die Konzentration von  $10^5$  auf  $10^2$  KBE/g um drei Zehnerpotenzen.

Bei den Proben aus der Tiefe zeigt eine von zwei untersuchten Proben eine Reduktionsrate um zwei Zehnerpotenzen von  $10^5$  auf  $10^3$  KBE/g Boden. Bei der anderen Probe hat die Konzentration der Mikroorganismen von  $10^5$  auf  $10^1$  um vier Zehnerpotenzen abgenommen.

*Escherichia coli* zeigen insgesamt ein undeutliches Bild in ihrer Reduktion in Proben der oberen wie auch der unteren Erdschichten bei einer Wärmeeinwirkung von 40 s und einem TS von 78 %.

*Enterococcus faecalis*-Proben, die aus den oberen Erdschichten genommen wurden, zeigen Reduktionsraten: von  $10^6$  auf  $10^5$  um eine Zehnerpotenz und von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen. Bei Proben aus tieferen Schichten hat die Konzentration der Mikroorganismen nur bei einer Probe um eine Zehnerpotenz von  $10^6$  auf  $10^5$  abgenommen. Bei der anderen Probe blieb sie unverändert bei  $10^6$  KBE/g. Es zeigt sich insgesamt ein unlogisches Bild bezüglich der festgestellten Reduktionsraten.

*Salmonellen* wurden in den oberen und unteren Erdschichten ohne bedeutsame Reduktion nachgewiesen. In einer Probe der Oberfläche ist üppiges Wachstum zu verzeichnen, bei einer Konzentration von  $10^5$  KBE/g. Eine Reduktion der Salmonellen ist nicht eingetreten. Bei der anderen Probe ist ihre Konzentration von  $10^5$  auf  $10^0$ , um fünf Zehnerpotenzen gesunken. Die Konzentration bei zwei Proben, die in der Tiefe genommen wurden, blieb unverändert bei  $10^5$  KBE/g Erde.

Parvoviren zeigen ein undeutliches Bild in den Reduktionsraten, z. B. in den Proben, die oberflächlich genommen wurden, wo die Temperatur nach 60 s Hitzeeinwirkung  $70^\circ\text{C}$  erreichte. Die Reduktion der Viruskonzentration war kleiner als bei den oberflächlich genommenen Proben, bei denen die Temperatur nach 50 s Hitzeeinwirkung  $65^\circ\text{C}$  erreichte.

Bei einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 78 % wurde die Konzentration von *Escherichia coli* bei den Proben aus der Oberfläche von  $10^5$  auf  $10^1$  um vier Zehnerpotenzen, bei einer Probe um fünf Zehnerpotenzen von  $10^5$  auf  $10^0$  reduziert. In den Proben aus der Tiefe waren die Befunde im Vergleich zu den oberen Erdschichten identisch.

Die Anzahl von *Enterococcus faecalis* bei den Proben aus der Oberfläche wurde bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^5$  um eine Zehnerpotenz, und bei der zweiten Probe um zwei Zehnerpotenzen von

$10^6$  auf  $10^4$  KBE/g reduziert. Die Anzahl an *Enterococcus faecalis* bei einer von zwei aus der Tiefe genommenen Probe blieb unverändert. Bei der zweiten Probe wurde sie um zwei Zehnerpotenzen reduziert.

Die Konzentration der Salmonellen in einer Probe aus der Oberfläche lag bei  $10^5$  KBE/g und wurde damit von  $10^5$  auf  $10^4$  um eine Zehnerpotenz reduziert. Bei der zweiten Probe blieb sie unverändert bei  $10^5$  KBE/g. Bei Proben aus den tieferen Erdschichten haben sich vergleichbare Ergebnisse mit den Proben aus der Erdoberfläche ergeben.

Nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 78 % ist die Zahl der *Escherichia coli* bei einer aus der Oberfläche genommenen Probe von  $10^4$  auf  $10^3$  um eine Zehnerpotenz gesunken. Bei der Parallelprobe wurde keine Reduktion in der Zahl der *E. coli* nachgewiesen. Die Konzentration von zwei Proben aus der Tiefe blieb unverändert bei  $10^4$  KBE/g Erde.

Bei *Enterococcus faecalis* wurde keine Reduktion in der Zahl dieser Mikroorganismen beobachtet.

Bei Salmonellen wurde ebenfalls keine Reduktion dieser Erreger nachgewiesen, Aufgrund der starken Klumpenbildung des Erdbodens beim Einmischen der bakteriellen Suspension mit dem Betonmischer war eine homogene Verteilung der Bakterien nicht mehr gegeben. Bei höherem Wassergehalt verstärkt sich diese Problematik noch mehr. Dies war auch ein wichtiger Anlass, in den weiter durchgeführten Versuchen, das Einbringen der zu untersuchenden Mikroorganismen mit Hilfe der „Keimträgertechnik“ zu gewährleisten.

#### 5.4.2 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik

##### 5.4.2.1 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik des Versuches vom 25.11.2002

Die Tabelle 21 zeigt den Ausgangswert ohne Hitzeeinwirkung bei 50 % Trockensubstanz, und die Reduktionsrate der Mikroorganismen nach der Hitzeeinwirkung von 30, 45 und 60 s bei einem TS-Gehalt von 50 %. Neben der Untersuchung der Tenazität von *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und *S. Senftenberg* wurde auch die Tenazität von Parvo-Viren bei der Hitzebehandlung von Boden untersucht (Tab. 21).

Tabelle 21: Konzentrationen unterschiedlicher Mikroorganismen und Parvo-Viren in Bodenproben vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Angaben in KBE/ml bzw. KID<sub>50</sub>/ml) (Versuch vom 25.11.2002 – „Keimträgertechnik“)

Zeit der Hitzeeinwirkung	Trocken- substanz	Temperatur	<i>Parvoviren</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>
			Virenkeim-träger	Holzkeimträger		
ohne	50 %		10 <sup>5,0</sup>	2,1 x 10 <sup>9</sup>	6,7 x 10 <sup>8</sup>	3,9 x 10 <sup>8</sup>
			10 <sup>5,5</sup>	3,9 x 10 <sup>8</sup>	8,4 x 10 <sup>7</sup>	3,9 x 10 <sup>8</sup>
30 s	56 %	oben: 64 °C	10 <sup>5,5</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	3,9 x 10 <sup>7</sup>	3,9 x 10 <sup>6</sup>
		unten: 50 °C	10 <sup>5,5</sup>	8,3 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	2,1 x 10 <sup>6</sup>
		54 °C	10 <sup>4,5</sup>			
45 s	56 %	oben: 60 °C	10 <sup>3,75</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	n. n.	n. n.
		64 °C	10 <sup>4,5</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	3,2 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
		unten: 54 °C	10 <sup>4,25</sup>			
			10 <sup>4</sup>			
			10 <sup>4,5</sup>			
60 s	56 %	oben: 45 °C	10 <sup>4,25</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	3,9 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>6</sup>
		unten: 40 °C	10 <sup>4,75</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	8,4 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>
			10 <sup>2,5</sup>			
			10 <sup>5,5</sup>			
			10 <sup>5,5</sup>			
				Metallkeimträger		
ohne	50 %	s. o.	n. d.	1,9 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	8,6 x 10 <sup>6</sup>
			n. d.	4,6 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	4,6 x 10 <sup>6</sup>
30 s	56 %	s. o.	n. d.	4,8 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>6</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup>
			n. d.	8,6 x 10 <sup>3</sup>	8,6 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>4</sup>
45 s	56 %	s. o.	n. d.	8,4 x 10 <sup>4</sup>	8,6 x 10 <sup>6</sup>	n. n.
			n. d.	4,2 x 10 <sup>3</sup>	n. n.	n. n.
60 s	56 %	s. o.	n. d.	4,6 x 10 <sup>3</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup>
			n. d.	4,8 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>6</sup>	8,6 x 10 <sup>3</sup>

n. n.: unter Nachweisgrenze  
n. d.: nicht durchgeführt  
TS: Trockensubstanzgehalt

KBE: Koloniebildende Einheiten  
KID50: Kulturinfektiöse Dosis

Bei den Ergebnissen, erzielt mit der Anwendung von Holzkeimträgern zeigt sich, dass sich *Escherichia coli* nach einer Hitzeeinwirkung von 30 s und einem Trockensubstanzgehalt von 56 % um eine Zehnerpotenz von  $10^9$  auf  $10^8$  reduzierte. In einer zweiten Probe von  $10^8$  auf  $10^7$  KBE/ml.

Bei *Enterococcus faecalis* wurde nach einer Hitzeeinwirkung von 30 s und einem TS-Gehalt von 50% keine Reduktion beobachtet. Die Konzentrationen der Mikroorganismen blieben unverändert bei  $10^8$  bzw.  $10^7$  KBE/ml.

Die Konzentration der *Salmonella Senftenberg* hat nach einer Wärmeeinwirkung von 30 s und einem TS-Gehalt von 50% bei zwei Proben um zwei Zehnerpotenzen von  $10^8$  auf  $10^6$  abgenommen.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^9$  auf  $10^7$  um zwei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^8$  auf  $10^5$  KBE/ ml um drei Zehnerpotenzen.

*Enterococcus faecalis* reduzierten sich nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^8$  auf  $10^2$  um sechs Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe konnten keine *Enterococcus faecalis* mehr nachgewiesen werden.

Nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und bei einem TS-Gehalt von 56 % können aus zwei Proben keine *Salmonella Senftenberg* mehr nachgewiesen werden.

Die Konzentration von *Escherichia coli* verminderte sich in einer Probe nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 56 % um eine Zehnerpotenz von  $10^9$  auf  $10^8$  KBE/ ml. In der zweiten Probe konnte eine Reduktion der *Escherichia coli* von  $10^8$  auf  $10^5$ , also um drei Zehnerpotenzen festgestellt werden.

Bei *Enterococcus faecalis* wurde nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 56 % keine Reduktion beobachtet. Die Konzentrationen dieser Mikroorganismen blieb unverändert bei  $10^8$  und  $10^7$  KBE/ ml.

*Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^8$  auf  $10^6$  um zwei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe blieb die Anzahl unverändert bei  $10^8$  KBE/ ml.

*E. coli* verminderten sich bei einer Wärmeeinwirkung von 30 s und 45 s nur gering. Bei einer Wärmeeinwirkung von 60 s waren die erreichten Temperaturen zu niedrig, um diese Mikroorganismen zu eliminieren.

Bei *Enterococcus faecalis* hat die Zeit von 60 s Hitzeeinwirkung nicht ausgereicht, um diese Mikroorganismen abzutöten.

Salmonellen zeigen bei einer Wärmeeinwirkung von 60 sek eine größere Reduktionen als bei der Wärmeeinwirkung von 30 s.

Die Dauer der Wärmeeinwirkung bis zu 60 Sekunden hat jedoch nicht zu den erwarteten Temperaturwerten geführt. Insgesamt hat sich die Bodenmatrix in dieser Zeitspanne zu gering erwärmt, so dass nur unzureichende Reduktionen in der Zahl der untersuchten Mikroorganismen erzielt werden konnten.

Dieselbe Problematik trifft für die Parvoviren zu.

Bei den Ergebnissen mit den Metallkeimträgern konnte kein grundlegend anderes Bild festgestellt werden.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 30 s und einem TS-Gehalt von 56 % von  $10^8$  auf  $10^4$  um vier Zehnerpotenzen. Bei einer anderen Probe von  $10^8$  auf  $10^3$  um fünf Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* wurde nach einer Wärmeeinwirkung von 30 s und einem TS-Gehalt von 56 % in beiden Proben von  $10^8$  auf  $10^6$  um zwei Zehnerpotenzen reduziert. Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 30 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei beiden Proben von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^8$  auf  $10^4$  um vier Zehnerpotenzen, bei der zweiten Probe von  $10^8$  auf  $10^3$  KBE/ ml um fünf Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^8$  auf  $10^6$  um zwei Zehnerpotenzen. In der zweiten Probe konnten keine *Enterococcus faecalis* mehr nachgewiesen werden.

Bei *Salmonella Senftenberg* konnten nach einer Wärmeeinwirkung von 45 s und einem TS-Gehalt von 56 % diese Erreger ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^8$  auf  $10^4$  um vier Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^8$  auf  $10^3$  um fünf Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^8$  auf  $10^6$  um zwei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe blieb sie unverändert bei  $10^8$  KBE/ ml.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 60 s und einem TS-Gehalt von 56 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen, und bei der zweiten Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen.

Zusammenfassend lässt sich deutlich feststellen, dass eine Hitzeeinwirkungszeit von 60 s bei einem Trockensubstanzgehalt von 56 % nicht ausreichte um *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Senftenberg* merklich zu reduzieren. Unerklärlich sind jedoch die starken Reduktionen von *Enterococcus faecalis* bei einem TS-gehalt von 56 % und einer Wärmeinwirkungszeit von 45 s.

Die mit Hilfe der Propangasbrenner auf den in den Bodenblechen liegenden Versuchsboden eingebrachte Hitze hat nicht ausgereicht, Temperaturwerte zu erzielen, die eine merkliche Reduktion in der Anzahl der untersuchten „Indikatororganismen“ hätte bewerkstelligen können. Eine technische Überprüfung, insbesondere der „Brennereinheit“ an der halbtechnischen Anlage, sollte bei einem weiteren Versuch bessere Eliminationsraten bringen.

#### 5.4.2.2 Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Boden mit der Keimträgertechnik des Versuches vom 12.12.2002

Für diesen Versuch wurde Ackerboden angewandt.

Tabelle 22: Konzentrationen unterschiedlicher Mikroorganismen in Bodenproben vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Angaben in KBE/ml) Versuch vom 12.12.02 „Keimträgertechnik“

Keim-träger	Hitzeein-wirkung	Temperatur	Trocken-substanz-gehalt	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>
Holz	ohne			3,9 x 10 <sup>6</sup> 8,4 x 10 <sup>6</sup>	3,9 x 10 <sup>7</sup> 3,9 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup> 1,4 x 10 <sup>6</sup>
	25 s	oben: 60 °C unten: 40 °C	85 %	2,1 x 10 <sup>3</sup> n. n.	3,9 x 10 <sup>7</sup> 2,1 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup> 8,4 x 10 <sup>4</sup>
	50 s	oben: 60 °C unten: 50 °C	85 %	8,4 x 10 <sup>3</sup> n. d.	2,1 x 10 <sup>6</sup> 3,2 x 10 <sup>2</sup>	8,4 x 10 <sup>4</sup> n. n.
	25 s	oben: 40 °C unten: 33 °C	70 %	2,1 x 10 <sup>5</sup>	8,4 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>
	50 s	oben: 55 - 60 °C unten 40 °C	70 %	8,4 x 10 <sup>5</sup> 3,9 x 10 <sup>4</sup>	8,4 x 10 <sup>4</sup> 2,1 x 10 <sup>3</sup>	3,9 x 10 <sup>4</sup> 8,4 x 10 <sup>4</sup>
Metall	ohne			4,6 x 10 <sup>3</sup> 1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,9 x 10 <sup>6</sup> 8,6 x 10 <sup>5</sup>	4,6 x 10 <sup>6</sup> 1,9 x 10 <sup>6</sup>
	25 s	oben: 60 °C unten: 40 °C	85 %	4,6 x 10 <sup>3</sup> 4,6 x 10 <sup>3</sup>	8,6 x 10 <sup>3</sup> n. n.	1,9 x 10 <sup>4</sup> 4,6 x 10 <sup>3</sup>
	50 s	oben: 60 °C unten: 50 °C	85 %	8,4 x 10 <sup>4</sup> 4,2 x 10 <sup>3</sup>	1,9 x 10 <sup>4</sup> 1,9 x 10 <sup>4</sup>	4,2 x 10 <sup>4</sup> n. n.
	25 s	oben: 40 °C unten: 33 °C	70 %	4,6 x 10 <sup>4</sup>	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>
	50 s	oben: 55-60 °C unten: 40 °C	70 %	1,9 x 10 <sup>3</sup> 1,8 x 10 <sup>3</sup>	1,9 x 10 <sup>3</sup> 4,6 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>3</sup> 8,6 x 10 <sup>3</sup>

KBE = Koloniebildende Einheiten

n.n = nicht nachweisbar

Bei den Ergebnissen mit den Holzkeimträgern zeigt die Konzentration von *Escherichia coli* nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 85 % eine Reduktion bei einer Probe von 10<sup>6</sup> auf 10<sup>3</sup> um drei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe konnten keine *Escherichia coli* mehr nachgewiesen werden.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von 10<sup>7</sup> auf 10<sup>6</sup> um eine Zehnerpotenz. Bei der zweiten Probe blieb sie unverändert bei 10<sup>7</sup> KBE/ml.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^5$ , und bei der zweiten Probe von  $10^5$  auf  $10^4$  um je eine Zehnerpotenz.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung über 50 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen. Die zweite Probe war nicht auswertbar, da die Metallkeimträger nicht wieder auffindbar waren.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^7$  auf  $10^6$  um eine Zehnerpotenz und bei der zweiten Probe von  $10^7$  auf  $10^5$  um zwei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe wurden keine *Salmonella Senftenberg* nachgewiesen.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 70 % von  $10^6$  auf  $10^5$  um eine Zehnerpotenz.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 70 % von  $10^7$  auf  $10^5$  um zwei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei der angesetzten Probe von  $10^6$  auf  $10^5$  um eine Zehnerpotenz.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^5$  um eine Zehnerpotenz, und bei der zweiten Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei einer Probe von  $10^7$  auf  $10^4$  um drei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^7$  auf  $10^3$  um vier Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^5$  auf  $10^4$  um eine Zehnerpotenz.

Auch nach einer Überprüfung des Durchflusses bzw. des Austritts der Gasflamme aus dem Injektorbrenner erweist sich die Temperaturentwicklung in den erhitzten Bodenproben als unzureichend für eine merkliche Reduktion der untersuchten Mikroorganismen. Sowohl nach 25 s und nach 50 s Hitzeeinwirkung bei gleichem TS -Gehalt von 85 % betrug die Temperatur der Erdoberfläche im Durchschnitt nur je  $60^{\circ}\text{C}$ .

Insgesamt betrachtet waren daher die erzielten Reduktionsraten sowohl bei *Enterococcus faecalis* als auch den Salmonellen erwartungsgemäß gering.

Die Ergebnisse, die mit der Anwendung von Metallkeimträgern erzielt wurden, zeigen bei den *Escherichia coli* nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe eine Reduktion von  $10^6$  auf  $10^4$  KBE/ml, um zwei Zehnerpotenzen. Die Konzentration an *Escherichia coli* bei der zweiten Probe erwies sich als konstant bei  $10^4$  KBE/ ml.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe konnten keine *Enterococcus faecalis* mehr nachgewiesen werden.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 sek und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  KBE/ml um drei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50sek und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  KBE/ml um drei Zehnerpotenzen. In der zweiten Probe konnte das gleiche Ergebnis erzielt werden.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  um zwei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^5$  auf  $10^4$  KBE/ml um eine Zehnerpotenz.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich bei einem TS-Gehalt von 85 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  KBE/ml um zwei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe konnten keine *Escherichia coli* mehr nachgewiesen werden.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei der angesetzten Probe von  $10^6$  auf  $10^4$  KBE/ml um zwei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei der angesetzten Probe von  $10^6$  auf  $10^5$  um eine Zehnerpotenz.

Die gleiche Situation zeigte sich bei *Salmonella Senftenberg*.

Die Konzentration von *Escherichia coli* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei zwei Proben von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen. Bei der zweiten Probe blieb die Konzentration dieser Mikroorganismen ebenso bei  $10^3$  KBE/ml nachweisbar.

Die Konzentration von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach einer Wärmeeinwirkung von 50 s und einem TS-Gehalt von 70 % bei einer Probe von  $10^6$  auf  $10^3$  um drei Zehnerpotenzen und bei der zweiten Probe von  $10^5$  auf  $10^3$  KBE/ml um zwei Zehnerpotenzen.

Die Konzentration von *Salmonella Senftenberg* wurde nach einer Wärmeeinwirkung von 50s und einem TS-Gehalt von 70 % bei beiden Proben von  $10^6$  auf  $10^3$  KBE/ ml um drei Zehnerpotenzen reduziert.

Bei dem Versuch mit Metallkeimträgern haben sich *Enterococcus faecalis* bei einer Hitzeeinwirkung von 50 s weniger reduziert als bei 25 s bei gleichem Trockensubstanzgehalt von 85 %. Ein vergleichbares Bild zeigt das Ergebnis der Untersuchungen von Salmonellen. Bei der Hitzeeinwirkung von 50 s haben sich diese Mikroorganismen bei einer Probe weniger reduziert als bei der Hitzeeinwirkung von 25 s und einem TS-Gehalt von jeweils 85 %.

Bei weniger Trockensubstanz (um 70 %) und einer Hitzeeinwirkung von 50 s war die Reduktionsrate bei den drei untersuchten Bakterienarten in etwa identisch und betrug  $10^3$  KBE/ml.

## 5.5 Ergebnisse zu mikrobiologischen Untersuchungen während der Bodenerhitzung in Großversuchen

### 5.5.1 Ergebnisse zu mikrobiologischen Untersuchungen während des Einsatzes des Injektorbrenners (BVS-System)

#### 5.5.1.1 Ergebnisse zum 1. Versuch mit dem Injektorbrenner

Der Versuch wurde bei hochsommerlichen äußeren Witterungsbedingungen mit Lufttemperaturen um 27°C durchgeführt. Insgesamt gelangten dabei 20 „Metallkeimträger“, die mit *Enterococcus faecalis* „beladen“ waren, in ca. 5 cm Bodentiefe. Vor der Hitzebehandlung wurde neben der Bestimmung des Wassergehaltes des Bodens die Bodentemperatur vor und in verschiedenen Zeitabständen während und nach der Hitzeeinwirkung in verschiedenen Bodentiefen untersucht über eine Zeitspanne von insgesamt 40 Minuten (Versuchsende). Die Bodentemperatur betrug vor dem Versuch in 12cm Tiefe an einer Stelle 30°C, an einer zweiten Stelle 38°C. Die Daten zum Temperaturverhalten im Boden nach dessen Hitzebehandlung sind aus der Tabelle 23 zu entnehmen.

Trockensubstanzgehalt:

Vor der Hitzebehandlung: 89 % (Wassergehalt: 11 %)

Nach der Hitzebehandlung: 97 % (Wassergehalt: 3 %)

Bodenanalyse – Untersuchungsbefund des Bodens für „BVS“-System

Untersuchungsparameter:

Korngrößenanalyse nach DIN 19683:

Ton (<2 µm)	31,10 %
Feinschluff (2-6,3 µm)	18,90 %
Mittelschluff (6,3-20 µm)	8,10 %
Grobschluff (20-63 µm)	8,80 %
Schluff (2- 63 µm)	35,80 %
Feinsand (63-200µm)	13,20 %
Mittelsand (200-630µm)	13,90 %
Grobsand (630-2000µm)	6,00 %
Sand (63-2000µm)	33,10 %
Humus, Elementaranalyse	7,69 %

Tabelle 23: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und in Zeitabständen von 1, 15 und 40 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das „BVS-System“

Bodentiefe	Temperaturhöhen in °C nach unterschiedlicher Zeitdauer der Hitzebehandlung		
	1min	15min	40min
Oberfläche	80	80	50
	82	80	n. d.
	93	80	n. d.
	94	n. d.	n. d.
2 cm	73	n. d.	n. d.
	78	n. d.	n. d.
	90	n. d.	n. d.
	90	n. d.	n. d.
5 cm	74	n. d.	60
	90	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt

An Nullproben wurden 3 Keimträger ausgewertet. Diese wurden in gekühltem Zustand zu dem Versuch gefahren und mit den Bodenproben aus dem Erhitzungsversuch zeitgleich ausgewertet.

Die Suspension mit *Enterococcus faecalis* zum Beimpfen der Keimträger hatte eine Konzentration von  $10^9$  KBE/ml

In der Tabelle 24 sind die bakteriologischen Ergebnisse dargestellt. Sie dokumentieren die Anzahl der an *Enterococcus faecalis* von den Keimträgern zurückgewonnen Kolonien pro ml Abschüttelflüssigkeit (KBE/ml).

Tabelle 24: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis* im Boden nach der Hitze einwirkung mit dem BVS-System (1. Versuch)

Probenart	Von Keimträgern rückgewonnene <i>Enterococcus faecalis</i> (KBE/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Nullproben (vor Erhitzung)	$4,6 \times 10^8$	$8,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nach Erhitzung (in Trypton-NaCL)	n. n	n. n	n. n	n. n	n. n	n. n	$2,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$
24h nach Erhitzung (in Trypton-NaCL)	n. n	n. n	n. n	n. n	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	n. d.	n. d.

KBE: Koloniebildende Einheiten

n.d.: nicht durchgeführt

n.n nicht nachweisbar

Während für die Nullproben 3 Keimträger zur Untersuchung gelangten, konnten 8 Keimträger direkt nach der Hitze einwirkung in Trypton-NaCL-Lösung (Erhaltungsmedium) gegeben werden. Die Zahlen der Nullproben bewegten sich dabei zwischen  $10^8$  und  $10^9$  KBE/ml. In 6 von insgesamt 8 Keimträgern, die direkt nach der Hitze einwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Zahl von *Enterococcus faecalis* bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 8 bzw. 9 Zehnerpotenzen. Von 2 Keimträgern, die sofort nach der Hitze einwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, konnte *Enterococcus faecalis* noch zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KBE/ml nachgewiesen werden.

6 Keimträger gelangten erst 24h nach der Hitze einwirkung in das Erhaltungsmedium. Während auf 4 Keimträgern kein Wachstum mehr nachweisbar war, betrug die Zahl auf 2 Keimträgern  $1,8 \times 10^2$  KBE/ml (Tab. 24).

Von den ursprünglich in den Boden eingebrachten 20 Keimträgern konnten nach der Hitzebehandlung des Bodens mit dem „BVS-System“ nur noch 14 Keimträger rückgewonnen bzw. im Boden aufgefunden werden.

## 5.5.1.2 Ergebnisse zum 2. Versuch mit dem Injektorbrenner

In diesem Versuch wurden neben Fäkalstreptokokken weitere Mikroorganismen in „freier“ Suspension angewandt: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und Parvoviren (BPV-*Bovines Parvovirus*). Dazu erfolgte zusätzlich deren gleichmäßige Ausbringung von je einem Liter Suspension auf je einen Quadratmeter Boden (mit Ausnahme des BPV).

Anzahl der Mikroorganismen (KBE/ml) in den Suspensionen:

<i>E. coli</i> :	$5,9 \times 10^8$
Salmonellen:	$2,0 \times 10^9$
FKS.:	$1,4 \times 10^8$

Außerdem wurden in den Boden „offene“ und „geschlossene“ Keimträger eingebracht. Nachdem mit dem „BVS-System“ der Boden bearbeitet bzw. erhitzt wurde, erfolgte die Probenahme 90 Minuten nach der Hitzebehandlung.

Tabelle 25: Darstellung der Trockensubstanzgehalte (TS) des Bodens vor und nach der Behandlung

Substrat	TS (in %)
Boden im Standort München	
vor Erhitzung	82,8
Boden + <i>E.coli</i> -Suspension ohne Erhitzung	81
Boden + Salmonellen-Suspension ohne Erhitzung	78,6
Boden + Fäkalstreptokokken-Suspension ohne Erhitzung	78,1
Boden + <i>E. coli</i> -Suspension nach Erhitzung	89,3
Boden + Salmonellen-Suspension nach Erhitzung	88,8
Boden + Fäkalstreptokokken-Suspension nach Erhitzung	87,8

TS: = Trockensubstanzgehalt

Tabelle 26: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und Zeitabständen von 0, 1, 10, 25 und 90 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das „BVS-System“.

Bodentiefe	Temperaturhöhen in °C nach unterschiedlicher Zeitdauer der Hitzebehandlung				
	0 min	1min	10 min	25 min	90 min
2 cm	79,6	87,8	84,7	62,4	47,1
	89,3	88,2	86,5	62,5	47,4
	n. d.	88,5	86,6	63,7	47,9
	n. d.	88,7	n. d.	64,4	48,0
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	48,3
5 cm	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,7
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,9
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	47,5
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	48,0
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	48,2

n. d.: nicht durchgeführt

In der Tabelle 27 sind die bakteriologischen Ergebnisse dargestellt. Sie dokumentieren die Anzahl der an *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* von den Keimträgern zurückgewonnen Kolonien pro ml Abschüttelflüssigkeit (KBE/ml) bzw. *Bovines Parvovirus* in KID<sub>50</sub> in 100 µl.

An Nullproben wurde 2 Keimträger je angewandten „Indikatorkeim“ ausgewertet. Eine der Nullproben verblieb in gekühltem Zustand im Labor. Die zweite Nullprobe wurde ohne Kühlung mit zum Versuch gefahren.

Tabelle 27: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Bovinem Parvovirus* im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem BVS-System (2. Versuch), (Angaben in KBE/ml; Parvo-Virus in KID<sub>50</sub> in 100 µl)

Mikroorganismus	Nullproben	Rückgewinnung aus den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	4,6 x 10 <sup>5</sup> 8,6 x 10 <sup>6</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	3,0 x 10 <sup>4</sup> 4,6 x 10 <sup>3</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	7,2 x 10 <sup>1</sup>	n. d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,6 x 10 <sup>7</sup> 4,3 x 10 <sup>6</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
<i>Bovines Parvovirus</i>	10 <sup>5,25</sup> 10 <sup>4,5</sup>	n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. n.	n. d.

n. n.: nicht nachweisbar  
n. d.: nicht durchgeführt  
KBE: Koloniebildende Einheiten  
KID: Kultur Infektiöse Dosis

Während als Nullproben 2 Keimträger je Bakterienart zur Untersuchung gelangten, konnten 20 Keimträger direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung (Erhaltungsmedium) gegeben werden. Die Zahl der Nullproben bewegte sich dabei bei *E. coli* zwischen  $10^5$  und  $10^6$  KBE/ml.

In 20 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *E. coli*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war deren Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 5 bzw. 6 Zehnerpotenzen.

Die Zahlen der Nullproben bewegten sich bei *S. Typhimurium* zwischen  $10^3$  und  $10^4$  KBE/ml.

In 20 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit Salmonellen, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 4 bzw. 3 Zehnerpotenzen. Gegenüber den Ausgangswerten allerdings um 8- bzw. 9 Zehnerpotenzen. Lediglich bei einer Probe der „geschlossenen“ Keimträger waren noch eine Anzahl von  $10^1$  KBE an *S. Typhimurium* pro ml Schüttelflüssigkeit nachweisbar.

Die Zahl der Nullproben bewegten sich bei *Enterococcus faecalis* zwischen  $10^6$  und  $10^7$  KBE/ml.

In 20 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *Enterococcus faecalis*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war deren Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Im Vergleich zu den Nullproben damit um 6 bzw. 7 Zehnerpotenzen.

Die Zahlen der Nullproben bewegten sich bei *Bovinem Parvovirus* zwischen  $10^{5,25}$  und  $10^{4,5}$  KID<sub>50</sub> pro 100 µl.

In 8 von insgesamt 12 Keimträgern, beimpft mit *Bovinem Parvovirus*, war deren Anzahl bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Ergebnis der qualitativen Untersuchung des Bodens:

In Bodenproben aus der Bodenfläche, die mit den 3 Keimarten (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis*) kontaminiert wurde, war nach der Hitzebehandlung des Bodens keins dieser Mikroorganismen mehr nachweisbar (Tab. 27).

Die Konzentration der Mikroorganismen im Boden (nach Einmischung der Mikroorganismen) betrug:

<i>E. coli</i> :	$2,3 \times 10^4$ KBE/g
Salmonellen:	$2,3 \times 10^8$ KBE/g
FKS:	$2,3 \times 10^7$ KBE/g

#### 5.5.1.3 Ergebnisse zum 3. Versuch mit dem Injektorbrenner

Dieser Versuch war in der Durchführung mit dem Versuch 2 identisch. Allerdings herrschten andere äußere Bedingungen mit hohen Temperaturwerten von etwa 35°C. Nachdem der Behandlungsvorgang des Bodens mit dem „BVS-System“ beendet war, erfolgte die Probenahme 60 Minuten nach Ende der Erhitzung des Bodens.

Anzahl der Mikroorganismen KBE/ml in den Suspensionen:

<i>E. coli</i>	$2,6 \times 10^8$ KBE/ml
Salmonellen	$2,3 \times 10^8$ KBE/ml
FKS	$1,8 \times 10^8$ KBE/ml

TS (Trockensubstanz) Erde gemischt mit der Suspension der Mikroorganismen

Vor der Hitzbehandlung: 84,2%

Nach der Hitzbehandlung: 88%

Vor der Probenahme wurde die Temperatur in 2-5 cm Tiefe gemessen.

Die Tabelle 28 zeigt die Temperaturdaten während des 3. Versuches.

Tabelle 28: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen von 0, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das „BVS-System“.

Bodentiefe	Temperaturhöhen in °C nach unterschiedlicher Zeitdauer der Hitzebehandlung						
	0 min	5min	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
2 bis 5 cm	80	80	75	70	70,8	67	64
	87	n. d.	78	71,7	72	67	64
	90	n. d.	n. d.	75		68	
	90	n. d.	n. d.	n. d.			
	92	n. d.	n. d.	n. d.			

n. d.: nicht durchgeführt

In der Tabelle 29 sind die bakteriologischen Ergebnisse dargestellt. Sie dokumentieren die Anzahl der an *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* von den Keimträgern zurückgewonnen Kolonien pro ml Abschüttelflüssigkeit (KBE/ml) bzw. *Bovines Parvovirus* in KID<sub>50</sub> in 100 µl.

An Nullproben wurde 2 Keimträger je „Indikatorkeim“ ausgewertet. Eine der Nullproben wurde in gekühltem Zustand im Labor belassen und die zweite Nullprobe ist ohne Kühlung zum Versuch gefahren. Die beiden Proben wurden parallel ausgewertet.

Tabelle 29: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Bovinen Parvovirus* im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem BVS-System (3. Versuch)  
(Angaben in KBE/ml; Parvo-Virus KID<sub>50</sub> in 100 µl)

Mikroorganismus	Nullproben	Rückgewinnung aus den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	8,6 x 10 <sup>3</sup> <3 KBE/ml	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	3,2x10 <sup>6</sup> 8,6x10 <sup>3</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,6x10 <sup>5</sup> 1,9x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	+
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Bovines Parvovirus</i>	10 <sup>5,25</sup> 10 <sup>5,25</sup>	n. d.	10 <sup>1,00</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,75</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>0,00</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>2,00</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.

o: offene (Keimträger) + Nachweis möglich  
 g: geschlossene (Keimträger) n.d.: nicht durchgeführt  
 n.n.: nicht nachgewiesen  
 KBE: Koloniebildende Einheiten  
 KID: Kultur Infektiöse Dosis

Während als Nullproben 2 Keimträger je „Indikatorkeim“ zur Untersuchung gelangten, konnten 8 „offene“ und 8 „geschlossene“ Keimträger direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung (Erhaltungsmedium) gegeben werden. Die Zahlen der Nullproben bewegte sich bei *E. coli* zwischen  $10^5$  und  $<3$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *E. coli*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 5 Zehnerpotenzen.

Die Zahl der Nullproben bewegte sich bei *S. Typhimurium* zwischen  $10^3$  und  $10^6$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *S. Typhimurium*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 6 bzw. 3 Zehnerpotenzen.

Die Zahlen der Nullproben bewegten sich bei *Enterococcus faecalis* zwischen  $10^4$  und  $10^5$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *Enterococcus faecalis*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war deren Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 5 bzw. 4 Zehnerpotenzen.

Die Anzahl der Nullproben bewegte sich bei *Bovinem Parvovirus* zwischen  $10^{5,25}$  und  $10^{4,5}$  KID<sub>50</sub>

In 9 von insgesamt 12 Keimträgern, beimpft mit *Bovinem Parvovirus*, war die Anzahl bis  $10^{1,0}$ ,  $10^{1,75}$ ,  $10^0$ ,  $10^{1,5}$ ,  $10^{2,0}$ ,  $10^{1,25}$ ,  $10^{1,5}$ ,  $10^{1,5}$ ,  $10^{1,5}$  und damit um 3 bis 5 Zehnerpotenzen reduziert.

Ergebnis der qualitativen Untersuchung des Bodens:

*S. Typhimurium* wurde qualitativ nicht nachgewiesen.

*Enterococcus faecalis* wurde qualitativ in einer von 5 untersuchten Proben nachgewiesen.

Die Konzentration der Suspensionen (abgeschüttelt von den Keimträgern der „Nullproben“) hatte folgende Werte:

*E. coli*:                    8,6 x 10<sup>3</sup> KBE/ml                    (kühl gelagert)  
                                   0 KBE/ml und <3KBE/ml in München                    (nicht kühl gelagert)

Salmonellen:                3,2 x 10<sup>6</sup> KBE/ml                    (kühl gelagert)  
                                   8,6 x 10<sup>3</sup> KBE/ml und 8,6 x 10<sup>3</sup> KBE/ml in München                    (nicht kühl  
 gelagert)

FKS:                    8,6 x 10<sup>5</sup> KBE/ml, 4,6 x 10<sup>7</sup> KBE/ml                    (kühl gelagert)  
                                   1,9 x 10<sup>4</sup> KBE/ml in München                    (nicht kühl  
 gelagert)

BPV-Titer:

Virus pur:                    10<sup>7,5</sup>  
 Virus 1:10 verdünnt:        10<sup>6,75</sup>  
 Nullwert:                    10<sup>5,25</sup>, 10<sup>5,7</sup> kühl gelagert  
                                   10<sup>4,5</sup>, 10<sup>5,25</sup> in München

#### 5.5.1.4 Ergebnisse zum 4. Versuch mit dem Injektorbrenner

Im Herbst 2003 wurde der vierte Großversuch zur Bodendesinfektion mit dem Injektorbrenner durchgeführt. Der Versuch wurde auf dem gleichen Feld wie vorher durchgeführt. Allerdings auf einer anderen Versuchsfläche als die Versuche 1 bis 3 zuvor. Die zu erfassenden biologischen Parameter und die Art der Probenahme waren identisch mit dem 3. Versuch. Allerdings war der Boden war jedoch zu diesem Termin im Gegensatz zu den Versuchen zuvor in oberflächlich sehr nassem Zustand, so dass das schleppergezogene bzw. mit einem Unimog gezogene "BVS-System" nur mit Unterstützung einer Seilwinde über die Versuchsfläche zur Erhitzung des Bodens gezogen werden konnte.

Angabe zum Trockensubstanzgehalt des Bodens gemischt mit den Suspensionen der 3 Mikroorganismen in Versuch 4:

Vor der Hitzbehandlung:                    65 %  
 Nach der Hitzbehandlung:                    81,5 %

Acker vor dem Versuch, ohne Suspension

81 %

60 Minuten nachdem der Boden mit dem Injektorbrenner behandelt bzw. erhitzt worden war, erfolgte die Probenahme zur Überprüfung der vor der Erhitzung mit den Keimträgern ausgebrachten Indikatorkeime und Parvo-Viren.

Bodentemperatur vor dem Versuch: 13,5°C

Tabelle 30: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen von 0, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das „BVS-System“.

Bodentiefe	Temperaturhöhen in °C nach unterschiedlicher Zeitdauer der Hitzebehandlung					
	0 min	5min	10 min	20 min	30 min	60 min
5 cm	75	68	70	52	60	45
	75	70	72	55	60	48
	75	73	73	55	60	48
	76	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	77	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	77	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	78	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
10 cm	70	n. d.	69	n. d.	n. d.	n. d.
	70	n. d.	70	n. d.	n. d.	n. d.
	72	n. d.	70	n. d.	n. d.	n. d.
	72	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
15 cm	n. d.	n. d.	56	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n.d.: nicht durchgeführt

Tabelle 31: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Bovinen Parvovirus* im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem BVS-System (4. Versuch)  
(Angaben in KBE/ml; Parvo-Virus KID<sub>50</sub> in 100 µl)

Mikroorganismus	Nullproben	Rückgewinnung aus den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	4,6 x10 <sup>5</sup> 4,6 x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
	<3	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	+
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1,8 x10 <sup>8</sup> 4,6 x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	4,6 x10 <sup>3</sup>	+
		n. n.	4,6 x10 <sup>3</sup>	+
		n. n.	4,6x10 <sup>4</sup>	+
		n. n.	8,6 x10 <sup>2</sup>	+
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,6 x10 <sup>8</sup> 8,6 x10 <sup>7</sup>	7,2x10 <sup>1</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>	+
		n. n.	4,6x10 <sup>2</sup>	+
		n. n.	1,8x10 <sup>3</sup>	+
		n. n.	4,6 x10 <sup>2</sup>	+
		n. n.	1,8x10 <sup>3</sup>	n. d.
		n. n.	8,6 x10 <sup>2</sup>	n. d.
		n. n.	1,8 x10 <sup>4</sup>	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Bovines Parvovirus</i>	10 <sup>4,5</sup> 10 <sup>4,5</sup>	n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,00</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>0,75</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>0,75</sup>	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.

o: offene (Keimträger)  
 g: geschlossene (Keimträger)  
 - unter Nachweisgrenze  
 + Nachweis möglich  
 n.d.: nicht durchgeführt  
 n.n: nicht nachgewiesen  
 KBE: Koloniebildende Einheiten  
 KID: Kultur Infektiöse Dosis

Während für die Nullproben 3 Keimträger je Keimart zur Untersuchung gelangten, konnten 16 Keimträger direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung (Erhaltungsmedium) gegeben werden. Die Anzahl der Nullproben bewegte sich bei *E. coli* zwischen  $10^5$  und  $<3$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *E. coli*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben hat damit eine Reduktion um 5 Zehnerpotenzen stattgefunden..

Die Zahlen der Nullproben bewegten sich bei *S. Typhimurium* zwischen  $10^7$  und  $10^8$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *S. Typhimurium*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war deren Anzahl bei „offenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 8 bzw. 7 Zehnerpotenzen reduziert. Lediglich bei einer der 8 untersuchten „offenen“ Keimträgern waren die Salmonellen bei einer Konzentration von  $10^4$  nachweisbar. Die Reduktion betrug damit 4 Zehnerpotenzen. Bei den „geschlossenen“ Keimträgern bewegte sich deren Anzahl bei 4 von 8 untersuchten Proben zwischen  $10^2$  und  $10^4$  KBE/ml und ist damit im Vergleich zu den Nullproben um 4 bis 6 Zehnerpotenzen gesunken.

Die Zahl der Nullproben bewegte sich bei *Enterococcus faecalis* zwischen und  $10^7$  und  $10^8$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *Enterococcus faecalis*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war deren Anzahl bei 7 der 8 untersuchten „offenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Ein Keimträger hatte eine Anzahl von  $10^1$  KBE/ml und war damit um 7 Zehnerpotenzen reduziert. Bei den „geschlossenen“ Keimträgern bewegte sich die Anzahl bei 7 von 8 untersuchten Proben zwischen  $10^2$  und  $10^4$  KBE/ml und wurde damit im Vergleich zu den Nullproben um 4 bis 6 Zehnerpotenzen reduziert. Nur bei einem von 8 untersuchten „geschlossenen“ Keimträgern war

deren Zahl bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben hat die Anzahl der Mikroorganismen damit um 5 Zehnerpotenzen abgenommen.

Die Anzahl der Nullproben bei *Bovine Parvovirus* betrug  $10^{4,5}$ . In 6 von insgesamt 12 Keimträgern beimpft mit *Bovine Parvovirus*, betrug der Titer  $10^{1,25}$ ,  $10^{1,5}$ ;  $10^{1,0}$ ,  $10^{1,5}$ ,  $10^{0,75}$ ,  $10^{0,75}$  KID<sub>50</sub> in 100 µl. Um etwa 3 Zehnerpotenzen hat sich der Titer bei Parvo-Viren damit gegenüber den Nullproben reduziert.

Die Konzentration der Suspensionen (abgeschüttelt von den Keimträgern der „Nullproben“) hatte folgende Werte:

*E. coli*:  $1,2 \times 10^8$  KBE/ml  
 Salmonellen:  $1,1 \times 10^8$  KBE/ml  
 FKS:  $9,5 \times 10^7$  KBE/ml

BPV-Titer:

Virus pur:  $10^{7,5}$   
 Virus 1:10 verdünnt:  $10^{6,75}$   
 Nullwert:  $10^{4,5}$ ;  $10^{4,5}$  (kühl gelagert und im Labor belassen)  
 $10^{4,5}$  (zum Versuch im einer Kühlbox gefahren)

Ergebnis der qualitativen Untersuchung des Bodens:

*S. Typhimurium* wurde in allen 5 unersuchten Proben qualitativ nachgewiesen.

*Enterococcus faecalis* wurde in allen 5 untersuchten Proben qualitativ nachgewiesen.

Quantitative Untersuchung des Bodens:

Bei der Untersuchung des Bodens, der nicht artifiziell mit *E. coli* und Fäkalstreptokokken kontaminiert wurde, wurden folgende Konzentrationen als Eigenflora des Bodens ermittelt:

*E. coli*: neg; andere *Enterobacteriaceae*:  $1,1 \times 10^2$  KBE/g Boden

Salmonellen neg.

*Enterococcus faecalis*  $0,92 \times 10^1$  KBE/g Boden

## 5.5.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen während des Einsatzes der Solarfolien

### 5.5.2.1 Ergebnisse zum 1. Versuch mit Solarfolien

Am 14.04.2003 wurde auf dem Gelände der Universität Hohenheim der erste Versuch mit Solarfolien durchgeführt um die Tenazitäten der angewandten Mikroorganismen zu überprüfen. Es wurden Keimträger aus Aluminium 1cm x 5cm beimpft mit *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Typhimurium* Typ „Zoosal“ in 5cm Bodentiefe auf drei Versuchsflächen einer Wiesenfläche eingebracht.

Eine der drei Flächen wurde mit einer schwarzen Folie abgedeckt, die andere Versuchsfläche mit einer weißen Folie. Als Kontrollfläche diente eine Wiese ohne Folienabdeckung. Die Keimträger wurden vorbereitet und verarbeitet wie zuvor in den Großversuchen beschrieben (siehe Pkt. 5.5)

Tabelle 32: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis* im Boden mit Folienabdeckung (1. Versuch)  
Anzahl der Mikroorganismen in der Suspension:  $10^9$  KBE/ml  
(TS-Gehalt des Bodens ohne Folienabdeckung=76,8 %; mit Folie=80,2%)

Versuchstage	Temp. o. Folie	Temp. w. Folie	Temp. s. Folie	Nullproben	KBE/ml o. Folie	KBE/ml w. Folie	KBE/ml s. Folie
nach 13 Tagen	11°C	13°C	14°C	$4,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$ $2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$ $1,5 \times 10^6$	n.d.
nach 22 Tagen	41°C Oberfläche	42°C Oberfläche	44°C Oberfläche	n.d.	$2,3 \times 10^5$ $9,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$ $2,9 \times 10^5$	$0,4 \times 10^1$ $4,3 \times 10^4$
nach 28 Tagen	39°C (5cm) 37°C 10cm	47°C (5cm) 33°C 10cm	49°C (5cm) 44°C 10cm	$2,3 \times 10^6$	n. n. $9,3 \times 10^3$	n.d.	$7,5 \times 10^3$ $2,4 \times 10^5$
nach 35 Tagen	37°C (5cm) 35°C (10cm)	n.d.	40°C (5cm) 37°C 10cm	$4,3 \times 10^1$ $2,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^4$ $1,5 \times 10^5$	n. d.	$4,3 \times 10^2$ $4,3 \times 10^2$
nach 41 Tagen	42°C, 46°C 5cm tief	n.d.	50°C, 50°C 5cm tief	$9,2 \times 10^5$ $2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^2$ $9,3 \times 10^4$	n. d.	n. n. $9,2 \times 10^2$

n.n.: nicht nachgewiesen

n.d.: nicht durchgeführt

KBE: Koloniebildende Einheiten

o. Folie:

w.Folie:

s.Folie:

ohne Folienabdeckung

weiße Folienabdeckung

schwarze Folienabdeckung

Nach 13 Tagen betrug die Zahl von *Enterococcus faecalis* zwischen  $10^5$  und  $10^6$  KBE/ml.

Es war der erste Versuch dieser Art und es sollte zunächst in Erfahrung gebracht werden, ob durch die Folienabdeckung im Vergleich zu nicht folieabgedeckten Versuchsfläche sich die dort ausgebrachten Mikroorganismen in ihren Überlebenszeiten unterscheiden.

Bei Temperaturen von 11°C (ohne Folie) und 13°C (unter der weißen Folie) waren nach 13 Tagen keine Unterschiede in der Reduktion der Anzahl der *Enterococcus faecalis* zu verzeichnen. 22 Tage später waren bei 41°C (ohne Folie) und bei 42°C (weiße Folie) ebenfalls keine Unterschiede zu sehen. Unter der schwarzen Folie war jedoch bei Temperaturwerten von

44°C die Reduktion der *Enterococcus faecalis* von  $10^6$  auf  $10^1$  bis  $10^5$  um 1 bis 5 Zehnerpotenzen größer als bei 41°C und 42°C

Nach 28 Tagen hat man bei Temperaturwerten von 49°C eine Zunahme von *Enterococcus faecalis* in Bodenproben unter der schwarzen Folie beobachten können. Im Vergleich zur Vorwoche stieg die Anzahl der *Enterococcus faecalis* von  $10^1$  bzw.  $10^4$  auf  $10^3$  und  $10^5$  KBE/g. Nach 35 Tagen wurden bei 40°C unter der schwarzen Folie in 5 cm Bodentiefe Werte von  $4,3 \times 10^2$  in den beiden Parallelproben registriert. Auf der Versuchsfläche ohne Folienabdeckung hingegen variierte die Anzahl der *Enterococcus faecalis* nach 35 Tagen bei 37°C in 5 cm Bodentiefe zwischen  $10^4$  und  $10^5$  KBE/g Boden. 41 Tage nach Versuchsbeginn wurden bei 50 °C unter der schwarzen Folie in 5 cm Bodentiefe  $9,2 \times 10^2$  KBE/g in einer Probe nachgewiesen. In der Parallelprobe konnten keine *Enterococcus faecalis* mehr festgestellt werden. Ohne Folienabdeckung hingegen wurden bei 42°C bis 46°C in 5 cm Bodentiefe  $10^2$  bzw.  $10^4$  KBE/g Boden nachgewiesen.

Innerhalb 41 Tage hat sich die Anzahl der *Enterococcus faecalis* unter der schwarzen Folie im Vergleich zu den Ausgangswerten von  $10^6$  auf  $10^2$  um 4 Zehnerpotenzen reduziert. In der Parallelprobe reduzierten sich *Enterococcus faecalis* von  $10^6$  KBE/g bis unter die Nachweisgrenze und damit um 6 Zehnerpotenzen. Auf der nicht folienabgedeckten Vergleichsfläche reduzierten sich *Enterococcus faecalis* innerhalb von 41 Tagen von  $10^6$  auf  $10^4$  und  $10^2$  und damit um 2 bis 4 Zehnerpotenzen.

Tabelle 33: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Salmonella Typhimurium* Typ "Zoosal" im Boden mit Folienabdeckung (1. Versuch)  
Anzahl der Mikroorganismen in der Suspension:  $10^9$  KBE/ml  
(TS-Gehalt des Bodens ohne Folienabdeckung=76,8 %; mit Folie=80,2%)

Versuchstage	Nullproben	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml ohne Folie	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml weiße Folie	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml schwarze Folie
13 Tage	<math>10^3</math>	9,3 x $10^1$ 0,92 x $10^1$	n. n. 4,3 x $10^1$	n. d.
22 Tage	2,4 x $10^2$ 4,6 x $10^3$	2,1 x $10^1$ 0,9 x $10^2$	n.d.	2,3 x $10^1$ 4,3 x $10^1$
28 Tage	n. n. 1,5 x $10^1$	n. d.	n. d.	n. n. n. n.
35Tage	4,3 x $10^1$ 2,3 x $10^1$	n. d.	n. d.	n.n. 4,3 x $10^1$

n.n.: nicht nachweisbar  
n.d.: nicht durchgeführt  
KBE: Koloniebildende Einheiten

Nach 13 Tagen konnten in der Nullprobe noch  $<10^3$  KBE/ml *Salmonella Typhimurium* nachgewiesen werden. Auf der nicht folienabgedeckten Wiesenfläche betrug die Anzahl von *Salmonella Typhimurium* noch  $10^1$  KBE/ml. Das gleiche Ergebnis konnte in einer Probe der mit weißer Folie abgedeckten Fläche erzielt werden, während in der Pralleprobe kein Nachweis mehr gelang.

22 Tage nach Versuchsbeginn bewegten sich die Zahlen für *Salmonella Typhimurium* in den Nullproben zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KBE/ml. Die Proben aus der nicht abgedeckten Fläche wiesen Zahlen zwischen  $10^1$  und  $10^2$  KBE/ml auf, auf der mit schwarze Folie abgedeckten Versuchsfläche halten die Zahlen einen Wert von  $10^1$  KBE/ml. Sie waren damit im Vergleich zu den Nullproben um 1 bis 2 Zehnerpotenzen reduziert.

Am 28. Tag bewegten sich die Zahlen der Nullproben zwischen 0 und  $10^1$  KBE/ml, wobei unter der schwarzen Folie bei zwei untersuchten Proben keine Salmonellen nachgewiesen werden konnten.

Am 35. Tag nach Versuchsbeginn betrug die Anzahl der Salmonellen in der Nullprobe noch  $> 10^1$  KBE/ml und waren damit in der gleichen Größenordnung wie die Anzahl der Salmonellen auf der mit schwarzer Folie abgedeckten Versuchsfläche (Tab. 33).

Bei zwei Proben aus der Fläche mit der schwarzen Folie war die Keimzahl 0 und  $10^1$  KBE/ml.

Tabelle 34: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Folienversuchen

Folie	Bodentiefe	Datum der Temperaturmessung						
		15.04.03	17.04.03	05.05.03	06.05.03	12.05.03	20.05.03	26.05.03
ohne	oberflächlich	23 °C	22 °C	40 °C	41 °C	n. d.	n. d.	n. d.
		26 °C	23 °C					
	2 cm	16 °C	19 °C	n. d.				
		16 °C	19 °C					
5 cm	13 °C	12 °C	n. d.	n. d.	39 °C	37 °C	42 °C	
	13 °C							
10 cm	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	37 °C	35 °C	n. d.	
weiss	oberflächlich	18 °C	22 °C	50 °C	42 °C	n. d.	n. d.	n. d.
	2 cm	16 °C	16 °C	n. d.				
	5 cm	14 °C	13 °C	n. d.				
	10 cm	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
schwarz	oberflächlich	14 °C	14 °C	56 °C	44 °C	n. d.	n. d.	n. d.
	2 cm	10 °C	10 °C	n. d.				
	5 cm	9 °C	9 °C	n. d.	n. d.	49 °C	40 °C	50 °C
	10 cm	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	44 °C	37 °C	50 °C

n. d.: nicht durchgeführt

ab dem 05.05.03 wurden die Temperaturen mit Maximalthermometer gemessen

#### 5.5.2.2 Ergebnisse zum 2. Versuch mit Solarfolien

Am 23.06.2003 wurde auf dem Gelände der Universität Hohenheim ein 2. Versuch mit Solarfolien durchgeführt, um die Tenazitäten ausgewählter Mikroorganismen zu überprüfen. Es wurden Keimträger aus Aluminium 1cm x 5cm beimpft mit *Enterococcus faecium* 13, *Salmonella Typhimurium* Typ „Zosal“, *E. coli* 63; Typ k12 und Parvoviren in Plastikhütchen 5 cm tief in den Boden auf zwei Versuchsflächen einer Wiese gebracht. Die Keimträger wurden so vorbereitet, beimpft und untersucht wie Pkt. 3.6 beschrieben.

Tabelle 35: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Salmonella Typhimurium* Typ "Zoosal" im Boden unter Solarfolien (2. Versuch)

Versuchstage	Temperatur ohne Folie	Temperatur schwarze Folie	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml Nullproben	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml ohne Folie	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml schwarze Folie
7 Tage	39°C	35°C	n. n. 3,0 x 10 <sup>3</sup>	9,2 x 10 <sup>3</sup>	n. n.
14 Tage	53°C	40°C	1,8 x 10 <sup>3</sup> 1,8 x 10 <sup>3</sup>	n. n.	n. n.
21 Tage	>50°C	>53°C	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
28 Tage	45°C	53°C	1,8 x 10 <sup>2</sup> 7,2 x 10 <sup>1</sup>	+	+

n.n.: nicht nachgewiesen

n.d.: nicht durchgeführt

+ nur qualitativ nachweisbar

KBE: Koloniebildende Einheiten

In einer von zwei Parallelproben der Nullprobe konnten nach 7 Tagen Lagerungszeit im Labor keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden. In der anderen Probe betrug die Zahl von *Salmonella Typhimurium* 10<sup>3</sup>KBE/ml (Tab. 35).

Während die Temperaturwerte im Verlaufe der Untersuchungen über 50 C anstiegen konnten nach 14 und 21 Tagen Untersuchungszeitraum keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden.

Am 28. Tag wurden *S. Typhimurium* dann wieder in beiden Parallelproben qualitativ nachgewiesen (Tab. 35).

Aus Tabelle 36 wird das Ergebnis der Versuche zum Einsatz der Solarfolien hinsichtlich der Tenazität von *Enterococcus faecalis* ersichtlich. 7 Tage nach Versuchsbeginn betrug die Anzahl an *Enterococcus faecalis* in den Nullproben 10<sup>6</sup>KBE/ml (Tab. 36).

Tabelle 36: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis* im Boden unter Solarfolien (2. Versuch)

Versuchs-Tage	Temperatur ohne Folie	Temperatur schwarze Folie	<i>Enterococcus faecalis</i> KBE/ml Nullproben	<i>Enterococcus faecalis</i> KBE/ml ohne Folie	<i>Enterococcus faecalis</i> KBE/ml schwarze Folie
7 Tage	39°C	35°C	3,0 x 10 <sup>6</sup> 3,0 x 10 <sup>6</sup>	9,2 x 10 <sup>4</sup> 6,2 x 10 <sup>5</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup> 9,2 x 10 <sup>5</sup>
14 Tage	53°C	40°C	8,6 x 10 <sup>6</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>
21 Tage	>50°C	>53°C	4,6 x 10 <sup>7</sup> n. n.	2,3 x 10 <sup>4</sup> 4,6 x 10 <sup>5</sup>	8,6 x 10 <sup>5</sup> 8,6 x 10 <sup>5</sup>
28 Tage	45°C	53°C	2,3 x 10 <sup>5</sup> 4,6 x 10 <sup>7</sup>	0,7 x 10 <sup>2</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup> 8,6 x 10 <sup>5</sup>

n.n.: nicht nachgewiesen

n.d.: nicht durchgeführt

+ nur qualitativ nachweisbar KBE: Koloniebildende Einheiten

Während der insgesamt 28 Tage Untersuchungszeitraum haben sie die Zahlen der *Enterococcus faecalis* nur geringgradig verändert. Auf der nicht mit Folie abgedeckten Versuchsfläche reduzierte sich *Enterococcus faecalis* nach 14 Tagen unter 10<sup>3</sup> KBE/ml. Am 14. Tag war eine Zunahme erkennbar wobei am 28. Tag noch *Enterococcus faecalis* in der Größenordnung von 10<sup>2</sup> KBE/ml nachgewiesen werden konnten. Die Anzahl der *Enterococcus faecalis* haben sich dagegen auf der Versuchsfläche mit der schwarzen Folie gegenüber den Ausgangswerten bis zum Versuchsende nur unwesentlich verändert (Tab. 36).

Tabelle 37 dokumentiert die Ergebnisse der Tenazität von *E. coli* im Boden im 2. Solarfolienversuch. Auffallend ist das negative Resultat von *E. coli* in den Nullproben ab dem 7. bis zum 35 Untersuchungstag. Auf der nicht folienabgedeckten Fläche findet bis zum 14. Tag zunächst eine Abnahme der *E. coli* auf den Keimträgern statt. Am 21. Tag kann dann eine Größenordnung von 7,2 x 10<sup>3</sup> KBE/ml nachgewiesen werden. Am 28. und 35. Tag nach Versuchbeginn war dann allerdings *E. coli* auf beiden Keimträgern jeweils nicht mehr nachweisbar. Die mit schwarzer Folie abgedeckte Fläche zeigt auf den Keimträgern zunächst eine Zunahme der auf den Keimträgern befindlichen *E. coli* bis zum 21. Tag. Am 28. und 35.

Tag konnten dann jeweils keine *E. coli* mehr von den Keimträgern rückgewonnen werden (Tab. 37).

Tabelle 37: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *E. coli* 63; Typ k12 im Boden unter Solarfolien (2. Versuch)

Versuchs-Tage	Temperatur ohne Folie	Temperatur schwarze Folie	<i>E. coli</i> 63 Typ K12 KBE/ml Nullproben	<i>E. coli</i> 63 Typ K12 KBE/ml ohne Folie	<i>E. coli</i> 6 Typ K12 KBE/ml schwarze Folie
7 Tage	39°C	35°C	n. n. n. n.	$4,8 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$
14 Tage	53°C	40°C	n. d.	$4,3 \times 10^1$	$8,6 \times 10^3$
21 Tage	>50°C	>53°C	n. d.	$7,2 \times 10^3$	$4,6 \times 10^4$
28 Tage	45°C	53°C	n. d.	n. d.	n. d.
35 Tage	44°C	52°C	n. d.	n. d.	n. d.

n.n.: nicht nachgewiesen

n.d.: nicht durchgeführt

+ nur qualitativ nachweisbar KBE: Koloniebildende Einheiten

Der Titer von den zwei eluierten Nullproben bewegte sich zwischen  $10^{4,25}$  und  $10^{4,5}$  KID<sub>50</sub> in 100 µl.

Am 7. Tag wurden höhere Werte registriert während dann am 21. Tag nur ein Titer von  $10^{2,25}$  gemessen wurde (Tab. 38). Auf den folienabgedeckten Versuchsfläche hat sich bis zum 21. Tag BPV reduziert, wobei in zwei Parallelproben Titer von  $10^{1,5}$  und  $10^{2,5}$  registriert werden konnten. Vom 28. und 35. Untersuchungstag liegen keine Ergebnisse vor.

Tabelle 38: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Bovinem Parvovirus* (BPV) im Boden unter Solarfolien (2. Versuch) Parvo-Virus KID<sub>50</sub> in 100 µl

Versuchs-Tage	Temperatur ohne Folie	Temperatur schwarze Folie	<i>Bovines Parvovirus</i> Nullproben KID <sub>50</sub> in 100 ml	<i>Bovines Parvovirus</i> ohne Folie KID <sub>50</sub> in 100 ml	<i>Bovines Parvovirus</i> schwarze Folie KID <sub>50</sub> in 100 ml
0 Tage			Virus pur: 10 <sup>6,75</sup> 0-Probe: 10 <sup>4,25</sup> 10 <sup>4,5</sup>		
7 Tage	39°C	35°C	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>2,75</sup>	10 <sup>4,5</sup>
14 Tage	53°C	40°C	10 <sup>4,75</sup> 10 <sup>5,0</sup>	10 <sup>3,0</sup>	10 <sup>3,5</sup>
21 Tage	>50°C	>53°C	10 <sup>2,25</sup>	n. d.	10 <sup>1,5</sup> 10 <sup>2,5</sup>
28 Tage	45°C	53°C	n. d.	n. d.	n. d.
35 Tage	n.d	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n.d.: nicht durchgeführt

KID: Kultur Infektiöse Dosis

### 5.5.2.3 Ergebnisse zum 3. Versuch mit Solarfolien

Es wurde ein 3. Versuch mit Salmonellen zur Überprüfung deren Tenazität durchgeführt. Die Versuchsanstellung als auch dessen Durchführung waren identisch mit dem Versuch 2. Die Keimträger wurden in wöchentlichen Abstand aus dem Boden entnommen und untersucht (Tab. 39).

Tabelle 39: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Salmonella Typhimurium* Typ "Zoosal" im Boden unter Solarfolien. 3. Versuch.

Versuchs-Tage	Temperatur ohne Folie	Temperatur schwarze Folie	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml Nullproben	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml ohne Folie	<i>Salmonella Typhimurium</i> KBE/ml schwarze Folie
0- Tage	44°C	52°C	9,2 x 10 <sup>5</sup> 4,8 x 10 <sup>5</sup>	n. d.	n. d.
7 Tage	52°C	55°C	1,8 x 10 <sup>5</sup> 4,6 x 10 <sup>4</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup> 4,6 x 10 <sup>6</sup>	4,6 x 10 <sup>6</sup> 8,6 x 10 <sup>5</sup>
14 Tage	52,5°C	>55°C	1,8 x 10 <sup>3</sup> 8,6 x 10 <sup>3</sup>	8,6 x 10 <sup>5</sup> 8,6 x 10 <sup>4</sup>	8,6 x 10 <sup>5</sup> 4,6 x 10 <sup>3</sup>
21 Tage	50°C	>50°C	4,6 x 10 <sup>3</sup> 8,6 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>4</sup> 4,6 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup> 8,6 x 10 <sup>3</sup>
28 Tage	50°C	>50°C	1,8 x 10 <sup>3</sup> n. n.	4,6 x 10 <sup>5</sup> 4,6 x 10 <sup>5</sup>	8,6 x 10 <sup>3</sup> n. d.
35 Tage	43°C	>50°C	n. n. n. n.	1,8 x 10 <sup>5</sup> 4,6 x 10 <sup>5</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup> 1,8 x 10 <sup>5</sup>

n. n.: nicht nachgewiesen

n. d.: nicht durchgeführt

+ nur qualitativ nachweisbar

KBE: Koloniebildende Einheiten

Ausgehend von  $> 10^5$  KBE/ml an Salmonellen in der Nullprobe zu Versuchsbeginn fand bis zum 28. Untersuchungstag eine Abnahme bis ca.  $10^3$  KBE/ml statt. Salmonellen haben sowohl auf der folienabgedeckten als auch nicht abgedeckten Fläche bei relativ hoher Anzahl von  $> 10^5$  KBE/ml bis zum 28. Tag überlebt (Tab. 39).

### 5.5.3 Ergebnisse zu den mikrobiologischen Untersuchungen während des Einsatzes eines Dämpfungsgerätes

Am 17.09.2003 wurde der erste Großversuch zur Bodendämpfung mit einem Dämpfungsgerät in der Nähe von Stuttgart durchgeführt. Der Versuch hat auf einem Feld mit leichtem Boden (Löß-Lehm) stattgefunden. Die untersuchten biologischen Parameter, der Versuchsansatz und die Art der Probenahmen in diesem Versuch waren identisch mit den Versuchen des Injektorbrenners (siehe Pkt. 4.3.1).

Der Versuch wurde bei guten Witterungsbedingungen mit Lufttemperaturen um  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt. Vor der Hitzebehandlung wurde neben der Bestimmung des Wassergehaltes des Bodens, die Bodentemperatur in verschiedenen Zeitabständen während und nach der Hitzeeinwirkung in verschiedenen Bodentiefen untersucht über eine Zeitspanne von insgesamt 40 Minuten (Versuchsende). Die Bodentemperaturen sind aus der nachfolgenden Tabelle 40 zu entnehmen.

In dem Versuch wurden neben den *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und Parvoviren (BPV-Bovine Parvovirus) als Indikatororganismen eingesetzt.

In den Boden wurden „offene“ und „geschlossene“ Keimträger eingebracht. Zusätzlich erfolgte die Anwendung einer Suspension der 3 Mikroorganismenarten.

TS (Trockensubstanz) Erde gemischt mit der Keimsuspension

Vor der Hitzebehandlung:	82%
Nach der Hitzebehandlung:	88,%
Acker vor dem Versuch, ohne Suspension	93%

Tabelle 40: Temperaturschema nach 20 minütigem Dämpfen, die Temperaturen wurden erst nach dem Ende des Dämpfungsvorgangs gemessen

Bodentiefe	Temperaturhöhen in °C nach unterschiedlicher Zeitdauer der Hitzebehandlung			
	0 min	15 min	30 min	45 min
5 cm	96	88,8	82	67
	97	90	83	78
	97	93	86	83,7
	97	n. d.	n. d.	n. d.
	98	n. d.	n. d.	n. d.
10 cm	95	n. d.	n. d.	n. d.
	95	n. d.	n. d.	n. d.
	96	n. d.	n. d.	n. d.
	96	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
15 cm	92	73	77	60
	97,8	84	78	73
	n. d.	91,9	81	82
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt

Tabelle 41: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Tenazität von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Bovinem-Parvovirus* im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem Dämpfungsgerät

Mikroorganismus	Nullproben	Rückgewinnung aus den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	4,6 x 10 <sup>4</sup> 8,6 x 10 <sup>4</sup> 4,6 x 10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1,8 x 10 <sup>8</sup> 4,6 x 10 <sup>7</sup> 1,8 x 10 <sup>8</sup>	n. d.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,6 x 10 <sup>7</sup> 1,8 x 10 <sup>8</sup> 8,6 x 10 <sup>7</sup>	n. d.	n. n.	+
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. n.	n. n.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Bovines Parvovirus</i>	10 <sup>4,5</sup> 10 <sup>4,5</sup>	n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,25</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>1,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>0,50</sup>	n. d.
		n. d.	10 <sup>0,50</sup>	n. d.
		n. d.	*	n. d.

o: offene (Keimträger)  
 g: geschlossene (Keimträger)  
 \* nicht auswertbar  
 + Nachweis möglich  
 n.d.: nicht durchgeführt  
 n.n.: nicht nachgewiesen  
 KID: Kultur Infektiöse Dosis  
 KBE: Koloniebildende Einheiten

Während für die Nullproben 3 Keimträger je Mikroorganismenart zur Untersuchung gelangten, konnten 8 Keimträger direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung (Erhaltungsmedium) gegeben werden. Die Zahl der Nullproben bewegte sich dabei bei *E. coli* um  $10^4$  KBE/ml.

In 20 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *E. coli*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 4 Zehnerpotenzen.

Die Zahl der Nullproben bewegte sich bei *S. Typhimurium* zwischen  $10^8$  und  $10^7$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *S. Typhimurium*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Im Vergleich zu den Nullproben damit um 8 bzw. 7 Zehnerpotenzen.

Die Zahlen der Nullproben bewegten sich bei *Enterococcus faecalis* zwischen  $10^7$  und  $10^8$  KBE/ml.

In 16 von insgesamt 24 Keimträgern beimpft mit *Enterococcus faecalis*, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Keimzahl bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Im Vergleich zu den Nullproben damit um 8 bzw. 7 Zehnerpotenzen.

Der Titer der zwei Nullproben war bei *Bovinem Parvovirus*  $10^{4,5}$

Bei 4 von 9 untersuchten Proben war der Titer  $10^{1,25}$  nach der Hitzebehandlung und bei 2 von 8 untersuchten Proben war der Titer  $10^{1,5}$  nach der Hitzebehandlung und damit um 3 Zehnerpotenzen reduziert. Bei zwei untersuchten Proben zeigte sich der Titer  $10^{0,5}$  und eine Probe war nicht auswertbar.

Konzentration der Mikroorganismen in 1 L Suspension:

<i>E. coli</i> :	$8,5 \times 10^8$ KBE/ml
Salmonellen:	$7,6 \times 10^8$ KBE/ml
FKS.:	$4,6 \times 10^8$ KBE/ml

Die Konzentration der Keimsuspension (abgeschüttelt von den Keimträgern der „Nullproben“) hatte folgende Werte:

<i>E. coli</i> :	8,6 x 10 <sup>4</sup> KBE/ml
Salmonellen:	1,8 x 10 <sup>8</sup> KBE/ml
FKS:	8,6 x 10 <sup>7</sup> KBE/ml

BPV-Titer:

Virus pur: 10<sup>6,75</sup>

Virus 1:10 verdünnt: 10<sup>5,75</sup>

Nullwert: 10<sup>4,5</sup>, 10<sup>4,5</sup> (kühl gelagert und im Labor belassen)

Ergebnis der qualitativen Untersuchung des Bodens:

Nach der Hitzebehandlung mit Suspensionen sind *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* unter die Nachweisgrenze reduziert. Lediglich in einer von 5 untersuchten Proben war *Enterococcus faecalis* in geringer Anzahl nachweisbar.

#### 5.5.4 Ergebnisse zu den mikrobiologischen Untersuchungen bei der Kalkanwendung

Die Ergebnisse der Kalkanwendung zum Zwecke der Inaktivierung von ausgewählten Mikroorganismen sind am Beispiel des „Keimträgerversuches“ (Tab. 42) sowie am Beispiel des „Suspensionsversuches“ (Tab. 43) dargestellt.

Auf jeweils genau einem Quadratmeter Fläche wurden je 0,8 kg Ca(OH)<sub>2</sub>/m<sup>2</sup> und 1,6 kg Ca(OH)<sub>2</sub>/m<sup>2</sup> in 3 Wiederholungen exakt ausgebracht. Anschließend wurden die Versuchsflächen mit einer üblichen landwirtschaftlichen Bodenfräse 5 cm tief gefräst und anschließend sofort jeweils 5 Keimträger mit den 3 angewandten Mikroorganismen in die gekalkten Versuchsflächen ca. 3,5 cm tief eingebracht. Parallel dazu erfolgte die Messung des pH-Wertes. Die erhaltenen Ergebnisse sind aus der Tabelle 42 ersichtlich.

Der pH-Wert betrug auf den Flächen mit der geringeren Kalkmenge 11,4, auf der höher gekalkten Fläche pH 11,7. Die Keimträger wurden am 1. 2. und 6. Tag nach Versuchsbeginn entnommen und auf die Überlebensfähigkeit der „Indikatororganismen“ untersucht. Am 6. Tag nach dem Einmischen des Kalkes wurden die Versuchsflächen bis in ca. 15 cm Tiefe erneut umgefräst und danach der pH-Wert des Bodens auf den Versuchsflächen gemessen.

Wie aus Tabelle 42 ersichtlich ist, konnten *E. coli* ab dem 1. Versuchstag auf allen Keimträgern und in beiden Versuchsvarianten nicht mehr nachgewiesen werden. Die Salmonellen reduzierten sich gegenüber den Ausgangswerten um 2 bis 3 Zehnerpotenzen, unabhängig der angewandten Kalkmenge. *Enterococcus faecalis* wurde bei der Versuchsvariante mit 0,8 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$  gegenüber den Nullproben nur geringgradig reduziert. Bei der doppelten Kalkmenge sind die Reduktionen bei *Enterococcus faecalis* gegenüber den Nullwerten innerhalb von 24 Stunden Einwirkzeit deutlicher (Tab. 42). Während nicht mehr von allen Keimträgern Salmonellen zurückgewonnen werden konnten waren jeweils 2 Keimträger mit *Enterococcus faecalis* nicht wieder auffindbar.

Am 2. Untersuchungstag konnten nur noch von einem von 5 Keimträgern Salmonellen in der Größenordnung von  $8,6 \times 10^2$  KBE/ml rückgewonnen werden und zwar in beiden Kalkvarianten. Die Zahl von *Enterococcus faecalis* hat sich wenig verändert. Der pH-Wert betrug in der Kalkvariante (0,8 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$ ) 9,88 und in der Variante 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$  11,4.

6 Tage nach Versuchsbeginn (144 h) wurden nur noch auf einem Keimträger Salmonellen in der Größenordnung von  $8,6 \times 10^2$  KBE/ml nachgewiesen und zwar in der Variante mit geringerem Kalkeinsatz (Tab. 42). *Enterococcus faecalis* waren hingegen in der Variante mit dem geringeren Kalkeinsatz auf allen Keimträgern in den Größenordnungen zwischen  $> 10^4$  KBE/ml und  $> 10^6$  KBE/ml nachweisbar. Bei der Variante mit 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$  konnten nur noch auf 3 Keimträgern *Enterococcus faecalis* zwischen  $10^2$  KBE/ml und  $10^3$  KBE/ml nachgewiesen werden. Am 6. Tag wurden wie oben beschrieben die Versuchsflächen bis ca. 15 cm Bodentiefe umgefräst und der pH-Wert in beiden Kalkvarianten gemessen. Dies lag bei pH 7,3 (geringe Kalkvariante) und pH 8,5 (höhere Kalkvariante, Tab. 42).

Der TS-Gehalt des Bodens betrug zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns 86 %, bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Bodentemperatur von 11 °C.

Tabelle 42: Ergebnisse zur Tenazität von *Escherichia coli*, *S. Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Kalk (0,8 kg und 1,6 kg Ca(OH)<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>. (jeweils 5 Keimträger pro Mikroorganismenart und Beprobungstag) – Keimträgerversuch - (Angaben in KBE/ml)

Tage	Untersuchte Mikroorganismen									pH	
	Null-Proben			0,8 kg Ca(OH) <sub>2</sub> /m <sup>2</sup>			1,6 kg Ca(OH) <sub>2</sub> /m <sup>2</sup>			0,8 kg Kalk/m <sup>2</sup>	1,6 kg Kalk/m <sup>2</sup>
				KT			KT				
	<i>E. coli</i>	<i>Salm.Th.</i>	<i>E. fc.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Salm.Th.</i>	<i>E. fc.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salm.Th.</i>	<i>E. fc.</i>		
0	4,6x10 <sup>5</sup>	8,6x10 <sup>6</sup>	8,6x10 <sup>7</sup>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	11,4	11,7
	4,6x10 <sup>5</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>8</sup>								
1				n. n.	8,6x10 <sup>5</sup>	3,0x10 <sup>6</sup>	n. n.	8,6x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>5</sup>	11,3	11,9
				n. n.	7,7x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>6</sup>	n. n.	7,7x10 <sup>2</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>		
				n. n.	7,7x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>5</sup>	n. n.	4,3x10 <sup>2</sup>	7,2x10 <sup>2</sup>		
				n. n.	n. n.	*	n. n.	n. n.	*		
				n. n.	n. n.	*	n. n.	*	*		
2				n. n.	8,6x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	n. n.	8,6x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	9,88	11,4
				n. n.	n. n.	4,6x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	3,0x10 <sup>6</sup>		
				n. n.	n. n.	4,6x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	8,6x10 <sup>3</sup>		
				n. n.	n. n.	*	n. n.	n. n.	*		
				n. n.	n. n.	*	n. n.		*		
6				n. n.	8,6x10 <sup>2</sup>	8,6x10 <sup>6</sup>	n. n.	n. n.	4,6x10 <sup>2</sup>	8,1	9,3
				n. n.	n. n.	1,4x10 <sup>5</sup>	n. n.	n. n.	4,6x10 <sup>2</sup>		
				n. n.	n. n.	4,6x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	8,6x10 <sup>3</sup>		
				n. n.	n. n.	1,8x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	n. n.		
				n. n.	n. n.	4,6x10 <sup>4</sup>	n. n.	n. n.	n. n.		
13				n. d.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	7,3	8.5

n. n.: nicht nachweisbar  
n.d. nicht durchgeführt  
\* Keimträger zum Teil nicht auffindbar  
*E. coli* *Escherichia coli*  
*Salm.th.* *Salmonella Typhimurium*  
*E. fc.* *Enterococcus faecalis*

Aus der Tabelle 43 werden die qualitativen Ergebnisse des „Suspensionsversuches“ bei der Kalkanwendung zum Zwecke einer Inaktivierung von *E. coli*, Salmonellen und *Enterococcus faecalis* ersichtlich.

*E. coli* konnten bereits einen Tag nach Versuchsbeginn bei pH-Werten von 11,3 (0,8 kg Ca(OH)<sub>2</sub>) und pH 11,9 (1,6kg Ca(OH)<sub>2</sub>) nicht mehr nachgewiesen werden.

Salmonellen waren am 13. Tag nach Versuchsbeginn in der Variante mit 1,6 kg Kalk nicht mehr nachweisbar im Gegensatz zur Variante mit dem geringen Kalkeinsatz.

*Enterococcus faecalis* konnten noch nach 13 Tagen in beiden Varianten auf jeweils 3 untersuchten Keimträgern nachgewiesen werden (Tab. 43).

30 Tage nach Versuchsbeginn wurde nochmals eine „Kontrolluntersuchung“ auf Salmonellen auf den kalkbehandelten Versuchsflächen durchgeführt. Dabei konnten in keiner Probe mehr Salmonellen festgestellt werden.

Tabelle 43: Ergebnisse zur Tenazität von *Escherichia coli*, *S. Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Kalk (0,8 kg und 1,6 kg Ca(OH)<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>) (jeweils 3 Proben pro Mikroorganismenart und Beprobungstag qualitativ untersucht) - „**Suspensionsversuch**“

Tage	Mikroorganismen						pH	
	0,8 kg Ca(OH) <sub>2</sub> /m <sup>2</sup>			1,6 kg Ca(OH) <sub>2</sub> /m <sup>2</sup>			0,8 kg Kalk/m <sup>2</sup>	1,6 kg Kalk/m <sup>2</sup>
	Keimsuspension			Keimsuspension				
	<i>E. coli</i>	<i>Salm.Th.</i>	<i>E. fc.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salm. Th.</i>	<i>E. fc.</i>		
0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	11,4	11,7
1	n. n.	+	+	n. n.	+	+	11,3	11,9
	n. n.	+	+	n. n.	+	+		
	n. n.	+	+	n. n.	+	+		
2	n. n.	+	+	n. n.	+	+	9,88	11,4
	n. n.	+	+	n. n.	+	+		
	n. n.	+	+	n. n.	+	+		
6	n. n.	+	+	n. n.	+	+	8,1	9,3
	n. n.	+	+	n. n.	+	+	8,1	10,1
	n. n.	+	+	n. n.	+	+	8,0	10,8
							8,0	11,4
8,0	9,5							
13	n. n.	+	+	n. n.	n. n.	+	7,3	8.5
	n. n.	+	+	n. n.	n. n.	+		
	n. n.	+	+	n. n.	n. n.	+		

n. n.: nicht nachweisbar

+: Nachweis möglich bei Salmonellen in 50 g Boden; bei *E. fc.* in 1 g Boden

*E. coli* : *Escherichia coli*

*Salm.Th.*: *Salmonella Typhimurium*

*E. fc.*: *Enterococcus faecalis*

## 6 Diskussion

Eine zukunftsorientierte, ökologische Tierhaltung bringt aus tier- und seuchenhygienischer Sicht Nachteile mit sich, die in einer zunehmenden Konzentration an für das Tier pathogenen Mikroorganismen bei der Freilandhaltung und damit erhöhtem Infektionsdruck zu sehen sind. Ein wichtiges Ziel der geplanten Untersuchungen lag daher in der Erarbeitung von Daten zu alternativen Bodenbehandlungsmaßnahmen zum Zwecke der Reduzierung bzw. Eliminierung pathogener Mikroorganismen und Tierseuchenerregern im Boden mit umweltfreundlichen Methoden. Dies gilt sowohl für die Freilandhaltung bei Legehennen als auch für Schweinehaltungen im Freiland.

Es wurden daher für die Praxis die umweltschonenden thermischen Verfahren („thermische Bodendesinfektion mittels Injektorbrenner“; „Dämpfung“) an unterschiedlichen Standorten untersucht, um wissenschaftlich abgesicherte Daten zum praktischen Einsatz und zu den Erfolgsaussichten unter heutigen Gesichtspunkten zu erhalten.

Die spezielle Problematik der Freilandhaltung landwirtschaftlicher Nutztiere, die aus ökologischen und agrarpolitischen Gründen zunehmende Verbreitung erfahren wird, liegt in der Gefahr der Anreicherung von bakteriellen und viralen Krankheitserregern im Boden, die z. T. lange im Boden überleben können (MOELLER, 1984; KOEHLER, 1993; HIRTE, 1997; MAHNEL, 1997; REHSE 1997). Es würde dem Zweck der ökologischen Tierhaltung widersprechen, dieses Risiko für die Tiergesundheit durch erhöhten Medikamenteneinsatz zu kompensieren. Dementsprechend müssen Ansätze erforscht werden, einer solchen Anreicherung durch ökologisch verträgliche Maßnahmen vorzubeugen.

Der zweite Punkt ist der, dass die zuständigen Fachbehörden vor einem Problem stehen, wenn im Tierseuchenfall Freilandhaltungen (Weideauslauf) desinfiziert werden müssen. Hier müssen praktikable Methoden, die die Umwelt möglichst wenig belasten entwickelt und validiert werden und in die Empfehlungen des BMVEL zur Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen aufgenommen werden.

Der Einsatz von Chemikalien zur Bodendesinfektion ist im Zusammenhang mit einer ökologischen Bodenbewirtschaftung nicht zielführend und muss aus prinzipiellen Gründen kritisch bewertet werden. Mit speziellen Problemen muss in diesem Zusammenhang in Wasserschutzgebieten gerechnet werden, wo von Seiten der Behörden mit speziellen Auflagen, Beschränkungen und Verboten in der Anwendung bestimmter Bodenentseuchungsmittel zu rechnen ist. Der Trend zu alternativen Methoden wird u.a. auch daran erkennbar, dass manche Hersteller chemische Präparate zur Bodenentseuchung im Rahmen von Pflanzenschutzmaßnahmen vom Markt genommen haben.

Aus Erfahrungen bei Bekämpfungsmaßnahmen gegen Nematoden, Unkrautsamen sowie bakterielle und virale Pflanzenparasiten in den siebziger Jahren ist bekannt, dass eine Bodendesinfektion mit chemischen Mitteln i. d. R. billiger, einfacher durchführbar und weniger arbeitsaufwendig sein kann (HEGE et al., 1972). Als Nachteile müssen allerdings zum Teil lange Karenzzeiten, Rückstandsprobleme und die Gefährdung von Menschen, Tieren und Kulturen bei unsachgemäßer Anwendung in Kauf genommen werden. Entsprechende Betrachtungen im Hinblick auf tierische Antiparasita und Desinfektionsmittel für bakterielle und virale Krankheitserreger bei Mensch und Tier fehlen völlig.

Alternativverfahren zur Bodendesinfektion sind daher aus ökologischen Gesichtspunkten unumgänglich. Mit der sog. „Dämpfung“ und der Anwendung von Injektorbrennern zur thermischen Bodendesinfektion konnten vielversprechende Ergebnisse zur Bekämpfung von zystenbildenden und wandernden Nematoden und Kohlhernie-Erregern erzielt werden (ARNDT, 1996; MEYER et al., 1997; BUCHENAUER, 1998).

Erfahrungswerte bei der thermischen Bodenentseuchung liegen hinsichtlich des Kohlerhernie-Erregers (*Plasmodiophora brassicae*) sowie bei freilebenden Nematoden vor (ARNDT, 1996; BUCHENAUER, 1998). Bisher gibt es jedoch nach unserem Kenntnisstand keinerlei Erfahrungen zur Reduktion bzw. Eliminierung der von den Tieren stammenden obligat oder fakultativ pathogenen Bakterien, Viren und Parasiten, die auf oder im Boden mehr oder weniger lange überleben, sich möglicherweise anreichern und so zu einem erhöhten Infektionsdruck für die auf diesen Flächen gehaltenen Tieren führen können.

Zur Anwendung sollten folgende Verfahren der Bodendesinfektion kommen, für die nach positivem Verlauf der Ergebnisse die Einführung in die Praxis unmittelbar erfolgen kann, da deren technischer Einsatz zur Bodenbehandlung zum Zwecke der Eliminierung von Nematoden bereits Stand der Technik ist.

Die alternativen Formen der Bodendesinfektion mittels Hitze (Dämpfung; Injektorbrenner) arbeiten ohne chemische Präparate. Es sind daher keine negativen Auswirkungen auf den Boden, die Luft und das Oberflächen – bzw. Grundwasser zu erwarten.

## 6.1 Diskussion der Ergebnisse der Vorversuche

### 6.1.1 Diskussion der Ergebnisse der Wasserbadversuche

Die Vorversuche begannen mit Tenazitätsversuchen zum Absterbeverhalten von Mikroorganismen im Wasserbad. Die verschiedenen Mikroorganismen wurden sowohl als Suspension als auch auf beimpften Keimträgern im Boden erhitzt. Es wurde Boden mit verschiedenen Wassergehalten miteinander verglichen.

Bei 55 °C reduzierte sich die Zahl von *Escherichia coli* innerhalb von 30 min in einer Probe von 10<sup>9</sup> KBE/ml auf 10<sup>7</sup> um 2 Zehnerpotenzen und in der zweiten Probe von 10<sup>9</sup> KBE/ml auf 10<sup>8</sup> um 1 Zehnerpotenz. *Enterococcus faecalis* zeigte nach 30 min bei der Ausgangszahl von 10<sup>8</sup> KBE/ml keine Reduktion, während die Zahl von *S. Senftenberg* sich in dieser Zeitspanne um eine Zehnerpotenz reduzierte. Nach HOFERER (2001) reduzierte sich die Zahl von *Escherichia coli* (EHEC) in Wasserbadversuchen innerhalb 30 min bei 55 °C von 10<sup>10</sup> KBE/ml auf 10<sup>9</sup> um 1 Zehnerpotenz. Bei *Enterococcus faecium* (HOFERER, 2001) kam es innerhalb von 30 Minuten bei 55 °C bei einer Ausgangszahl von 10<sup>9</sup> KBE/ml nicht zur Reduktion, während die Zahl von *S. Senftenberg* sich in dieser Zeitspanne um über eine Zehnerpotenz reduzierte. Diese Beobachtungen bestätigten die Untersuchungen von HOFERER (2001).

Zur Ermittlung des Einflusses unterschiedlicher Trockensubstanzgehalte des Bodens auf das Absterbeverhalten der Mikroorganismen wurde *S. Typhimurium* auf Keimträgern zusammen mit Erde bei verschiedenen TS-Gehalten in ein Wasserbad gebracht und im Boden mit unterschiedlichem TS-Gehalt bei 50 °C 50 min und bei 55-57 °C 60 min im Wasserbad erhitzt.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der Salmonellen sich innerhalb von 50 min um 2 Zehnerpotenzen von 10<sup>7</sup> KBE/ml auf 10<sup>5</sup> reduzierte bei Temperaturwerten von 50 °C und einem TS-Gehalt von 76 %.

Bei einem TS-Gehalt von 87 % hat sich die Zahl der Salmonellen bei gleicher Temperatur und in der gleichen Zeit nur um 1 Zehnerpotenz von 10<sup>7</sup> KBE/ml auf 10<sup>6</sup> reduziert (Tab. 11). Bei Temperaturen im Bereich zwischen 55-57°C konnte eine weitergehende Reduktion erreicht werden. Bei einem TS-Gehalt von 77% hat sich die Anzahl der Salmonellen innerhalb von 60 min um 4 Zehnerpotenzen von 10<sup>7</sup> KBE/ml auf 10<sup>3</sup> reduziert. Bei einem TS-Gehalt von 88% hat sich die Anzahl der Salmonellen bei gleicher Temperatur und in der gleichen Zeit nur um 3 Zehnerpotenzen von 10<sup>7</sup> KBE/ml auf 10<sup>4</sup> reduziert (Tab. 12). In den Proben mit dem niedrigeren TS-Gehalt von 77 % ist nach 1 stündiger Erhitzung ein um ca. eine Zehnerpotenz höherer Reduktionswert zu verzeichnen als bei einem TS-Gehalt von 88 % (Tab. 12).

Nach HOFERER (2001) kam es in einer Rindergülle innerhalb von 30 min bei 55 °C zu einer Reduktion von *Salmonella Senftenberg* um ca. 4 bis 5 Zehnerpotenzen. In einer Schweinegülle waren bereits nach 30 min in 3 von 4 Proben keine Salmonellen mehr nachweisbar.

Die Tabelle 16 dokumentiert die Ergebnisse des Verhaltens von *Escherichia coli* bei 50 °C im Wasserbad über eine Zeitspanne von 50 Minuten bei TS-Gehalten von 75 bzw. 86 %.

Während bei hohen TS-Gehalten innerhalb der Erhitzungsphase von 50 Minuten keine Reduktion an *E. coli* zu verzeichnen ist, wird innerhalb dieser Zeitspanne von 50 Minuten bei einem TS-Gehalt von 75 % eine Reduktion um 2 Zehnerpotenzen von 10<sup>5</sup> KBE/ml auf 10<sup>3</sup> deutlich.

Nach HOFERER (2001) kam es in einer Rindergülle innerhalb von 20 min bei 55 °C zu einer Reduktion bei EHEC-coli um ca. 5 Zehnerpotenzen. In einer Schweinegülle waren bereits nach 15 min in 3 von 4 Proben keine EHEC mehr nachweisbar. In Schweinegülle bei einem geringeren TS-Gehalt erfolgte die Reduktion der Zahl von EHEC schneller als in Rindergülle bei einem höheren TS-Gehalt.

Die verschiedenen TS-Gehalte der Bodenproben im Wasserbad scheinen einen geringeren Einfluss auf die Tenazität der untersuchten *Enterococcus faecalis* auszuüben.

Die Zahl von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich nach 10 min bei einer Temperatur von 70 °C bei 75 % TS-Gehalt des Bodens von  $10^6$  KBE/ml bis unter die Nachweisgrenze und bei einem TS-Gehalt von 86 % von  $10^6$  KBE/ml auf  $2,3 \times 10^0$  (Tab 9). In einem anderen Versuch reduzierte sich die Zahl der *Enterococcus faecalis* nach 30 min bei einer Temperatur von 67 °C und bei 77 % TS-Gehaltes des Bodens von  $10^8$  KBE/ml auf  $1,5 \times 10^4$  und bei 86 % TS-Gehaltes des Bodens von  $10^8$  KBE/ml auf  $4,8 \times 10^4$  (Tab 14).

Nach HOFERER (2001) kam es bei *Enterococcus faecium* in einer Rindergülle in 24 Stunden bei 55 °C bei einem Ausgangswert von  $10^7$  KBE/ml zu einer Reduktion von 6 bis 7 Zehnerpotenzen. In einer von vier Proben war nach dieser Zeit noch ein Nachweis von *Enterococcus faecium* möglich. In einer Schweinegülle waren bereits nach 12 Stunden nur noch in zwei von vier Proben *Enterococcus faecium* nachweisbar. In der Schweinegülle kam es zur schnelleren Reduktion der Mikroorganismen. Dieses Beispiel ist jedoch mit den eigenen Versuchen zur Tenazität unterschiedlicher Mikroorganismen im Wasserbad weniger vergleichbar, da die Wärmeeinwirkung viel länger dauerte.

Nach MOĆE-LLIVINA (2003) reduzierten sich *E. coli* bei Temperaturen von 80 °C nach 30 min um mehr als 3,6 Zehnerpotenzen im Schlamm. Im Vergleich dazu reduzierten sich *E. coli* bei einer Temperatur von 60 °C und 30 min um 6 Zehnerpotenzen im Abwasser. Nach 30 min wurde *Enterococcus faecalis* bei einer Temperatur von 80 °C über 1,4 Zehnerpotenzen im Schlamm reduziert. Zum Vergleich wurde die Zahl von *Enterococcus faecalis* nach 30 min bei einer Temperatur von 60 °C über 3,4 Zehnerpotenzen im Abwasser reduziert.

Die oben dargestellten Befunde deuten darauf hin, dass die Mikroorganismen im Boden bei einem höherem Wassergehalt des Bodens schneller absterben als im Boden mit geringerem Wassergehalt. Wasser ist ein besserer Wärmeleiter und dadurch kann bei der kurzzeitigen Bodenerhitzung die Wärme schneller auf die Mikroorganismen einwirken und diese reduzieren bzw. inaktivieren. Zwei Mechanismen bewirken im Boden Wärmeausgleichsbewegungen, und zwar die Wärmeleitung und die Wärmekonvektion. Während die erste immer abläuft, ist die zweite an das Vorhandensein eines beweglichen Trägers gebunden. Dieser Träger ist in der

Regel das Wasser. Als flüssige Phase ist es wegen seiner hohen Wärmekapazität ein wirksamer Träger (SCHEFFER et al., 2000).

Die niedrigen Temperaturen um 50 °C in den Wasserbadversuchen erfordern ein stundenlanges Erhitzen des Bodens um ihn zu desinfizieren bzw. die in den Versuchen angewandten Mikroorganismen zu inaktivieren.

Die Ergebnisse aus den Laborversuchen können jedoch nur bedingt als Empfehlungen zur Desinfektion von großen Bodenflächen dienen.

#### 6.1.2 Diskussion der Ergebnisse zur thermischen Desinfektion von Sand und Boden

Bei diesen Laborversuchen wurden Salmonellen, *E. coli* und Fäkalstreptokokken (*Enterococcus faecalis*) mit einem Betonmischer gleichmäßig in Sand eingemischt und mit einem Injektorbrenner behandelt. Tabelle 18 zeigt, dass die Ausgangszahlen von  $10^4$ ,  $10^6$  und  $10^7$  KBE/g Sand bei *E. coli* an der Oberfläche und 1,5 cm Tiefe des Sandes durch die Hitzebehandlung um 4, 6 und 7 Zehnerpotenzen bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden konnten. Die Ausgangszahlen von  $10^6$ ,  $10^7$  und  $10^8$  KBE/g Sand an Salmonellen reduzierten sich an der Oberfläche und in 1,5 cm Tiefe des Sandes um 6, 7 und 8 Zehnerpotenzen bis unter die Nachweisgrenze. Die Ausgangszahlen von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^6$  KBE/g Sand bei *Enterococcus faecalis* reduzierten sich an der Oberfläche des Sandes auch um 5 und 6 Zehnerpotenzen bis unter die Nachweisgrenze, während es in 1,5 cm Tiefe zu keiner Reduktion kam. Es lässt sich somit feststellen, dass eine Einwirkzeit von 50 s ausreicht, um die Anzahl von *E. coli* und *Salmonellen* deutlich zu vermindern, während bei gleicher Einwirkzeit *Enterococcus faecalis* in 1,5 cm Tiefe des Sandes nur unwesentlich reduziert werden konnte. Auf der Oberfläche des Sandes wurden Temperaturwerte bis zu 157 °C gemessen. Im Vergleich mit einem Versuch im Boden wurden bei einer Hitzeeinwirkung von 50 s auf der Oberfläche nur 50 °C bis 65 °C gemessen (Tab. 20). Der Sand hat sich demnach als guter Wärmeleiter erwiesen. Die gleichzeitig dichten Sandmassen erschwerten aber das Durchdringen der Gasflamme und damit der Hitze in tiefere Sandschichten. Der Wärmedurchgang in tiefere Sandschichten war jedoch weniger beeinträchtigt als bei den weiteren Versuchen mit Ackerboden, welcher im Vergleich mit Sand sich als relativ schlechter Wärmeleiter darstellte. Dennoch war Sand im Vergleich mit anderen Böden ein besserer Wärmeleiter. Bei der Untersuchung zur Tenazität von Salmonellen, *E. coli* und *Enterococcus faecalis* sowie Parvoviren in Boden (Lehmboden aus der Umgebung Hohenheims, Tab. 20), kam es zu einer geringeren Reduktion der *Enterococcus faecalis* als im Sandboden.

An der Oberfläche stieg die Temperatur nach 60 s bis 70°C und in 1,5 bis 2 cm Tiefe wurden Temperaturen von nur 45 °C, 55 °C und 60 °C gemessen. Die Ausgangszahl von *Enterococcus faecalis* reduzierte sich an der Oberfläche und bis 2cm Tiefe von  $10^5$  und  $10^6$  auf  $10^5$  KBE/g Boden und damit um 1 Zehnerpotenz.

Bei Salmonellen kam es an der Oberfläche des Bodens bei den gleichen Versuchsbedingungen nur zu einer Reduktion um 1 Zehnerpotenz von  $10^6$  auf  $10^5$  KBE/g Boden. Vergleichende Untersuchungen aus der Literatur liegen nicht vor, aber SOLDIERER (1991) konnte deutliche Unterschiede in der Hitzeresistenz zwischen verschiedenen Flüssigmistproben erarbeiten. Während der Nachweis von Salmonellen in Schweinegülle bereits nach 20 min bei 60 °C nicht mehr gelang, konnten *Enterococcus faecium* aus anderen Proben (Rinder- oder Schweinegülle) noch nach 150 min bei 60 °C nachgewiesen werden. *Enterococcus faecium* haben sich als wärmeresistenter erwiesen was nach 2,5 Stunden geprüft wurde.

Im Vergleich dazu hat sich in den eigenen Wasserbadversuchen bei 30 min um 60 °C (Tab. 5) gezeigt, dass die Anzahl von *Enterococcus faecalis* um 2 Zehnerpotenzen und Salmonellen um 4 Zehnerpotenzen zu reduzieren ist. Bei 70 °C überlebten *Enterococcus faecalis* 10 min auf beimpften Keimträgern im Boden mit einer Anzahl von  $2,3 \times 10^0$  KBE/ml bei einer Ausgangszahl von  $10^6$  KBE/ml. Zum Vergleich dazu überlebten *Enterococcus faecalis* 30 min bei 67 °C im Wasserbad auf beimpften Keimträgern im Boden. Ihre Anzahl wurde in dieser Zeit von  $10^8$  auf  $10^4$  KBE/ml reduziert.

Maximal konnten 70 °C als höchst gemessene Temperatur erst am Ende des Versuches an der Oberfläche des Bodens (Einmischverfahren) gemessen werden und eine von 60 s Einwirkzeit war zu kurz um *Enterococcus faecalis* und Salmonellen ausreichend zu reduzieren.

Eine deutsche Arbeitsgruppe (zit. in SOLDIERER, 1991) empfiehlt zur Entseuchung von Klärschlamm folgende Kombinationen: Temperatur und Haltezeit: 70 °C 25 min. Bei eigenen Untersuchungen zur thermischen Desinfektion von Boden waren die erzeugten Temperaturen zu niedrig und auch die Zeit der Wärmewirkung zu kurz, um den Boden zu desinfizieren bzw. die zu Versuchszwecken auf den Boden aus- und eingebrachten Mikroorganismen zu inaktivieren. Nach HAVELAAR (1984), zit in SOLDIERER (1991), wird dabei meist die Temperatur-Zeit- Kombination 70°C/30 min zur Pasteurisierung angewandt. Auch für die Pasteurisierung von Flüssigmist (Trockensubstanz unter 10 %) wird die Kombination 70 °C/30 min empfohlen (EKESBO, 1985; WHO, 1988; zit. in SOLDIERER, 1991). PHILIPP et al. (2004) empfahlen die Pasteurisierung von Bioabfalls bei einer Temperatur von 70 °C 1 Stunde. SOLDIERER (1991) ermittelte die Zeit, in der es zur Inaktivierung von *Salmonella Senftenberg*<sub>775</sub> im Flüssigmist bei verschiedenen Temperaturen kam: bei 50 °C – 56,7 min; bei 55°C – 11,5 min; bei 60 °C – 2,3 min und bei 65 °C - 0,47 min. Auch dieses Beispiel zeigt, dass niedrige

Temperaturen um 50 °C fast 1 Stunde Einwirkung erfordern, um Salmonellen zu inaktivieren.

Im Vergleich dazu reduzierten sich *Salmonella Typhimurium* in Vorversuchen mit Erde im Wasserbad bei Temperaturen um 57 °C, nach 1 Stunde um 3 Zehnerpotenzen bei einem Trockensubstanzgehalt des Bodens von 88 % (Tab. 12). Bei 77 % TS-Gehalt des Bodens und 1 Stunde Einwirkzeit wurden *Salmonella Typhimurium* um 4 Zehnerpotenzen reduziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei höherem Trockensubstanzgehalt des Bodens in dem die Mikroorganismen der Hitze ausgesetzt sind, sich die Zeitdauer der Inaktivierung erhöht.

Es ist zu erkennen (Tab. 22), dass nach 50 s bei 60 °C sich *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und Salmonellen bei 70 % TS-Gehalt des Bodens bei gleicher Temperatur und nach gleicher Zeit stärker reduzierten als bei einem TS-Gehalt von 85 %.

Die Anzahl von *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und Salmonellen reduzierten sich in Vorversuchen mit Erde im Wasserbad bei 70 % TS-Gehalt des Bodens bei Temperaturen bis 60 °C in 50 s im Vergleich zu den Ausgangszahlen wie folgt: von  $10^6$  KBE / ml Suspension auf  $1,8 \times 10^3$  und  $1,9 \times 10^3$ ; von  $10^6$  KBE / ml Suspension auf  $10^3$  und bei Salmonellen ähnlich, wie bei *Enterococcus faecalis* von  $10^6$  auf  $10^3$  KBE / ml.

Die Anzahl bei *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und Salmonellen reduzierten sich bei 85 % TS-Gehalt des Bodens bei Temperaturen bis 60 °C in 50 sek im Vergleich zu Ausgangskeimzahlen wie folgt: von  $10^6$  KBE / ml Suspension auf  $4,6 \times 10^3$  und  $4,6 \times 10^3$ ; von  $10^6$  KBE / ml Suspension auf  $10^4$  und bei Salmonellen ähnlich wie bei *Enterococcus faecalis* von  $10^6$  KBE / ml Suspension auf  $10^4$  KBE / ml.

Je trockener das Material ist, desto größer ist die Tenazität der Mikroorganismen (ROLLE und MAYR, 1993).

In den Wasserbadversuchen mit Boden hat sich die Tendenz bei *E. coli* und Salmonellen bestätigt. Bei *Enterococcus faecalis* ist die Tendenz in den Wasserbadversuchen mit Boden weniger ausgeprägt. Seit langem ist bekannt, dass feuchte Hitze Mikroorganismen wesentlich stärker schädigt als trockene Hitze bei gleicher Temperatur. Eine Erkenntnis, die in der Sterilisationspraxis breite Anwendung findet (JOSLAYN, 1983; WALLHÄUSSER, 1988; zit. in SOLDIERER, 1991). Die Ergebnisse von HOFERER (2001), die im Kapitel 6.1.1 dargestellt sind, ergänzen und bestätigen die obengenannten die Aussagen, dass man in Laborversuchen eine schnellere Reduktion von Mikroorganismen im feuchten Boden erreicht als in einem Boden mit höherem TS-Gehalt.

### 6.1.3 Diskussion der Ergebnisse zur thermischen Desinfektion mit dem Einmischverfahren

In diesen Versuchen wurde *Escherichia coli*, *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* mit einem Betonmischer in Sand und Boden gleichmäßig eingemischt, um nach der Hitzebehandlung mit einem Injektorbrenner Aussagen zur Reduktion auf die untersuchten Mikroorganismen machen zu können.

Sand hat im Vergleich zu Boden eine homogene Konsistenz. Die Mikroorganismensuspensionen drangen somit leicht in die relativ großen Zwischenräume der Sandkörner ein. Die obere Korngröße des Sandes liegt relativ einheitlich bei 2 mm (HARTGE et al., 1999). Nach dem Mischen des Sandes im Betonmischer reduzierten sich nach der Wärmebehandlung in einer Zeit von 50 s *E. coli* von  $10^6$  KBE/g Sand bis unter die Nachweisgrenze.

Salmonellen reduzierten sich von  $10^7$  KBE/g Sand ebenfalls bis unter die Nachweisgrenze.

*Enterococcus faecalis* reduzierten sich in 1,5 bis 2cm Tiefe von  $10^5$  KBE/g Sand und  $10^6$  KBE/g Sand auf  $10^3$  bis  $10^4$  KBE/g um etwa 3 Zehnerpotenzen. Auf der Oberfläche reduzierten sich *Enterococcus faecalis* von etwa  $10^5$  KBE/g Sand und  $10^6$  KBE/g Sand bis unter die Nachweisgrenze. Die Ergebnisse der Reduktionen von *E. coli* und Salmonellen sind damit als befriedigend zu bezeichnen.

Bei den Versuchen des Einmischverfahrens mit Boden zeigen die Ergebnisse, dass Boden im Vergleich zu Sand eine inhomogene Masse darstellt. Es gab große Unterschiede bei den Temperaturmessungen an der Oberfläche von 45 °C bis 70 °C und in den tieferen Bodenschichten von 45°C bis 60°C. Beim Mischen des Bodens mit den Bakteriensuspensionen bildeten sich aus Boden Erdklumpen verschiedener Größe im Betonmischer.

In tieferen Bodenschichten erreichten die Temperaturen nach 60 s der Wärmeeinwirkung zwischen 45 °C bis 55 °C und maximal 60 °C. Die hitzeempfindlichen *E. coli* wurden dabei in einem Versuch von  $10^5$  auf  $10^4$  um 1 Zehnerpotenz reduziert. Nach TURNER (2002) reichen 2 Stunden für die Inaktivierung von *E. coli* im Stroh und Abfällen von Schwein bei 55 °C aus.

Im Boden wirkten die Temperaturen auf *E. coli* zu kurz ein, weil die Wärme zu schnell abgegeben wurde. Bei TURNER (2002) hingegen hatten die Temperaturwerte von 55 °C 2 Stunden auf *E. coli* in Stroh und Mist einwirken können. Insofern ist verständlich, dass bei Temperaturen von 55 °C bei Einwirkzeiten von 2 Stunden *E. coli* zu inaktivieren sind.

Insgesamt ist bei den Versuchen mit den Injektorbrenner die Problematik unverkennbar, dass es sich nur um eine kurzzeitige Erhitzung des Sandes bzw. des Bodens handelt und die Hitze in Abhängigkeit der Korngrößen und der TS-Gehalte nur an der Oberfläche bzw. in geringen Tiefen zum Wirken kommt.

Insofern sind die vorliegenden Ergebnisse nicht mit den zitierten Ergebnissen aus der Literatur im Zusammenhang der Überlebensraten der unterschiedlichsten Mikroorganismen bei der Erhitzung von Gülle, Klärschlämmen und anderen biologischen vergleichbar. Bei diesen Versuchen waren in der Regel Einwirkzeiten von 1-2 Stunden vorhanden und dementsprechend auch gute Ergebnisse zu erzielen.

#### 6.1.4 Diskussion der Ergebnisse zur thermischen Desinfektion mit der Keimträgertechnik

Die verwendeten Keimträger entsprechen aufgrund ihrer Bauart verschiedenen praxisnahen Anforderungen (HOFERER, 2001, SCHWARZ, 2003). Die in den Großversuchen benutzten Keimträger aus Aluminium sind 5 cm lang, 1cm breit und 1 mm dick. Die Keimträgertechnik sollte die Nachteile, die beim Einmischen einer bakteriellen Suspension in den Boden entstanden sind, beseitigen. Mit dieser Technik ist eine definierte Konzentration von Mikroorganismen auf die Keimträger aufzubringen, was als unabdingbare Voraussetzung für eine quantitative Aussage zur Reduktion der untersuchten Mikroorganismen bei der Bodenerhitzung gelten sollte. Bei den Großversuchen musste eine große Menge an Keimträgern in den Boden eingebracht werden, weil nicht wieder alle Keimträger nach den Erhitzungsversuchen mit dem BVS-Gerät auffindbar waren. Außerdem wurden in Großversuchen die zunächst verwendeten kleinen, runden Keimträger durch größere, eckige und damit leichter auffindbare ersetzt, was allerdings bei der „Abschüttelungstechnik“ eine Modifikation erforderte. Diese Modifikationen betrafen die Reagenzröhrchen, in welchen sich die Glasperlen befinden. Durch Vortexen werden die Mikroorganismen von der Keimträgern mechanisch entfernt. In jedes Reagenzglas kam nur ein Keimträger. Der Abschüttelvorgang erforderte äußerste Vorsicht beim Durchführen besteht die Gefahr des Platzens der Reagenzgläser und die Probe ist damit nicht mehr auswertbar.

### 6.2 Diskussion der Ergebnisse der Großversuche

#### 6.2.1 Diskussion der Ergebnisse beim Einsatz des Injektorbrenners („BVS-System“)

Der 1. Versuch galt neben der Wiederfindungsrate der Keimträgerplättchen der Tenazität von *Enterococcus faecalis* nach der Hitzeeinwirkung mit dem „BVS-System“. Sollten die Keimträgerplättchen nach dem Fräs- und Erhitzungsvorgang nicht wieder aufzufinden sein, hätte für die folgenden Untersuchungen eine andere Methodik zum Einbringen der ausgewählten Mikroorganismen in den Boden zum Zwecke der Überprüfung deren Überlebensfähigkeit erarbeitet werden müssen. Von 20 Keimträgern, die im 1. Versuch in den Boden eingebracht

wurden, konnten nach der Hitzebehandlung mit dem „BVS-System“ 14 Stück wieder gefunden werden. In den darauffolgenden Versuchen 2-4 wurden die angewandten Keimträger zwar in unterschiedlicher Anzahl mit viel Aufwand (mehrmaliges manuelles Durchrechen des Bodens mit engstehenden Rechenzinken) wiedergefunden, jedoch konnte in keinem Versuch die ursprünglich eingelegte Anzahl der Keimträger zurückgewonnen werden. Die Reduktionsrate von *Enterococcus faecalis* auf den Keimträgern betrug in der Regel bis zu 6 Zehnerpotenzen. Nach HOF et al. (2000) ist die Desinfektion eine gezielte Entkeimung bestimmter, unerwünschter Mikroben zu dem Zweck, die Übertragung von Krankheitserregern zu verhindern, bzw. eine Reduktion der Anzahl der Mikroorganismen auf dem Objekt um mindestens 5 log-Stufen zu bewirken, so dass davon keine Infektion mehr ausgehen kann. Im ersten Großversuch war die Reduktion der Mikroorganismen größer als 5 log-Stufen und damit entsprechend der Definition nach HOF et al. (2000) eine ausreichende Keimreduktion erreicht.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Keimträger konnten keine *Enterococcus faecalis* mehr nachgewiesen werden. Bei einzelnen Keimträger konnten allerdings in der Abschüttelflüssigkeit noch *Enterococcus faecalis* zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KBE/ml nachgewiesen werden (Tab. 24).

Bei Temperaturen zwischen 74 °C bis 90 °C in einer Bodentiefe bis zu 5 cm konnte nach 40 Minuten noch eine Temperatur von 60 °C in 5 cm Tiefe registriert werden. Bei sechs Proben reduzierten sich *Enterococcus faecalis* von  $10^8$  um 8 Zehnerpotenzen bis unter die Nachweisgrenze. Die epidemiologische Bedeutung der noch vorhandenen *Enterococcus faecalis* mit Restkonzentrationen von  $10^2$  KBE/ml in einer Probe und  $10^3$  bei einer weiteren Probe nach der Hitzeeinwirkung ist dabei jedoch als gering einzuschätzen.

In einem Laborpasteur, an dem ADE-KAPPELMANN (2004) Versuche zur Hygienisierung von Bioabfällen vor der anaeroben Faulung durchgeführt hat, wurden die Temperaturbereiche zwischen 70-90 °C hinsichtlich der Überlebenszeiten ausgewählter seuchenhygienisch relevanter Mikroorganismen untersucht.

In einer großtechnischen Anlage wurden Salmonellen nach den Ergebnissen von ADE-KAPPELMANN (2004) in einer Stunde bei einer Temperatur von 70 °C in Gülle inaktiviert. *Enterococcus faecalis* war nach 30 min bei einer Temperatur von 70°C im Laborpasteur noch nachweisbar. Erst nach 90 min bei 70 °C konnte *Enterococcus faecalis* eliminiert werden. Bei einer Temperatur von 80 °C wurde *Enterococcus faecalis* nach 20 min vollständig eliminiert (ADE-KAPPELMANN, 2004).

Die Zeit der Einwirkung der hohen Temperaturen bei der Bodenerhitzung in den vorliegenden Untersuchungen war kürzer als jene bei der Pasteurisierung von Bioabfällen bei ADE-KAPPELMANN (2004). Der Boden erreichte zwar sofort nach der Erhitzung Temperaturwerte von 90 °C, nach 40 min wurde jedoch nur noch eine Temperatur von 60 °C gemessen. Die

Ergebnisse von ADE-KAPPELMANN (2004), die Untersuchungen zur Erhitzung von Bioabfällen zusammen mit Gülle durchführte, sind nur bedingt mit den Ergebnissen der Bodenversuche vergleichbar. In diesem Vergleich wurden Unterschiede zwischen Gülle und Boden berücksichtigt. Entscheidend ist aber, dass in der Gülle höhere Temperaturwerte über eine längere Zeitspanne konstant wirkten. Bei der Bodenerhitzung dagegen sanken die Temperaturen relativ rasch ab.

Ein höherer Trockensubstanzgehalt des Bodens bei der Wärmebehandlung mit dem „BVS-System“ hat insofern einen positiven Effekt auf die Reduktionsrate der untersuchten Mikroorganismen, als dass dabei die trockenen und damit leichteren Bodenpartikeln beim Fräsvorgang wirkungsvoll durch die Flammen des Injektorbrenners geschleudert werden können. Die Folge davon ist eine Reduktion der *Enterococcus faecalis* um 6 Zehnerpotenzen im Vergleich zu den Nullproben. Enterokokken sind gegen Wärmeeinwirkung relativ widerstandsfähig, was auch Untersuchungen von LAMBERT (2003) belegen, der eine Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* bei 60 °C erzielte. LAMBERT (2003) gibt keine Zeitspanne an, in welcher es zu Inaktivierung kommt.

Nachdem der 1. Versuch erfolgreich verlaufen war und die Keimträger aus dem hitzebehandelten Boden wieder zurückgewonnen werden konnten (allerdings nicht in der ursprünglich eingelegten Anzahl) wurde im 2. Versuch das Spektrum der mikrobiologischen Parameter erweitert. Neben *Enterococcus faecalis* wurde *Escherichia coli* 155; Typ K12, *Salmonella Typhimurium* Typ „Zoosal“ und *Bovines Parvovirus* (BPV) verwendet.

Bei diesem Versuch erfolgte die Probennahme zur Ermittlung der Überlebensfähigkeit der angewandten „Indikatororganismen“ 90 Minuten nach Beendigung der Hitzeeinwirkung. Die Temperaturwerte lagen zu Beginn der Behandlung in 2 cm Bodentiefe bei 80-90 °C. Nach 15 min sanken die Temperaturen auf etwa 80 °C. Nach 90 Minuten konnten in 5 cm Bodentiefe noch Temperaturwerte zwischen 45 bis knapp unter 50 °C gemessen werden.

Nach WAGNER (1993) überlebten Salmonellen zwischen 1 Tag und 13 Monaten, in gefrorenem feuchtem Boden über 2 Jahre (PIOCH, 1998; zit. in WAGNER, 1993), in trockener Erde bis 500 Tage (HESS et al., 1974; zit. in WAGNER, 1993), in geschlossenen Wassergefäßen sogar bis 16 Jahren (ALTHAUS, 1982; zit. in Wagner, 1993). Im 2. Versuch der Bodenerhitzung wurden Salmonellen innerhalb einer Stunde bei Temperaturwerten zwischen 48 bis 89 °C bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Nach KÖHLER (1993) ist Bovines Parvovirus (Stamm Haden) in verschiedenen Böden bei Lagerungstemperaturen von 4 °C über einen einheitlich langen Zeitraum, bis zur 44. Woche bei Temperaturwerten von 20 °C bis 28 Wochen nachweisbar. Bei Rotaviren betrug die längste Zeitspanne des Virusnachweises bei 4 °C 60 Wochen und bei 20 °C 28 Wochen. Bei ECBO-

Virus waren es 52 Wochen bei Temperaturen von 4 °C und 28 Wochen bei Temperaturen von 20 °C. Im 2. Versuch wurde das BPV viel schneller als bei KÖHLER (1993), innerhalb von 90 Minuten bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Allerdings lagen hier auch höhere Temperaturen von 47-90 °C vor. Das Tabak-Mosaik-Virus übersteht in getrockneten Tabakblättern die Temperatur von 120 bis 150 °C. Bei Temperaturen von 150°C ist das TMV in wenigen Minuten inaktiviert (SCHMELZER et al., 1977; zit in LORENZ, 2001). In 10 Minuten kommt es im getrockneten Pflanzenmaterial bei einer Temperatur von 150°C zur vollständigen Reduktion der Infektiosität des TMV (BODE et al., 1968; zit in LORENZ, 2004). Auf das Bovine Parvovirus wirkten niedrigere Temperaturen als auf Tabak-Mosaik-Virus, jedoch dauerte die Wärmeeinwirkung von 47 °C bis 90 °C etwa 90 Minuten lang. Diese sehr lange Einwirkzeit der Hitze reduzierte Bovines Parvovirus von  $10^{5,25}$  unter die Nachweisgrenze.

Die getrockneten Tomatensamen verlieren ihre Widerstandsfähigkeit nach 24 Stunden bei einer Temperatur von 100 °C (HERMANN et al., 1994; zit in LORENZ, 2001). Diese extremale Hitzeresistenz der pflanzlichen Mikroorganismen ist gegenüber der Hitzeresistenz von BPV und TMV unvergleichbar größer. Im Vergleich zu Tomatensamen reduzierten sich die BPV in viel kürzerer Zeit von 90 min.

*Enterococcus faecalis* können im Boden bei 20 °C nach 4 Wochen noch nachgewiesen werden. Bei 4 °C sogar bis zu 54 Wochen (WAGNER,1993).

Überlebenszeiten von Fäkalkeimen in sandigen Böden unter Laborbedingungen sind in den meisten Fällen bei Lagerungstemperaturen zwischen 20 °C und 25 °C ermittelt worden und reichen von einigen wenigen bis 64 Wochen (WAGNER,1993).

Im 2. Versuch wirkten die Ausgangstemperaturen von etwa 90 °C und reduzierten alle untersuchten Bakterien auf den Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze. Bei den Lagerungsversuchen von Ackerboden, die WAGNER (1993) kontaminiert mit unterschiedlichen Fäkalkeimen durchgeführt hat, war hinsichtlich des relativ langen Überlebens der untersuchten Mikroorganismen nicht die Temperatur die entscheidende Einflussgröße. Vielmehr kamen hierbei das natürliche Absterbeverhalten der Mikroorganismen zum Tragen und andererseits ein mögliches konkurrierendes Verhalten um das Nährstoffangebot anderer im Boden lebender bodenbürtiger Mikroorganismen, Pilze und Protozoen.

Bei diesem 2. Versuch konnte jeweils noch von einem „geschlossenen“ Keimträger *S. Typhimurium* in einer Konzentration von  $7,2 \times 10^1$  KBE/ml Abschüttelflüssigkeit nachgewiesen werden.

Im 3. Versuch hatten alle Bakterien die sowohl auf „offenen“ als auch „geschlossenen“ Keimträgern zur Untersuchung gelangten, die Hitzeeinwirkung nicht überlebt. Während auch alle 5 Salmonellenproben, die nach artifizierlicher Kontamination des Ackerbodens mit Salmonellen und *Enterococcus faecalis* und anschließender Erhitzung negativ waren, gelang der qualitative

Nachweis von *Enterococcus faecalis* in einer von fünf untersuchten Proben. BPV-Viren zeigten nach der Hitzeeinwirkung einen Titer zwischen  $KID_{50}10^{1,0}$  bis  $10^{2,0}$  bei einem Ausgangstiter von  $10^{5,25}$  (Tab. 29).

Die Temperaturen lagen 10 min nach der Erhitzung des Bodens unter 78 °C in 2 cm Tiefe. Nach SOLDIERER (1991) braucht man bei 65 °C 30 Minuten um Flüssigmist zu pasteurisieren. Bei 75 °C sind es 20 min und bei 80 °C entsprechend 10 min. Bei den vorliegenden Versuchen war die Zeit von 10 min bei Temperaturwerten von 75-78 °C zu kurz um eine ausreichende Reduktion der Mikroorganismen zu erzielen.

Boden als festes inhomogenes Substrat fordert im Vergleich zu Flüssigmist oder Gülle eine längere Zeitspanne der Hitzeeinwirkung zur Inaktivierung unterschiedlicher Mikroorganismen bei vergleichbaren Temperaturen. MOĆE-LLIVINA (2003) untersuchte die Tenazität von *E. coli* und *Enterococcus faecalis* in Schlämmen und Abwässern. Sie hat herausgefunden, dass sich *E. coli* bei Temperaturen von 80°C nach 30 min um mehr als 3,6 Zehnerpotenzen im Schlamm reduzierten. Im Vergleich dazu reduzierten sich *E. coli* bei einer Temperatur von 60 °C und 30 min um 6 Zehnerpotenzen im Abwasser. Nach 30 min wurde *Enterococcus faecalis* bei einer Temperatur von 80 °C über 1,4 Zehnerpotenzen im Schlamm reduziert. Zum Vergleich wurde die Zahl von *Enterococcus faecalis* nach 30 min bei einer Temperatur von 60 °C über 3,4 Zehnerpotenzen im Abwasser reduziert. Am Beispiel von MOĆE-LLIVINA (2003) kam es im Schlamm, also im festeren Material zu niedrigeren Reduktionsraten als im Abwasser. Insofern gehen diese Ergebnisse konform den Erhitzungsversuchen mit Böden. Sind die TS-Gehalte höher, müssen höhere Temperaturwerte einwirken oder die Zeitdauer der Wärmeeinwirkung muss eine längere sein.

Bei diesem Versuch kam es während der Erhitzung des Bodens zu einer technischen Störung am „BVS-System“ im Bereich des Übergangs der Bodenfläche, die mit *Enterococcus faecalis* bzw. BPV-Viren kontaminiert worden war. In diesem Bereich waren die Temperaturwerte dann möglicherweise zu gering um die *Enterococcus faecalis* im Boden und BPV-Viren auf den Keimträgern vollständig zu eliminieren.

Im letzten Versuch 4 waren die zu erfassenden biologischen Parameter und die Art der Probenahme identisch mit dem vorangegangenen Versuch 3. Allerdings war der Boden zu diesem Termin im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen oberflächlich in sehr nassem Zustand, so dass das schleppergezogene „BVS-System“ nur mit Unterstützung einer Seilwinde über die Versuchsfläche zur Erhitzung des Bodens gezogen werden konnte.

Die Temperatur des Bodens vor der Hitzebehandlung betrug 13,5 °C. Der Trockensubstanzgehalt des Bodens lag bei 65 % vor und 81,5 % nach der Hitzbehandlung. Die höchste, in bis 5 cm Bodentiefe gemessene Temperatur lag bei 78 °C (Tab. 30). Aufgrund der

Nässe kam es im letzten Versuch zu einer schnelleren Abkühlung des Bodens als bei den vorangegangenen Versuchen. Die geringere Temperaturentwicklung, wie auch die kürzere Zeitdauer der Einwirkung hat somit nicht ausgereicht, um die Indikatororganismen ausreichend zu eliminieren wie die Tabelle 31 anschaulich demonstriert. Nur die *E. coli* waren auf den Keimträgern vollständig eliminiert.

Die anderen Mikroorganismen wie auch die Parvoviren konnten in unterschiedlicher Konzentration von den Keimträgern zurückgewonnen werden.

In den Bodenproben konnten außerdem jeweils in den 5 Parallelproben Salmonellen als auch *Enterococcus faecalis* nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass bei einem Wassergehalt des Bodens von 35 % bzw. 65 %, die Funktion der Fräsen vermindert ist und andererseits möglicherweise die Bodenpartikel in zu großen Klumpen durch die Flammen geschleudert wurden, so dass die Kontaktzeit und die Temperaturhöhe insgesamt zu gering waren, um vollständig in die Erdklumpen einzudringen und dadurch die Indikatororganismen zu eliminieren. Das verhältnismäßig rasche Abkühlen des wärmebehandelten Bodens ist ein weiterer möglicher Grund für die doch zum Teil sehr hohen Konzentrationen an *Enterococcus faecalis*, die noch in der Abschüttelflüssigkeit der „geschlossenen“ Keimträger nach der Erhitzung des Bodens nachgewiesen werden konnten.

In der Tabelle 30 sind die Temperaturwerte nach der Erhitzung des Bodens mit dem Injektorbrenner dargestellt. Sofort nach der Erhitzung des Bodens lagen die Temperaturen bei etwa 78 °C, nach 10 min konnten noch 73°C und nach 20 min noch Werte von 52 °C bis 55 °C in 5 cm Bodentiefe gemessen werden. Die Temperatur von über 70 °C und eine Einwirkzeit von etwa 10 min haben nicht ausgereicht um die Mikroorganismen zu inaktivieren. Eine protektive Wirkung des nassen Bodens könnte bei einem TS-Gehalt von 65 % vor der Hitzebehandlung möglicherweise einen direkten Zugang der Hitze zu den Mikroorganismen erschwert haben.

Die Großversuche mit dem Injektorbrenner haben bei günstigen Boden- und Witterungsbedingungen gezeigt, dass Temperaturen um 90 °C erreicht wurden, die nach 15 min auf etwa 80 °C sanken. Nach 90 min konnten in 5 cm Bodentiefe noch ca. 50 °C gemessen werden. Innerhalb dieses Temperatur-Zeitfensters wurden die untersuchten Mikroorganismen bis unter die Nachweisgrenze reduziert, einschließlich das *Bovine Parvovirus*.

Die erhaltenen Ergebnisse sind nur unter folgenden Voraussetzungen möglich:

1. Der Boden hat vor der Erhitzung einen Trockensubstanzgehalt von mindestens 82 %.
2. Die Wärmeabstrahlung von der Bodenoberfläche darf nicht zu schnell sein, was in kalten Jahreszeiten jedoch nicht anders zu erwarten sein wird.

3. Die Zeit der Hitzeeinwirkung bzw. die Hitzenachwirkung muss mindestens 90 min bei einer Ausgangstemperatur von 80-90 °C betragen.
4. Der Boden muss vor der Hitzebehandlung feinkrümelig vorbereitet sein, was bei Frost eventuell aufwendige Zusatzmaßnahmen erfordert, die in der Praxis nicht durchführbar sind (z.B. eine Bodenerwärmung mit anschließendem Zerkleinern der Bodenstruktur durch Fräsen oder Eggen).
5. Ein Boden, der maschinell nicht bearbeitet werden kann (zu trocken oder zu naß, zu steinhaltig, gefroren), kann nicht mit dem „BVS-System“ behandelt werden.

Die Überlebenszeiten der Indikatormikroorganismen in den Vorversuchen wurden in Relation zu denen der Indikatormikroorganismen in den Hauptversuchen bei den entsprechenden Temperaturen gesetzt. Aus diesem Vergleich wird ersichtlich, dass es durch die thermische Behandlung in den halb- und großtechnischen Versuchen zu einer wesentlich geringeren Inaktivierung der untersuchten Mikroorganismen kommt als bei den entsprechenden Temperaturwerten der Vorversuche im Wasserbad. Beispielsweise überlebten *Enterococcus faecalis* im Wasserbad weniger als 10 min lang bei 70 °C und 75 % TS-Gehalt des Bodens (Tab. 9). Bei 86 % TS-Gehalt des Bodens, 70°C und 10 min Einwirkzeit haben nur  $2,3 \times 10^0$  KBE/g überlebt (Tab. 9). Im letzten Großversuch, bei etwa 70 °C und 10 min Einwirkungszeit und bei einem Wassergehalt von 65% überlebten *Enterococcus faecalis* dagegen in einer Anzahl von  $1,8 \times 10^4$  KBE/ml auf den geschlossenen Keimträgern. Bei offenen Keimträgern wurden die Mikroorganismen auf  $7,2 \times 10^1$  KBE/ml reduziert.

GIEß (1992), zit. in KNOP (1997) beobachtete, dass Salmonellen nach 24 Tagen trotz Maximaltemperaturen von 70°C noch nachgewiesen werden konnten. Nach NEIDHARDT und VAN BOGELLEN (1987), YAMAMORI und YURA (1982), zit. in KNOP (1997) soll die Inkubation zum Zwecke der Vermehrung von Mikroorganismen oberhalb ihre optimalen Wachstumstemperatur zu einer erworbenen Thermoresistenz führen. Nach MACKEY und DERRICK (1986; zit. in KNOP (1997) ist eine Bildung von sogenannten hitzeresistenten Hitzeschockproteinen als mögliche Erklärung für diese Thermoresistenz verantwortlich. Diese Beispiele von mehreren Autoren erklären das Phänomen des Überlebens der Salmonellen in einer Probe bei so hohen Temperaturen. Nach SOLDIERER (1991) braucht man 25 min bei 70 °C um Flüssigmist zu pasteurisieren unter der Voraussetzung, dass eine vorausgehende Zerkleinerung der Bestandteile kleiner als 5 mm Durchmesser gegeben ist. In dem 4. und letzten Großversuch war die Zeit von 10 min Hitzeeinwirkung bei 70 °C zu kurz um die Mikroorganismen abzutöten.

Generell sterben Mikroorganismen im wässrigen Milieu schneller ab als in einem Substrat mit höherem TS-Gehalt. Dies bestätigen die Wasserbadversuche bei denen die untersuchten Mikroorganismen sich schneller im feuchten Milieu reduzierten als im trockenen.

Im 4. und letzten Großversuch zur Bodendesinfektion mit dem Injektorbrenner wurden Mikroorganismen jedoch weniger im feuchten Boden reduziert als in den vorhergehenden Versuchen mit höherem TS-Gehalt des Bodens. Bei dem 4. Großversuch waren die Rahmenbedingungen durch die hohe Feuchtigkeit des Bodens so ungünstig, dass während der Versuchsdurchführung keine ausreichende Erhitzung des Bodens erzielt werden konnte. Da die hohe Wärmekapazität des Wassers viel Energie zur Bodenkörpererwärmung verbraucht (HARTGE 1999; zit. in SCHEFFER, 2000), waren die Reduktionsraten im feuchten Boden kleiner, denn die Energiemenge des Injektorbrenners war bei allen vier Versuchen gleich und konnte daher im letzten Versuch nicht erhöht werden.

#### 6.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Versuche mit Solarfolien

Der 1. Versuch zum Einsatz der Solarfolien (Tab. 32) zeigte den Einfluss der Temperatureinwirkung und der Keimzahlreduktionen von *Enterococcus faecalis* während einer Zeitspanne von 22 Tagen. Die Inaktivierungsrate von pathogenen Mikroorganismen steigt mit zunehmender Temperatur (DUNHAM, 1977; MARTENS, 1999; WELLINGER 1991; zit. in HOFERER, 2001).

Bei einer Bodentemperatur von 11 °C (ohne Folie) und bei einer Temperatur von 13 °C (weiße Folie) waren nach 13 Tagen keine Unterschiede in der Reduktion von *Enterococcus faecalis* zu beobachten (Tab. 32). 22 Tage später waren bei 41 °C (ohne Folie) und bei 42 °C (weiße Folie) ebenfalls keine Unterschiede in der Reduktion von *Enterococcus faecalis* zu sehen. Nach MITSCHERLICH et al. (1984) wird durch kleine Temperatur- und Feuchteunterschiede die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen im Schatten oder in ungeschützten Stellen weder gehemmt noch gefördert. Erst unter der schwarzen Folie bei einer Temperatur von 44 °C war die Reduktion in der Anzahl von *Enterococcus faecalis* von  $10^6$  auf  $10^1$  um max 5 Zehnerpotenzen größer als bei 41 °C und 42 °C (Tab. 32).

Nach 28 Tagen wurde bei einer Temperatur von 49°C eine Zunahme von *Enterococcus faecalis* unter der schwarzen Folie beobachtet im Vergleich zur Vorwoche von  $10^1$  KBE/ml bzw.  $10^4$  KBE/ml auf  $10^3$  und  $10^5$  KBE/ml (Tab. 32).

Allerdings erfolgte eine Steigerung von *Enterococcus faecalis* auf den abgedeckten Stellen bei 49 °C, ähnlich wie in Versuch 2, wo bei einer Temperatur von 53 °C ein erheblicher Anstieg

von *Enterococcus faecalis* beobachtet werden konnte.

Nach 41 Tagen hat sich die Zahl der *Enterococcus faecalis* unter der schwarzen Folie im Vergleich zur Ausgangszahl von  $10^6$  bis unter die Nachweisgrenze um 6 Zehnerpotenzen reduziert.

Ohne Folie reduzierte sich die Zahl innerhalb von 41 Tagen von  $10^6$  KBE/ml auf  $10^2$  und  $10^4$  um 2 bis 4 Zehnerpotenzen (Tab. 32).

VAN DONSEL et al. (1967; zit. in MITSCHERLICH, 1984) untersuchten die Tenazität von *Enterococcus faecalis* im Boden und beobachteten, dass *Enterococcus faecalis* 70 Tage an schattigen und an ungeschützten Stellen in 8 cm Bodentiefe in der Zeit von März bis April überlebten. Die Versuchsstelle war mit Gras bewachsen, ähnlich wie bei den vorliegenden Versuchen. Die Untersuchungen wurden im April mit der Beobachtung eines Erwärmungseffektes unter den Solarfolien begonnen um mögliche Unterschiede in der Reduktion der untersuchten Mikroorganismen zwischen den mit Folien abgedeckten und nicht abgedeckten Versuchsfeldern zu erhalten.

Der Folienversuch mit *Enterococcus faecalis* dauerte etwa 41 Tage. Die Reduktion erfolgte schneller als bei dem Versuch von VAN DONSEL (1967). Unter der schwarzen Folie lag die Zahl der *Enterococcus faecalis* nach dieser Zeit bei  $10^2$ , ohne Folie dagegen war die Zahl um zwei Zehnerpotenzen höher.

In der Zeit von 14.04.03 bis 20.05.03 lief parallel zum Versuch mit *Enterococcus faecalis* ein Tenazitätsversuch mit Salmonellen unter den gleichen Voraussetzungen. Innerhalb von 22 Tagen reduzierten sich Salmonellen (Tab. 33) bei Temperaturen zwischen 14 bis 44 °C im Vergleich zu den Nullproben von  $10^9$  um 8 Zehnerpotenzen auf  $10^1$  KBE/ml. Nach insgesamt 28 Tagen, wobei am 28. Tag Temperaturwerte von 44-49 °C gemessen wurden, reduzierte sich die Anzahl der Salmonellen unter der schwarzen Folie bis unter die Nachweisgrenze (Tab. 33). Im 2. Versuch reduzierten sich Salmonellen nach 1 Woche im Vergleich zu den Nullproben von  $10^3$  KBE/ml um 3 Zehnerpotenzen bis unter die Nachweisgrenze (Tab. 35). Allerdings wurden im 2. Versuch die Salmonellen erneut qualitativ bei einer Temperatur von 53 °C nachgewiesen. Ähnliche „Wiederbelebungsreaktionen“ wurden im Versuch 3 mit Salmonellen beobachtet.

Nach GUO et al. (2002) überlebten Salmonellen (*S. Montevideo*, *S. Poona* und *S. Michigan*) 45 Tage im feuchten Boden bei 20 °C. Die höheren Temperaturwerte unter den mit Folien abgedeckten Versuchsflächen reduzierte die Salmonellen schneller als in einem natürlich belassenen Boden.

Bei einem weiteren Versuch wurden neben Salmonellen und *Enterococcus faecalis* auch *E. coli* und Bovine Parvoviren eingesetzt. Der Virustiter reduzierte sich nach 3 Wochen unter der schwarzen Folie bei einer Temperatur von 35 bis 53 °C von  $10^5$  auf  $10^{1,5}$  und von  $10^{2,5}$  um 2 bis

3 Zehnerpotenzen (Tab. 38). Nach SPYNU et al. (1998) überlebten Polioviren im Boden und an Tomatenpflanzen 60 Tage. Nach YEAGER et al. (1979) wurde bei Enteroviren (Polioviren), die im trockenen Boden (unabhängig von Temperatur, Bodentyp) 12 Tage bei 37 °C gelagert wurden, keine Infektiosität mehr festgestellt. BITTON et al. (1984) haben beobachtet, dass Viren (Poliovirus und Echovirus) während einer warmen und trockenen Saison schneller inaktiviert werden als während einer warmen und feuchten Saison. Bovines Parvovirus wurde im Vergleich zu Polioviren nach SPYNU (1998) schneller reduziert. Der entscheidende Faktor war hier die Temperatur von 40 bis 50 °C. In diesem Temperaturbereich reduzierte sich das BPV relativ schnell von  $10^{4,5}$  auf  $10^{1,5}$  KID<sub>50</sub>/ml um 4 Zehnerpotenzen.

Im 3. Versuch (Tab. 39) überlebten die Salmonellen bei Temperaturen von 50 °C bis 55 °C über 5 Wochen und mit einer Anzahl bis  $10^5$  KBE/ ml. Es zeigte sich dabei kein Unterschied in der Anzahl der Salmonellen im Vergleich zu den Nullproben. In diesem Versuch war die Anzahl nur bei einer Probe unter der schwarzen Folie um 1 Zehnerpotenz kleiner im Vergleich zu einer Nullprobe. Nach der 4. Woche war sogar eine steigende Tendenz in der Zahl der Salmonellen zu beobachten. Sie vermehrten sich nach der 5. Woche von  $10^3$  bis zu  $10^5$  um 2 Zehnerpotenzen (Tab. 39).

Nach LAMBERT (2003) liegt die thermische Inaktivierung bei *Salmonella Anatum* bei 55 °C und bei *Salmonella Bedford* bei über 50 °C-58 °C, bei einer Wasseraktivität von 0,94-0,99 und einem pH-Wert von 4-7. LAMBERT (2003) gibt keine Zeitspanne an in welcher es zur Inaktivierung kommt.

Nach BEST (1971) ist die Tenazität von Salmonellen in Flüssigmist von ihrer Spezieszugehörigkeit abhängig. In Rindergülle überlebten bei einer Temperatur zwischen 4,5 °C bis 15,4 °C *Salmonella Dublin* 49 Tage und *Salmonella Typhimurium* 177 Tage. Gerade *Salmonella Typhimurium* wurde für diese Bodenversuche ausgewählt und nach BEST (1971) gehört dieses Bakterium zur Spezies mit erhöhter Tenazität im Vergleich zu den anderen Salmonellenarten. STRAUCH et al. (1991) geben ein Beispiel der Abhängigkeit der Tenazität von *Salmonella Senftenberg* im Boden von der Jahreszeit in welcher es zur einmaligen Ausbringung von Klärschlamm kam. Im Sommer überlebten die Salmonellen bis 820 Tage und im Winter bis 350 Tage. Grund dafür ist eine mögliche Vermehrung bei der Ausbringung des salmonellenhaltigen Klärschlammes im Sommer und damit eine bessere Adaptation an die Boden- und Umweltbedingungen. Die Versuche von STRAUCH et al.(1991) sind allerdings mit den Solarfolienversuchen nur bedingt vergleichbar. Die Tatsache des Überlebens der *Salmonella Typhimurium* Typ „Zoosaf“ im Boden über 35 Tage lang bei Tagestemperaturen über 55 °C ist möglicherweise auf eine besondere Überlebens- und Anpassungsfähigkeit des Bakterienstamms zurückzuführen. Dabei ist die hohe Feuchtigkeit unter der schwarzen Folie nicht als

alleiniger und wichtigster Faktor für das Überleben der Mikroorganismen anzusehen. Ohne Folie überlebten die Salmonellen in fast gleicher Konzentration wie unter der Folie. Die Konzentrationen nach 35 Tagen auf den nicht abgedeckten Flächen war gleich den Konzentrationen der Nullproben nach 35 Tagen (Tab 39).

Die Ausbringung der Keimträger unter den Solarfolien hat im Sommer stattgefunden. Jedoch nur in Hochsommer kam es innerhalb von 35 Tagen unter der schwarzen Folie zur Reduktion der untersuchten Mikroorganismen

Der 3. Versuch mit Salmonellen zeigt ohne Zweifel, dass es Faktoren gibt, die das Absterben der Mikroorganismen hemmen, auch wenn sie wochenlang Temperaturen über 50 °C am Tag ausgesetzt sind. Nach KNOP (1997) konnte *Salmonella Senftenberg* nach 420 min bei 55 °C noch aus Kompostproben isoliert werden. Hierbei wird eine Anpassung an das höhere Temperaturniveau vermutet.

Unter der Folie war es nass. Es könnte der Fall gewesen sein, dass es tagsüber zur Reduktion der Salmonellen kam. In der Nacht, als die Temperaturen sanken, vermehrten sich möglicherweise diese Erreger in dem feuchten Boden wieder. Dieser Zyklus wiederholte sich periodisch über eine längere Zeitspanne. Möglicherweise haben die Mikroorganismen über die Zeit bei den relativ hohen Temperaturen auch eine Resistenz gegen die Wärmeeinwirkung entwickelt.

Nach KNOP (1997) können Salmonellen auch noch nach 2. Tagen bei Temperaturwerten bis 65 °C im Kompost nachgewiesen werden.

Bei Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung benutzte GIEß (1992; zit. in KNOP, 1997) *Salmonella Schleißheim* und *S. Senftenberg*<sub>775W</sub> als Testorganismen und konnte nach 24 Tagen trotz Maximaltemperaturen von 70 °C noch Salmonellen nachweisen.

KNOP (1997) berichtet, dass *S. Senftenberg*<sub>775W</sub> bei höheren TS-Gehalten des Kompostes am längsten nachweisbar war.

Salmonellen überlebten auf den nicht abgedeckten Versuchsflächen ebenfalls 5 Wochen und zwar bei einer noch größeren Anzahl jedoch bei geringeren Temperaturwerten des Bodens. Die nicht abgedeckten Versuchsflächen waren im Vergleich zu den abgedeckten sehr trocken.

Die Salmonellen aus den Nullproben überlebten bei etwa 30 °C am Tag über 3 Wochen (Tab. 39). Möglicherweise bieten die verfaulten Pflanzen unter der Folie mit erhöhtem Feuchtegehalt ein gutes Nährstoffangebot und damit ein günstiges Vermehrungsmilieu. Um möglicherweise eine bessere Inaktivierung der Mikroorganismen zu erzielen, müsste man einen Luftzug unter der Folie erzeugen um die Feuchtigkeitsansammlung unter der Folie zu verhindern bzw. zu reduzieren. Beim Einsatz einer perforierten Folie wurde allerdings keine Verminderung des Feuchtegehaltes unter der Folie bewirkt.

Die Bodenfeuchte und die „Erwärmung-Abkühlungs-Periode“ hat sich negativ auf Keimzahlreduktion ausgewirkt. Dabei dauerte die Abkühlungsperiode länger als die Erwärmungsphase.

Die Versuchsstelle war von der westlichen Himmelsrichtung her gesehen mit Bäumen umgeben und bereits nach 17 Uhr lagen die Versuchsflächen im Schatten. Die Erwärmung durch die Sonneneinstrahlung begann erst gegen 11 Uhr.

In der Literatur wird für Salmonellen und andere Bakterien das Phänomen der Erlangung einer erhöhten Hitzeresistenz durch Adaptation beschrieben (HUMPHREY, 1990; KATSUI et al., 1982; KIM et al., 1989; zit in KNOP, 1997). Nach MITSCHERLICH et al. (1984) überlebten Salmonellen 114 Tage länger bei Temperaturen um 20°C als bei niedrigeren Temperaturen um 4 °C.

Die Anzüchtung von Mikroorganismen oberhalb ihres Wachstumsoptimums soll zu einer erworbenen Thermoresistenz führen können (NEIDHARDT und VAN BOGELEN, 1987; YAMAMORI und YURA, 1982; zit in KNOP, 1997).

MACKEY und DERRICK (1986), zit. in KNOP (1997) beobachteten, dass sich die Inaktivierungszeit von *S. Typhimurium* bei 55 bzw. 59 °C nach 30 min Vorerwärmung bei 48 °C um das 2 bis 7-fache verlängerte.

Als mögliche Erklärung für eine Thermoresistenz wird die Bildung sogenannter hitzeresistenter Hitzeschockproteine (heat shock proteins“) angegeben (MACKEY und DERRICK, 1986; zit in KNOP, 1997). Nach LEMAUX et al. (1989), zit. In KNOP (1997) werden solche Proteine gebildet, wenn Bakterienzellen innerhalb ihres Wachstumsbereiches in niederen auf höheren Temperaturbereichen erwärmt werden. Für *E. coli* ist eine vorübergehende Expression solcher Hitzeproteine belegt (YAMAMORI und YURA, 1982; zit. in KNOP, 1997). In niedrigeren Temperaturbereichen zwischen 14 °C bis 44 °C wurden im Versuch 1 (Tab. 33) und bei 35 °C im 2. Versuch (Tab. 35) eine Reduktion der Salmonellen erzielt. *E. coli* hat sich als empfindlicher im Vergleich zu den Salmonellen erwiesen.

MITSCHERLICH und MARTH (1984) zitieren Beispiele verschiedener Wissenschaftler, die Überlebenszeiten unterschiedlicher Mikroorganismen im Boden bei verschiedenen Temperaturen beinhalten.

MITSCHERLICH et al. (1984) entdeckten, dass *Enterococcus faecalis* zwischen den Monaten Juni bis August doppelt so lange an schattigen Stellen überlebten als auf vom Sonnenlicht ungeschützten Stellen. Die Überlebenszeiten betragen in den Monaten September – Oktober: 70 Tage im Schatten und nur halb so lange auf ungeschützten Standorten.

*Enterococcus faecalis* überlebten in Versuch 2 (Tab. 36) unter der schwarzen Folie der Versuchsfläche mit einer höheren Zahl als auf der nicht folienabgedeckten Fläche. Die Folie bot

einen Schutz vor der Sonne, deren UV-Strahlung und die direkte Sonneneinstrahlung sich negativ auf die Tenazität der *Enterococcus faecalis* auswirken konnte.

Wenn man berücksichtigt, dass es unter der schwarzen Folie permanent sehr nass war und die Temperatur am Tag bis zu 10 °C höher war als auf der Versuchsfläche ohne Folie, lässt sich daraus schliessen, dass die höhere Feuchte und eine Temperatur um 53 °C eine Verlangsamung der Reduktion von *Enterococcus faecalis* unter der schwarzen Folie bewirkte.

Die Versuche von MITSCHERLICH et al. (1984) sind nur bedingt mit den Versuchen unter den Folien vergleichbar. Die Folien erzeugten zwar Wärme aber im Gegenteil zu den Versuchen von MITSCHERLICH et al. (1984) blockierten sie die UV-Strahlung auf die Versuchsflächen und damit möglicherweise auf die Mikroorganismen. Bei höheren Temperaturen um 53 °C wurden die Mikroorganismen dann langsamer reduziert als auf den unbedeckten Flächen. Im Vergleich dazu, reduzierten sich *Enterococcus faecalis* auf den nicht abgedeckten Stellen deutlich schneller als unter der schwarzen Folie. Allerdings geschah eine Vermehrung von *Enterococcus faecalis* auf den abgedeckten Stellen bei 53 °C, ähnlich wie im 1. Versuch, wo bei 49 °C einer erheblicher Anstieg von *Enterococcus faecalis* beobachtet wurde.

Die Parvoviren (Tab. 38) reduzierten sich unter der schwarzen Folie langsamer als auf den nicht folienabgedeckten Flächen was mit dem Schutz vor UV-Strahlung und direkten Sonnenstrahlung, wie der Vergleich mit den Versuch von MITSCHERLICH et al.(1984) zeigt, gebracht werden kann.

Nach VAN DONSEL et al. (1967) überlebten *E. coli* zwischen den Monaten Juni bis August doppelt so lang auf der schattigen Stelle im Vergleich zu einer ungeschützten Stelle. Der Boden wurde nach VAN DONSEL(1967) mit einer Keimsuspension von *E. coli* beaufschlagt, die auf Basis „brain-heart infusion“ hergestellt war. Im 2. Versuch beobachtete man steigende Tendenzen in der Konzentration von *E. coli* von Woche zur Woche. Eine Erklärung dafür wäre, dass im 2. Versuch die Mikroorganismen ausreichende Vermehrungsbedingungen in dem feuchten Boden fanden. In der Nacht bei sinkenden Temperaturwerten vermehrte sich möglicherweise der Rest der noch vorhandenen *E. coli*. Nach MITSCHERLICH et al (1984) überlebte *E. coli* im Flüssigmist bei einem Feuchtegehalt von 97-99 % doppelt so lange bei 4 °C als bei 20 °C. Dieses Beispiel kann allerdings nur bedingt als Vergleich herangezogen werden, da andere Zeiten der Wärmewirkung, verschiedene Medien etc. verwendet wurden. Dieses Phänomen ließe sich eher, ähnlich wie bei Salmonellen, durch Bildung der Hitzeproteine (YAMAMORI und YURA, 1982; zit. in KNOP, 1997) erklären.

Unter Berücksichtigung der Tatsache der zum Teil sehr heterogenen Ergebnissen mit langen Überlebenszeiten der untersuchten Salmonellen auf den folienabgedeckten Versuchsflächen

kann die Methode der Folienabdeckung keine verlässliche und praxisrelevante Desinfektionsmaßnahme eines Bodens oder bei der Bodenauslaufhaltung sein.

Hinzu kommen enorme Kosten für die Folienabdeckung größerer Flächen und deren Entsorgung. Diese stehen in einem ungünstigen Verhältnis zu den erwarteten und notwendigen Reduktionen der seuchen- und umwelthygienisch bedeutsamen Mikroorganismen im Zusammenhang einer umweltfreundlichen Bodendesinfektion.

### 6.2.3 Diskussion der Ergebnisse der Dämpfung

Bei einem Versuch zur Bodendämpfung wurden Ergebnisse zur Tenazität der untersuchten Mikroorganismen unter einem heißen Dampfstrom im Boden gewonnen. Die Temperatur des dampferhitzten Bodens erreichte Werte bis 90 °C in 5 cm Bodentiefe. Noch nach 15 min waren Temperaturwerte von 90°C zu messen. Die Bakterien auf den Keimträgern (*E. coli*, Salmonellen und *Enterococcus faecalis*) wurden dabei vollständig reduziert bzw. inaktiviert. Bei den Suspensionen wurden lediglich bei einer von drei untersuchten Proben *Enterococcus faecalis* qualitativ an der Nachweisgrenze festgestellt.

Der Titer des Bovinen Parvovirus wurde von  $10^{4,5}$  auf  $10^{0,5}$  bzw.  $10^{1,5}$  reduziert (Tab. 41).

Nach BRAUNIGER (2000) ist das Bovine Parvovirus sehr resistent gegenüber trockener Hitze bei 100°C.

Die hohe Überlebensrate des Virus in dem vorliegenden Dämpfungsversuch lässt einerseits auf eine große Thermoresistenz des Virus schließen, andererseits übt der Boden eine mögliche protektive Wirkung auf die Parvoviren aus, indem das Durchdringen des Dampfes und damit ein gleichmäßiger Zugang zu allen Virusproben behindert wurde. Nach 15 min konnten in 5 cm Bodentiefe noch Werte um 80 °C und nach 45 min knapp unter 80 °C gemessen werden. Bei Versuchen zur Temperaturstabilität von bovinem Parvovirus gegenüber feuchter Wärme im Temperaturbereich von 75 bis 90 °C wurde festgestellt, dass die Resistenz sehr stark von dem Milieu (Aqua dest., Wasser standardisierter Härte (WSH), Plasma) abhängt, in dem die Viren beim Erhitzen suspendiert sind (BRÄUNINGER, 1994; zit in HOFERER, 2001). Nach ROBERTS et al. (2000) liegt die Inaktivierung des Bovinen Parvovirus bei konzentriertem Factor VIII in trockener Hitze und 80 °C bei 72 Stunden. ROBERTS et al. (2000) gehen davon aus, dass eine Resistenz des Bovinen Parvovirus vom Virustyp und vom Medium abhängig ist. Bei dem vorliegenden Dämpfungsversuch war die Zeit der Temperatureinwirkung zu kurz um alle Viren abzutöten. SPILMANN et al (1987) haben bei der Pasteurisierung von tierischen Abfällen eine Inaktivierung des Parvovirus bei 70°C in 30 min um 0,72 Zehnerpotenzen erzielt. Nach

MARTENS (2004) wird Tabak-Mosaik-Virus in Bioabfällen bei 70 °C und 60 min Einwirkzeit nicht inaktiviert.

#### 6.2.4 Diskussion der Ergebnisse bei der Kalkung

Bei einem Versuch zur Kalkung des Bodens wurden Ergebnisse zur Tenazität von Salmonellen, *E. coli* und *Enterococcus faecalis* gewonnen.

Am ersten Tag nach der Löschkalkausbringung ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) wurde ein pH von 11,9 bei 1,6 kg Kalk/m<sup>2</sup> und am zweiten Tag ein pH von 11,4 gemessen. Am 6. Tag lag der pH bei 10,8 und am 13. Tag bei 8,5 (Tab. 42).

Durch den hohen pH-Wert des Bodens über 11 wurde die Anzahl an *E. coli* auf den Keimträgern und in der Keimsuspension bereits einen Tag nach Versuchsbeginn von  $10^5$  bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Nach SCHIRM (2003) wird *E. coli* bei der Verwendung einer Kalkmenge von 0,3 kg CaO/kg TS in Bioabfällen in den ersten 30 Minuten um 4 Zehnerpotenzen und innerhalb einer Stunde um 5 Zehnerpotenzen reduziert. Bei den angewandten Kalkmengen von 1,1 kg CaO/kg TS war *E. coli* bei einem Ausgangskeimgehalt  $10^8$  KBE/g und einem pH-Wert von 12,9 bereits nach 30 min nicht mehr nachweisbar. Es kann in den vorliegenden Untersuchungsergebnissen zur Kalkanwendung nicht nachgewiesen werden ob die Reduktion bzw. Inaktivierung von *E.coli* erst nach 24 Stunden oder bereits früher erfolgte, da die Bodenproben erst einen Tag nach der Ausbringung der Mikroorganismen auf den gekalkten Bodenflächen gezogen wurden.

Untersuchungen von LANG (1987) belegen, dass beim Einsatz von  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Löschkalk), eine Inaktivierungszeit von drei Stunden angesetzt werden muss um *E. coli* bei einem pH von 12,6 ausreichend reduzieren zu können. Diese Studien haben nachgewiesen, dass eine Wirkung des  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mehr Zeit fordert zur Inaktivierung der Mikroorganismen als die Wirkung beim Einsatz von CaO. Bei den vorliegenden Versuchen wurde bewusst  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  verwendet. Einmal ist der Umgang mit gelöschten Kalk gefahrloser zu bewerkstelligen, andererseits ist davon auszugehen, dass bei den eingesetzten Kalkmengen, die beim Löschprozess des Branntkalkes freigesetzte Wärmemenge nicht ausreicht, den Boden merklich zu erwärmen.

Trotzdem wäre es bei einem nächsten Versuch zweckmäßig zu prüfen, ob eine Anwendung von Branntkalk (CaO) zur Kalkung des Bodens eine Verkürzung der Zeitspanne bis zur Inaktivierung der geprüften Mikroorganismen bewirken könnte. Allerdings sollten die Proben nicht erst einen Tag nach der Kalkanwendung untersucht werden, wie bei den vorliegenden Versuchen geschehen, sondern schon eine Stunde danach, um eine Absterbekurve ermitteln zu können.

Salmonellen überlebten in den Versuchen 6 Tage auf den Keimträgern. Dabei reduzierte

sich deren Anzahl von  $10^6$  KBE/ml bis unter die Nachweisgrenze um insgesamt 6 Zehnerpotenzen (Tab. 42). In der freien Suspension die auf den Boden aufgebracht wurde, sind erst nach 13 Tagen unter der Einwirkung des Kalkes von pH 8,5 bis 11,7 ( $1,6 \text{ kg Ca(OH)}_2$ ) alle Salmonellen inaktiviert worden. Bei einer Kalkmenge von  $0,8 \text{ kg/m}^2$  wurden Salmonellen bei einem pH von 7,3 bis 11,4 erst nach 30 Tagen in Bodenproben mit Suspension nicht mehr nachgewiesen. Nach 6 Tagen reduzierte sich die Anzahl von *Enterococcus faecalis* von  $10^7$  KBE/ml und  $10^8$  KBE/ml um 5 Zehnerpotenzen auf  $10^2$  bis  $10^3$  KBE/ml (Tab. 43). SCHIRM (2003) verwendete eine Kalkmenge von  $1,1 \text{ kg CaO/kg TS}$ . Das entspricht einem Mischungsverhältnis von  $250 \text{ g CaO}$  auf  $\text{kg Substrat}$ . Der pH-Wert lag bei 12,9 und blieb während der gesamten Untersuchungszeit von 8 Wochen konstant. Die Ausgangskonzentration an *S. Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* lag bei  $10^7$  KBE/g. Nach einer halben Stunde Inkubation im Substratgemisch war im Kernbereich eine Reduktion beider Mikroorganismen erfolgt. Im Randbereich der Mischung erfolgte eine Reduktion der Anzahl an *Enterococcus faecalis* erst nach einer Stunde um 6 Zehnerpotenzen (SCHIRM, 2003). Die Reduktion der untersuchten Mikroorganismen in den vorliegenden Untersuchungen war ein Prozess über mehrere Tage. Erst nach 30 Tagen konnten Salmonellen nicht mehr nachgewiesen werden. Das Beispiel zeigt, dass durch die angewandte Kalkmenge und dem dabei erzielten alkalischen pH-Wert im Boden die Reduktion der untersuchten Mikroorganismen im Boden relativ langsam verlief. Durch eine Erhöhung der Kalkmenge ließe sich dieser Prozess bestimmt beschleunigen. Ein zu hoher pH-Wert hätte allerdings zur Folge, dass trotz Vermischung mit ungekalktem Bodenmaterial der pH-Wert nicht wieder Richtung Neutralpunkt zu reduzieren wäre mit dem Nachteil, dass anschließend kein Wachstum mehr von Gräsern oder Pflanzen auf den ursprünglich gekalkten Flächen zu erwarten wäre.

Nach SCHIRM (2003) kann mit einer Kalkmenge von  $0,2 \text{ kg CaO/kg TS}$  bei Bioabfällen ein pH  $>12,5$  eingestellt werden. Nach einer Lagerung von 24 Stunden bei pH  $>12,5$  kann von einer ausreichenden Reduzierung von ECBO-Virus, *Salmonella Senftenberg* und *E. coli* ausgegangen werden.

Das Bovine Parvovirus kann bei Freisetzung von Ammoniak in kurzen Zeitspannen inaktiviert werden. Im Praxisbetrieb wurde beim Einsatz von  $0,9 \text{ kg CaO/kg TS}$  im Substrat Gärrückstand eine ausreichende Reduzierung innerhalb von 30 Minuten erreicht. Klärschlamm sollte nach der Einmischung von  $0,9 \text{ kg CaO/kg TS}$  24 Stunden gelagert werden, bevor von einer Inaktivierung des BPV ausgegangen werden kann (SCHIRM, 2003).

Die Versuche von SCHIRM (2003) zeigen, dass der Reduktionserfolg von der angewandten Kalkmenge abhängig ist.

Bei den vorliegenden Versuchen im Boden konnte die Reduktion von *Enterococcus faecalis* auf den Keimträgern schneller erreicht werden als die doppelte Menge an Kalk angewandt wurde, d.h. 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2$  anstatt 0,8  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$ . Am ersten Tag nach der Kalkausbringung reduzierte sich die Anzahl der *Enterococcus faecalis* im Boden von  $10^7$  und  $10^8$  KBE/ml um 1 bis 3 Zehnerpotenzen auf  $10^5$  bis  $10^6$  bei einer Anwendungsmenge von 0,8 kg  $\text{Ca(OH)}_2 / \text{m}^2$  Boden. Der pH-Wert betrug 11,3. Zum Vergleich reduzierte sich die Anzahl von *Enterococcus faecalis* im Boden von  $10^7$  und  $10^8$  um 5 Zehnerpotenzen auf  $10^2$  bis  $10^3$  KBE/ml bei der Anwendung 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2 / \text{m}^2$  Boden bei einem pH-Wert von 11,9. Bei *Escherichia coli* ist der Unterschied nicht zu sehen, da diese Mikroorganismen schon am ersten Tag nach der Kalkausbringung nicht mehr nachzuweisen waren. Bei Salmonellen hat der pH 11,9 bei der Anwendung von 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$  Boden keinen Einfluss auf eine schnellere Reduktion im Vergleich zu der Einwirkung des pH von 11,3. Bei pH von 11,3 reduzierten sich Salmonellen schneller. Am sechsten Tag nach der Kalkausbringung war bei einer Probe eine Anzahl von  $10^2$  KBE/ml bei einem pH von 11,3 nachzuweisen. Die Anzahl der Salmonellen reduzierte sich von  $10^4$  und  $10^6$  um 1 bis 3 Zehnerpotenzen auf  $10^2$  (Tab. 42).

Bei einem pH-Wert von 11,9 waren die Keimzahlen aller untersuchten Mikroorganismen bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Die Kalkversuche mit Boden sind mit Bioabfallversuchen lediglich bedingt vergleichbar. Die Versuche mit Boden erwiesen, dass bei der Verwendung kleinerer Kalkmengen im Vergleich zu Versuchen von SCHIRM (2003), es notwendig ist, die Zeit von mehreren Tagen anzuhalten, um eine Reduktion der Keimzahl zu erzielen.

Zur Schneckenbekämpfung wird 0,5-1 kg  $\text{CaO}/\text{m}^2$  auf landwirtschaftlichen Böden ausgebracht (ANONYM, 2003). Diese Menge soll die Schnecken eliminieren und den Raps im Wachstum und Ertrag nicht negativ beeinträchtigen. Die Einsatzmengen an Kalk zur Schneckenbekämpfung galten als Grundlage der Anwendungsmenge in den eigenen Untersuchungen. Allerdings wurden die Versuche in einem Doppeleinsatz von einmal 0,8 und 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2$  (Löschkalk)/ $\text{m}^2$  durchgeführt.

Am ersten Versuchstag wurde bei der Anwendung 0,8  $\text{Ca(OH)}_2$  ein pH-Wert von 11,4 und bei der Anwendung von 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2$  von 11,7 erreicht. Die mit diesen Kalkmengen beaufschlagten Versuchsflächen wurden 6 Tage nach Versuchsbeginn bis zu 15 cm Bodentiefe umgefräst, mit dem Ziel, den durch die Kalkbeaufschlagung erzielten alkalischen pH-Wert zu reduzieren um anschließend wieder Gras oder sonstige Pflanzen einsäen zu können. Dabei hat sich der pH-Wert des Bodens auf den Versuchsflächen mit 0,8 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$  auf 8,1 gesenkt. Auf den Versuchsflächen, die ursprünglich mit 1,6 kg  $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$  beaufschlagt wurden, pendelte sich ein pH-Wert von 9,3 ein.

Es ist davon auszugehen, dass mit der Einsaat von Gräsern und in diesem Zusammenhang zusätzlich erforderlichen Bodenbearbeitungsmaßnahmen, es zu einer weiteren Vermischung mit Bodenpartikeln kommt, die eine gute Pufferkapazität darstellen und damit den pH-Wert weiter zum Neutralpunkt senken können. Unter der Voraussetzung, dass es in vielen Regionen saure Böden gibt, hat die Kalkbehandlung von Bodenausläufen zum Zwecke der Reduktion bzw. Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen oder Krankheitserregern im Boden eine zusätzlich große umwelthygienische und pflanzenphysiologische Bedeutung.

#### 6.2.5 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau

Die im Zusammenhang des Einsatzes des „BVS-Systems“ und der „Haubendämpfung“ erzielten Ergebnisse können insofern für die ökologische Tierhaltung bzw. der Freilandhaltung von landwirtschaftlichen Nutztieren sinnvoll verwertet werden, als mit den untersuchten Verfahren umweltfreundliche und bodenschonende Techniken vorhanden sind, die zumindest während der Vegetationszeit einen wertvollen Beitrag zur Keimreduzierung im Boden und damit zur Minderung oder Verhinderung des Infektionsdruckes eines Tierbestandes im Freiland beitragen können. Grundsätzlich sind diese Verfahren auch zur Desinfektion von gewachsenem Boden geeignet. Allerdings müssen dabei die geophysikalischen Voraussetzungen gegeben sein (generell ein mit schwerem Gerät befahrbarer, d. h. trockener Acker- oder Wiesenboden, steinarm und mit geringer Hangneigung). Bei gefrorenem oder sehr nassem Boden scheiden die Verfahren aus. Allerdings kann ohne Berücksichtigung der Ökonomie auch ein gefrorener Boden mit dem „BVS-System“ oder der Haubendämpfung an- bzw. aufgetaut werden um in einem 2. Arbeitsgang die Desinfektion der oberflächlichen Bodenschichten zu gewährleisten. Diese Verfahrensweise wäre nur bei kleinen Auslaufhaltungen und nur im Tierseuchenfall vertretbar.

#### 6.2.6 Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse, insbesondere Ableitung von Vorschlägen für Maßnahmen, die durch BMVEL weiter verwendet werden können"

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann das Fazit gezogen werden, dass für die Freilandhaltung von landwirtschaftlichen Nutztieren mit dem „BVS-System“ und der Haubendämpfung ein verlässliches Instrumentarium zur Verminderung bzw. Verhinderung der Anreicherung von Krankheitserregern auf und im Boden zur Verfügung steht. Die untersuchte Technik ist auch dazu geeignet, Tierseuchenerreger wie z. B. Salmonellen im Boden bis zu einer Tiefe von 10 cm zu eliminieren. Bovines Parvo-Virus wurde durch die Hitzeeinwirkung der untersuchten Verfahren sehr stark reduziert. Inwieweit das für andere virale Krankheitserreger

auch zutreffend ist (z. B. für das Influenza-A-Virus der Klassischen Geflügelpest oder das Virus H5N1 der aktuellen Vogelgrippe sollte im Nachgang der vorliegenden Untersuchungen unbedingt abgeklärt werden.

Das BMVEL kann zumindest Vorschläge für die Praxis sowie die unteren Verwaltungsbehörden dergestalt machen, als dass während der Vegetationszeit den ökologischen Tierhaltungsbetrieben mit der Freilandhaltung von landwirtschaftlichen Nutztieren durch den Einsatz der untersuchten Verfahren bei dringender Notwendigkeit diese die Möglichkeit hat, die möglichen Nachteile gegenüber der konventionellen Tierhaltung hinsichtlich seuchenprophylaktischer und tierhygienischer Maßnahmen auszugleichen. Die ökonomische Frage des Einsatzes der Gerätschaften muss für jeden Einzelbetrieb separat betrachtet werden. Bei Vorliegen einer Anzeigepflichtigen Tierseuche ist diese Problematik zunächst zweitrangig.

## 7 Zusammenfassung

Das Halten von Tieren in der Bodenauslaufhaltung hat nicht nur Vorteile. Durch die Ausscheidung von Kot und Urin können sich Krankheitserreger in den oberen Bodenschichten anreichern und aufgrund unterschiedlich langer Überlebenszeiten der verschiedenen Mikroorganismen und Krankheitserreger zu einem Bestandsproblem werden.

Es galt daher Möglichkeiten zu erarbeiten, die unter den Bedingungen in der Praxis in der Lage sind, eine Reduktion bzw. Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen bzw. Krankheitserreger in Böden zu erzielen.

Es wurden zunächst Vorversuche zum Absterbeverhalten ausgewählter Indikatororganismen im Wasserbad unter Verwendung von Böden mit unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten durchgeführt. Während bei *E. coli* und Salmonellen eine Reduktion umso schneller erfolgte, je niedriger der TS-Gehalt des Bodens war, konnten bei *Enterococcus faecalis* keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden.

In den Untersuchungen an einer halbtechnischen Anlage zur thermischen Behandlung von Böden und Sand wurden in der Regel zwar oberflächlich hohe Temperaturwerte von  $> 80\text{ °C}$  erreicht. In 1-2 cm Bodentiefe jedoch nur Maximalwerte zwischen 55 bis  $60\text{ °C}$ . Nach der Wärmebehandlung des Bodens und Sandes kam es sehr schnell zu einer Abkühlung, so dass die Temperaturen von  $55\text{ °C}$  bis  $60\text{ °C}$  nur sehr kurzfristig zum Tragen kamen. Die Folge war eine unzureichende Reduktion bzw. Inaktivierung der untersuchten Indikatororganismen, unabhängig davon, ob diese gleichmäßig vor der Hitzebehandlung in den Boden eingemischt oder mit einer speziellen „Keimträgertechnik“ eingebracht wurden.

Die Versuche zur thermischen Desinfektion mit dem Einmischverfahren brachten die Erkenntnis, dass Boden im Vergleich zu Sand schwieriger zu desinfizieren ist, da der Boden im Vergleich zum Sand eine inhomogene Masse darstellt und eine Einmischung der Mikroorganismen in den Boden nicht gleichmässig erfolgen kann. Dieser Nachteil kann durch die „Keimträgertechnik“ ausgeglichen werden, weil hierbei eine definierte Menge an Mikroorganismen auf die Keimträger aufzubringen ist.

In Großversuchen schlossen sich Untersuchungen zur thermischen Bodendesinfektion mit einem Injektorbrenner („BVS“-System) im Freiland an.

Die Ergebnisse erbrachten für die Praxis die Erkenntnis, dass mit dem „BVS-System“ unter optimalen Bedingungen ein mit seuchenhygienisch relevanten Mikroorganismen hoch kontaminierter Ackerboden durch die Hitzeeinwirkung des Systems soweit desinfiziert werden kann, dass von ihm keine Ansteckungsgefahr mehr für freilebende Tiere, Haustiere und landwirtschaftliche Nutztiere mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgehen wird.

Voraussetzungen einer zuverlässigen Bodendesinfektion mit dem BVS-System sind allerdings wichtige bodenphysikalische Eigenschaften (feinkrümelige Struktur; Trockensubstanzgehalt >80 %, besser 90 %) und eine einwandfreie, zuverlässige und permanente Funktionsweise der Thermokammer. Leider sind die bodenphysikalischen Voraussetzungen nicht das ganze Jahr über gegeben (Frühjahrsnässe, Starkregenereignisse, Frostperioden), so dass unter diesen Voraussetzungen eine verlässliche Alternative zu erarbeiten ist.

Zur endgültigen Beurteilung des „BVS-Systems“ sollten weitere Untersuchungen bei weniger guten bodenphysikalischen Voraussetzungen folgen. Auch phytohygienische Fragestellungen könnten dabei mit abgeklärt werden. Dieses Gerät findet seinen Einsatzbereich seither nur im Bereich von Gärtnereien zur Inaktivierung von Nematoden und Unkrautsamen.

Mit der sog. „Haubendämpfung“ lassen sich sehr gute Reduktionsleistungen bei den untersuchten Mikroorganismen erzielen, da Temperaturwerte bis über 90 °C in 5-10 cm Bodentiefe erreicht werden konnten. Für diese Verfahren gelten im Prinzip dieselben Voraussetzungen wie bei der Wärmebehandlung des Bodens mit dem „BVS-System“. Ein großer Nachteil sind das aufwendige Equipment zur praktischen Durchführung einer Bodendämpfung und die geringe Flächenleistung pro Stunde. Diese Voraussetzungen stehen dem Einsatz der erfolgreichen Desinfektion einer Boden- oder Auslaufhaltung entgegen.

Nach Untersuchungsergebnissen, die in einem einmaligen Versuch zur Kalkbehandlung des Bodens erzielt wurden, kann die Anwendung von Löschkalk nach genau vorgegebener Verfahrensweise eine Methode darstellen, die sowohl bei sehr trockenen als auch nassen Böden eine zuverlässige Reduktion bzw. Inaktivierung von Krankheitserregern bewirken kann.

Für die Praxis könnte zunächst die Aussage gemacht werden, Bodenauslaufhaltungen, die mit der genannten Kalkmenge behandelt wurden, 14 Tage lang liegen zu lassen, danach mit einer Bodenfräse mindestens 15 cm tief zu fräsen. Dadurch kann eine „Realkalisierung“ des Boden bzw. ein pH-Rückgang bis in die Nähe des Neutralpunktes erreicht werden. Eine sich anschließende Einsaat von Gräsern (z.B. in Hühner- oder Schweineauslaufflächen) wird anschließend ohne Aufwuchsprobleme wieder möglich. Diese Aussage muß unter Verwendung von Branntkalk und Kalkmilch durch weitere Untersuchungen unbedingt untermauert werden.

Bei gefrorenem Boden scheidet jedoch jede in dem vorliegenden Vorhaben dargestellte Methode aus. Ein Einsatz von thermischen Geräten bei Frost wäre zwar denkbar und auch durchführbar. Allerdings wäre dabei der Energieaufwand sehr hoch und damit die Maßnahme zur Reduktion unerwünschter Mikroorganismen für den einzelnen tierhaltenden Betrieb ökonomisch nicht vertretbar. Im Seuchenfall mit dem zwingenden Grund eine Bodendesinfektion durchzuführen jedoch eine Möglichkeit, kleinere Auslaufflächen zu desinfizieren.

Sporadisch wurde zusätzlich der Einfluss der Sonneinstrahlung auf die Tenazität von unter Solarfolien artifiziell auf Versuchsflächen ausgebrachten Mikroorganismen untersucht.

Diese Untersuchungen wurden in den Sommermonaten bei relativ günstigen äußeren Bedingungen hinsichtlich des Überlebens der untersuchten Mikroorganismen durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren sehr uneinheitlich und insgesamt nicht zufriedenstellend. Der Einsatz von Folien zum Zwecke der Erhöhung der Bodentemperatur in den obersten Bodenschichten um damit eine Reduktion pathogener Mikroorganismen zu erhalten, stellt aufgrund der erhaltenen Ergebnisse keine empfehlenswerte Maßnahme für die Praxis dar.

- 8 "Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Ziele; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen"

Geplante Ziele	erreichte Ziele	weiterführende Fragestellung- bzw. Problemlösung
1. Erarbeitung einer umweltfreundlichen Methode zur Bodendesinfektion 	1. Keimreduktion bzw. Abtötung von Pathogenen bei trockenem („saatbeetbereitem“) Boden erfolgreich	1. Einsatz der Haubendämpfung zur Bodendesinfektion (hpts. gegen Influenza-Viren (u.a. Virus H5N1) bzw. gegen vergleichbare „Indikatorviren“)
2. Einsatz der thermischen Verfahren unter verschiedenen bodenphysikalischen Bedingungen 	2. bei nassen, gefrorenen Böden kann ursprüngliches Ziel nicht erreicht werden; Einsatz nicht empfehlenswert !	2. Einsatz von gekörntem Branntkalk (CaO) und Weißfeinkalk sowie Kalkmilch (40 % ig) unter besonderer Berücksichtigung extrem, trockener, sehr nassen und leicht gefrorenen Böden)
3. Empfehlungen für die Praxis zur Vorbeuge und Bekämpfung von Tierseuchen in der Freilandhaltung 	3. Empfehlungen insofern zu machen, als dass ein mit schwerem Gerät befahr- und bearbeitbarer Boden vorliegt bzw. vorliegen muss !	
4. Fachveranstaltungen zum Wissenstransfer in die Praxis durch die Verwaltungen 	4. Bisher nur ansatzweise erfolgt	

## 9. Literatur

ADE-KAPPELMANN, K. (2004): „Überprüfung der phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus der anaeroben Behandlung der Bioabfällen“ Unveröffentl. Arbeit. Institut für Umwelt- und Tierhygiene Universität Hohenheim

Ajariyakhajorn, C., Goyal, S.M., Robinson, R.A., Johnston, L.J., Clanton, C.A., (1997): „The survival of *Salmonella anatum*, pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine slurry.“ New Microbiol. 20(4):365-9.

ALTHAUS, H. (1983): „Hygienische Bedeutung der Lebensdauer von Bakterien und Viren in Grundwasserleitern im Zusammenhang mit den Grundwassergewinnungsanlagen“ in: Forum Mikroorganismen und Viren in Grundwasserleitern, München. DVGW-Schriftenreihe Wasser Nr. 35, Eschborn, ZfGW-verlag, Frankfurt a. M. 25-40

ANONYM, (2003) „Rapssat mit der Kalkung vorbereiten“ in: BW agrar 27/2003, S.22

ARNDT, M. (1996): Thermische Nematodenbekämpfung. Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Bahnhofstraße B 147, 86633 Neuburg/Donau. Unveröffentl. Mitteilung.

BANDICK N., ACKAN M., KOLBE A. (1998) „Salmonella in der Einstreu von Jungmasthühnern“ 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“, Garmisch-Partenkirchen, Proc. DVG, Gießen 1998, 365-370

BENZLER, J.H. (1986): „Zur Geschichte der Einleitung und der Bezeichnung der Bodenarten in der Bundesrepublik Deutschland“ Verlag Niedersächs. Landesamt für Bodenforschung, Hannover

BESSE, F. (1997): „Multitalent. In: Politische Ökologie“. Sonderheft 10: Bodenlos – Zum nachhaltigen Umgang mit Böden, S. 17)

BEST, E., MÜLLER, W., STRAUCH, D. (1971): „Untersuchung über die Tenazität von Krankheitserregern in tierischen Fäkalien“ 4. Mitteilung: „Tenazitätsversuche mit Salmonellen in

- natürlich gelagerten Flüssigmisten von Rindern und Kälbern. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 84, 184-188
- BEUTIN, L., NIEMER, U. (1995): „Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)“ Bundesgesundheitsblatt 11, 422-427
- BEUTIN, L. (1996): „Infektionen mit Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)“ Bundesgesundheitsblatt 11, 426-429
- BITTON, G., PANCOROBO, O.C., FARRAH, S.R. (1984): Virus transport and survival after land application of sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol. , 47(5):905-9
- BLACK, M.I., SCARPINO, P.V., O'DONNELL, C.J., MEYER K.B., JONS, J.V., KANESHIRO, E.S. (1982) „Survival rates of parasite eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion“ Applied and Environmental Microbiology 44, 1138-1143
- BNatSchG - Bundesnaturschutzgesetz vom 25. März 2002  
(BGBl. I Nr. 22 vom 3.4.2002 S. 1193; 25.11.2003 S. 2304)
- BOCH, J., SUPPERER, R. (1992): „Veterinärmedizinische Parasitologie“ 4 Auflage, Verlag Paul Paray
- BÖHM, R., KUHLMANN, R.H., und Strauch, D. (1984): „Abtötung von Krankheitserregern im Flüssigmist durch Mikrowellen“ Agricultural Wastes 9, 147-154
- BÖHM, R., DRCA, M., PHILIPP, W. (2004): „Bericht zu der Keimflora in Liegeboxen für Milchkühe im Hinblick auf Eutergesundheit und Milchqualität“ Unveröffentl. Bericht. Institut für Umwelt- und Tierhygiene. Universität Hohenheim.
- BRÄUNINGER, S., FISCHER, I., PETERS, J. (1994): „Zur Temperaturstabilität des bovinen Parvovirus“ Zbl. Hyg., 196, 270-278
- Bundes-Bodenschutzgesetz vom 17. März 1998 (BGBl. I 1998 S. 502, 2001 S. 2331)
- BUCHENAUER, H. (1998): Einfluss eines thermischen Bodenentseuchungsverfahrens auf den Befall von Serepta-Senf mit Kohlhernie, hervorgerufen durch *Plasmodiophora brassicae*. Inst. für

Phytomedizin der Universität Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5, 70599 Stuttgart. Unveröffentl. Mitteilung

BUTZ, U.C. (1993): Untersuchungen über die Möglichkeit der Abtötung von Krankheitserregern in Klärschlamm durch Mikrowellen unter besonderer Berücksichtigung parasitologischer Aspekte. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig –Universität Gießen.

DEDIE, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.J., WEINKE, T. (1993): Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

DEUTSCHES TIERÄRZTEBLATT (2001): Neue Verordnung zur Hennenhaltung. Deutsches Tierärzteblatt 12/2001, S. 1334 –1335.

DINTER P.S. (1988) „Hygiene von humusreichen und anderen Böden“. Unveröffentlichter Bericht des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim

DUNHAM, W.B. (1977): „Virucidal agents in disinfection, sterilisation and preservation“ ed S.S. Block, Vol. 2. edition, Lea and Febiger. Philadelphia, pp. 1049 Seiten

FEACHEM, R.G., BRADLEY, D.J., GARELICK, H., MARA, D.D. (1983): „Health aspects of extracta and wastewater treatment“ Sanitation and Disease, World Bank Publikations, Washington, 1983

FORSTER, M. 1970:

“Der Einfluss von Abwasser, Schwemmist und Kompostierung auf die Lebensfähigkeit parasitärer Vermehrungsstadien“ Zsch. F. Wasser- und Abwasserforschung 3, 176-184,

FORSTER, M. 1970:

“Untersuchungen über die Ansteckungsfähigkeit von Eiern menschen- und tierpathogener Würmer in landwirtschaftlich verwerteten Abwasserschlämmen“ Zeitschrift für Kulturtechnik 11, 350-365

FRIES R (2000): Untersuchungen zur Salmonellensituation in Schweinemastbeständen“ Rheinische Friedrich-Wilhelms-Univ., 2000. –39 S. (Forschungsberichte; 79)

GEBRA, C.P., SCHEIBERGER, G.,E. (1975) „The effects of particulates on virus survival in seawater” J.Water Pollut. Contr. Fed. 93-103

GEBRA, C.P., WALLIS, J., MELINICH, L. (1975) „Fate of waste water bacteria and viruses in soil“ J. Irrig. Drain. Div 101, 157-174

GIEß, S. (1992): Bioabfallkompostierung: Untersuchungen zur Seuchenhygiene. Hrsg. Ministerium für Umwelt Baden-Württemberg, Kernerplatz 9, 7000 Stuttgart 1

GUO, X., CHEN, J., BRACKETT, R.E., BEUCHAT, L.R. (2002) “Survival of Salmonella on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil”. Journal of Food Protection: Vol. 65, No. 2 pp. 274-279

HARMSSEN, H. (1954):

“Die Stuttgarter und Wiener Typhusepidemien als Beispiele der Gefahr fäkaler Salat- und Gemüsekopfdüngung durch Verrieselung und Verrengung“ Forum Städtehygiene 5, 54-57

HARTGE, K.H., HORN R. (1999): „Einführung in die Bodenphysik“ Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

HEGE, H; ROß, H. (1972): Das Dämpfen von Böden und Erden. KTBL-Schrift 153.

Hrsg.:Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), Bartningstraße 49 in 64289 Darmstadt, 17,29

HESS, E., LOTT, G., BREER, C. (1974):

“Klärschlamm und Freilandbiologie von Salmonellen” Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B. 158, 446-455

HIEPE, Th., BUCHWALDER, R. (1991): „Wirtschaftsdünger als Vektor für Parasiten – Ein Erfahrungsbericht“ Dtsch. Tierärztl. Wschr. 98, 268-272

HIRTE, W.F. (1997): Untersuchungen zur Tenazität von Güllebakterien im Boden Arch. Acker- und Pflanzenb. Bodenkd. 21(5), 379-380.

HOF, H., MÜLLER, R.L., DÖRRIES, R. (2000). Mikrobiologie. Thieme-Verlag

HOFERER, M. (2001) „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“.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

HUMPREY, T.J., CHAPMAN, P.A., ROWE, B., GILBERT, R.J. (1990): A comparative study of the heat resistance of *Salmonellas* in homogenized whole egg, egg yolk or albumen. *Epidemiol. Infect.* 104, 237-241

KATAN, J., GREENBERGER, A., ALON, H., GRINSTEIN, U.A. (1976)

„Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-born pathogens“ *Phytopathology* 66: 683-688

KIST, M. (1991):

“Increase in *Salmonella Enteritidis* infections in man: a world-wide problem” *Öffentliches Gesundheitswesen* 53, 687-692

KIST, M. 1992: “Seuchenartige Zunahme der Infektionen durch *Salmonella Enteritidis* „ *Deutsche Ärzteblatt* 89, B-1070-B-1072

KNOP, M. (1997) “Hygienische Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung unter Verwendung des Testkeims *Salmonella Enteritidis*“ Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig

KOEHLER, E.-M. (1993): Untersuchungen zur Tenazität und Versickerung animaler Viren in Standardböden und unterschiedlichen Böden der Wasserschutzzone II des Donaurieds. *Agrarwiss. Diss., Univ. Hohenheim.*

KONNO, T., SUZUKI, H., IMAI, A., ISHIDA, N. (1977) “Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants: fecal shedding and serologic response.” *J. Infect. Dis.* 135, 259 ff.

KOOREVAAR, P. MENELIK, G., DIRKSEN, C. (1983): „Elements of soil physics“ Elsevier Amsterdam

KUHLMANN, R.H., 1982: Der Einfluss von Mikrowellen im Durchlaufverfahren auf die Inaktivierung von Viren im Flüssigmist. Agrarwiss. Diss., Univ. Hohenheim

KUNTZE, H., ROESCHMANN, G., SCHWERDFEGER, J. (1994): „Bodenkunde“ 5 Auflage Stuttgart-Ulmer Verlag

LAMBERT, R.J.,(2003): A model for thermal inactivation of microorganisms. J. Appl. Microbiol; 95(3):500-7

LANG, A. (1987):

„Mikrobiologische Untersuchung über die Eignung verschiedener Indikator- mikroorganismen zur seuchenhygienischen Beurteilung von Klärschlamm“

Agrarwiss. Dissertation, Universität Hohenheim

LEISSNER, A., (1988): Schilf-Binsen-Kläranlagen aus hygienischer Sicht. Das Öffentliche Gesundheitswesen 50 (1988) 647-650

LEWIS, J. (1984):

„A comparison of parasite ova as indikator organisms in sewage sludge treatment and disposal“

L'Hermite, P., H. Ott (Eds), Processing and use of sewage sludge, 232-236, D. Reidel

Publishing Comp., Dordrecht, Boston, Lancaster

LORENZ, H. (2004) :Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Abfallwirtschaft. Förderkennzeichen 200 33 331 „Überprüfung der phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus der anaeroben Behandlung von Abfällen. Unveröffl. Bericht des Instituts für Phytomedizin der Universität Hohenheim.

LORENZ, H., HELLWALD, K.H., BUCHENAUER, H., (2001): Untersuchungen zur Phytohygiene in Anaerobanlagen“ Abschlussbericht des Instituts für Phytomedizin der Universität Hohenheim,

MAHNEL, H. (1997): Resistenzunterschiede zwischen Viren verschiedener Gruppen gegenüber einigen chemisch-physikalischen Dekontaminationsverfahren.

Infection 5, 240-246.

MARISKA, C.A. VAN LOENEN, YZANNE, T., MULLINS, C.E., WILSON, M.J., FEILDEN, N., WENDY, E. SEEL (2002): Low temperature/ short duration steaming as a sustainable method of soil disinfection. Preceeding of the COR Conference, 26-28<sup>th</sup> March 2002, Aberystwyth, pp. 211-214

MARTENS, W., FINK, A., PHILIPP, W., WEBER, A., WINTER, D., BÖHM, R. (1999): "Seuchenhgienische Bewertung von Anaerobverfahren" Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: „Biologische Abfallbehandlung- Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29-31, März 1999, Universität-hohenheim. 150-163

MARTENS, W. (2003): Suitability of different test organisms as parameter to evaluate the hygiene effectiveness of treatment options for biowaste" ECN/ORBIT e.V. Animal-By-Products Regulation. Workshop 2003, Pres. No. 6

MEYER, J., BERTRAM, A. (1997): Stellungnahme zur- thermischen Bodenverbesserungs- und Entseuchungsanlage NEMAT-EX. Inst. für Landtechnik der TU München. Abt. Technik im Gartenbau, Vöttinger Straße 36 in 85350 Freising. Unveröffentl.Mitteilung.

MICHELS, S., (1986). "Vergleichende Untersuchungen zur Widerstandsfähigkeit der Eier des Schweinespulwurms (*Ascaris suum*) verschiedener Herkunft" Diplomarbeit, Inst. für Zoologie (Abt Parasitologie), Universität Hohenheim

MITSCHERLICH, E., MARTH, E.H. (1984): 678-9"Microbiological Survival in the Environment: bacteria and rickettsiae important inhuman and animal health" Berlin: Springer

MOĆE-LLIVINA, L., MUNIESA, M., PIMENTA-VALE, H., LUCENA, F., JOFRE, J. (2003): Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 3 Mar., p. 1452-1456.

MOELLER, F. (1984): Die Selbstreinigung fäkal kontaminierter Böden. Dissertation, Universität Jena.

MOESCHLE (2002): <http://www.moeschle.de/tie.htm>

MONTEITH, H.D., SHANNON, E.E., DERBYSHIRE, J.B. (1986): „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 (Lond)., 97(1):175-84.

MORRIS, L.G. (1956): “Erdsterilisation durch Hitzebehandlung” Gartenwelt 56, 248-249

MÜLLER, H.E. (1981): „Abschätzung des Infektionsrisikos durch Abwasser und Klärschlamm“  
Forum-Städte-Hygiene 32, 146-152

Naturschutzgesetz – NatSchG in der Fassung der Bekanntmachung vom 29. März 1995, GBl. S. 385, zuletzt geändert durch Gesetz zur Änderung des Naturschutzgesetzes vom 19. November 2002, GBl. S. 424 und Art. 4 des Gesetzes zur Änderung von Vorschriften über die Umweltverträglichkeitsprüfung und anderer Gesetze vom 19. November 2002, GBl. S. 428

PALUSZAK-Z., LIGOCKA A., BREZA-BORUTA, B., OLSZEWSKA H. (2003) Das Überleben des ausgewählten Fäkalbakteriums in Torf und Boden. Fachzeitschrift für Elektronik der polnischen landwirtschaftlichen Universitäten , Tierackerbau, Ausgabe 6, Ausgabe 2.

O'DONNELL, C.J., MEYER, K.B., JONES, J.V., BENTON, T., KENESHIRO, E., NICHOLS, J.S., SCHÄFER, F.W. (1984 ):„Survival of parasite eggs upon storage in sludge“ Applied and Environmental Microbiology 48, 618-625

PAUL, E.A., CLARC, F.E.(1996): „Soil Microbiology and Biochemistry” 2. ed – London: Academic Pr.

PEDOSAN GBR MBH (2002): Thermische Bodenverbesserungs- und –Desinfektionssystem BVS. Alternativverfahren zur Beseitigung von Nachbauproblemen in der Landwirtschaft. Informationsmaterial der Fa. PEDOSAN, Metterstraße 17 in 74343 Sachsenheim.

Pflanzenschutzgesetz – PflSchG. Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen. Fassung vom 14. Mai 1998 (BGBl. I 1998 S. 971, berichtigt am 18. Juni 1998, BGBl. I 1998 S. 1527 und am 27. November 1998, BGBl. I 1998 S. 3512)

PHILIPP, W. (2004): Anforderungen an die Hygienisierung von Substraten. Vortrag bei den KTBL-Tagen vom 30.-31. März 2004 in Osnabrück „Die Landwirtschaft als Energieerzeuger“

PIOCH, G., BRÄUNIG, I. (1989): „Die Tenazität der Salmonellen in Umweltmedien und ihre Verbreitung mit Abprodukten“ Z. Ges. Hyg. 35 (11), 645-649

POHLIG-SCHMITT, M. (1987): „Seuchenhygienische Untersuchungen bei der thermophilen und mesophilen anaeroben alkalischen Faulung von Komunalen Klärschlamm“ Agrarwiss. Dissertation, Institut für Umwelt und Tierhygiene, Universität Hohenheim

POLLMANN, B., (1995): Tomatensamen als Testorganismen bei der Bioabfallkompostierung. Labor- und Kompostierungsversuche. Agrarwiss. Diss., Inst. für Pflanzenproduktion und Landwirtschaftsekologie, Univ. Hohenheim

REHSE, W. (1997): Diskussionsgrundlagen für die Dimensionierung der Zone II von Grundwasserschutzzonen bei Kies- und Sandgrundwasserleitern für die Fremdstoffgruppe abbaubare organische Verunreinigungen, pathogene Keime und Viren. Eidgenössisches Amt für Umweltschutz, 3003 Bern.

ROBERTS, P.L.; HART, H. (2000): Comparison of the inactivation of canine and bovine parvovirus by freeze-drying and dry-heat treatment in two high purity factor VIII concentrates. *Biologicals.* ;28(3): 185-8.

ROLLE, M., MAYR, A. (1993): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Enke Verlag. Stuttgart

SABIN, A. B., (1955) “ Behavior of chimpanzee-avirulent poliomyelitis viruses in experimentally infected human volunteers” *Am. J. Med. Sci.* 230, 1 ff

SANTAMARIA, J., TORANZOS, G.A. (2003): Enteric pathogens and soil. A short review. Environmental Microbiology Laboratory, Department of Biology, University of Puerto Rico, P.O. Box 23360, 00931, San Juan, Puerto Rico

SCHEFFER, F.; SCHACHTSCHABEL, P.; BLUME, H.-P. (2002): Lehrbuch der Bodenkunde - 15.Auflage, Heidelberg-Berlin Verlag

SCHINDLER, R.P.G., GERSON, D., VOGT, H., METZ, H. (1991)

„Über das Vorkommen von Salmonellen in Seen und Flüssen und im Trinkwasser aus Südbayern“ Das Öffentliche Gesundheitswesen 53, 333-337

SCHMIDT, B., LENK, V. (1960): „Der Nachweis von Salmonellen im Abwasser als möglicher Maßstabsab für die Seuchenlage einer Bevölkerung“ Zbl. Für Bakteriologie, Parasitenkunde und Hygiene, Originale A 178, 459-483

SCHROEDER, D. (1992): Bodenkunde in Stichworten“ 5 Auflage. Berlin-Stuttgart

SCHUH, R. (1984): „Untersuchungen über das Vorkommen von Parasiteneiern in Klärschlamm von Abwasserreinigungsanlagen in Baden-Württemberg sowie über den Einfluss von Kalk auf Eier von *Ascaris suum*“ Diplomarbeit, Inst für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim

SCHWARZ, M. (2003): Vergleichende seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an horizontal und vertikal beschickten, bewachsenen Bodenfiltern mit vorgeschalteter Mehrkammerausfallgrube bzw. einem als Grobstofffang dienenden Rottebehälter (Rottefilter). Vet.-med. Diss., Freie Universität Berlin

SILI, S., LENK, V. (1990): „Erfahrungen bei der Untersuchung eines abwasserbelasteten Vorfluters auf Darmpathogene, Salmonellaphagen und andere Fäkalparameter.“ Forum Städte-Hygiene 41 192-196

SLANETZ and BARTLEY (1964):

„Detection an sanitary significanca of faecal streptococci in water“

Am. K. Publ. Health 54, 609-611

SOLDIRER, W. (1991): Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß einer thermischen Desinfektion von Flüssigmist auf die Vermehrungsfähigkeit ausgewählter Mikroorganismen. Vet.-med., Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

SPILLMANN, S.K., TRAUB, F., SCHWYZER, M., WYLER, R. (1987): Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment“ Applied and Environmental Microbiology, p.2077-2081

SPYNU K.I., IAROV, P.I., VUTKAREV, V.P., PREIGEL', I.A. (1998): Survival of the poliomyelitis Virus in environmental objects; 33 (3):327-31

STRAUCH, D. (1991): Wirtschaftsdünger als Vektor für Infektionserreger. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 98, 265-268

STRAUCH, D. (1991): Survival of pathogenic microorganisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. Rev. sci. tech. O.i.e. off int. epizoot. 10: 813-846

STRAUCH et al. (1992): „Umweltgerechte Nutzung von Agrarlandschaften“

TIERSEUCHENGESETZ-TierSG (2001): vom 11. April 2001 – BGBl I, S. 507

TISLER, L. (1987): „Zum Problematik mikrobiologischer Hygienetests in Lebensmittelbetrieben“ Forum-Städte-Hygiene 38, 42-43

TSCHÄPE, H. (1996).

„Ursachen des Auf und Ab der Salmonellosen des Menschen“ Bundesgesundheitsblatt 39, 260-263

TURNER, C. (2002): The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure.” Bioresour Technol., 84(1):57-61.

VAN DONSEL, D.J., GELDREICH, E.E., CLARKE, N.A . (1967): Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to stormwater pollution. Appl. Microbiol. 15(6), 1362-1370

WAGNER, J. A. (1993): Untersuchungen zur Tenazität und zum Infiltrationsverhalten von Salmonelen und Güllenkeimen in Standardböden und in verschiedenen Böden des Wasserschutzges Donauried. Agrarwiss., Diss., Univ. Hohenheim

WASMUS, E. (1986):

„Klärschlamm Behandlung mit niederen Kalkmengen aus seuchenhygienischen Gesichtspunkten“ Forum-Städte-Hygiene 37, 79-82

WELLINGER, A., BASERGA, U., EDELMANN, W., EGGER, K., SEILER, B. (1991): „Biogas-Handbuch“ Verlag Wirz Ag Aarau

WHG – Wasserhaushaltsgesetz (2004). Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts vom 19. August 2002 (BGBl. I Nr. 59 vom 23.8.2002 S. 3245; 6.1. S. 2)

YEAGER, J.G., O' BRIEN, R.T. (1979): Enterovirus inactivation in soil. Appl. Environ. Microbiol.;38(4):694-701

WIERENGA, P.J., NIELSEN, D.R., HORTON, R. KIES, B. (1982): in M.D. Kral (Hrg.): „Predicting Tillage Effects on Soil Physical Properties and Processes“ ASA Special Publ. No. 44, Madison, Wisconsin

## ANHANG

- 1 Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim
- 2 Zetapor, CUNO Art. Nr.: 2700302
- 3 Polycarbonat-Membranen, INFILTEC Art. Nr.: KN1CP 81030
- 4 Minifuge T, Rotor 3360, Heraeus Sepatech, D-37520 Osterode am Harz
- 5 Auflichtmikroskop Wilovet, Will Wetzlar
- 6 Heraeus Sepatech, D-37520 Osterode am Harz
- 7 Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 22726 (ohne Stehrand)
- 8 Biochrom/Seromed<sup>®</sup>, D-12247 Berlin, Art. Nr. T 043-50
- 9 Biochrom/Seromed<sup>®</sup>, D-12247 Berlin, Art. Nr. SO-115
- 10 Biochrom/Seromed<sup>®</sup>, D-12247 Berlin, Art. Nr. K029
- 11 Greiner GmbH, D-72636 Frickenhausen, Art. Nr. 690160
- 12 Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 178905
- 13 Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 168381
- 14 Juan Typ GR4-12, Jouan S.A. rue Bobby Sands, 44805 Saint-Herblein, France
- 15 Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 188261
- 16 Biochrom/Seromed<sup>®</sup>, D-12247 Berlin, Art. Nr. A321-42
- 17 Biochrom/Seromed<sup>®</sup>, D-12247 Berlin, Art. Nr. A321-27
- 18 Biochrom/Seromed<sup>®</sup>, D-12247 Berlin, Art. Nr. A2612

- 19 Multimed, D-73230 Kirchheim u.Teck, Art. Nr.9620701
- 20 Multimed, D-73230 Kirchheim u.Teck, Art. Nr.149026