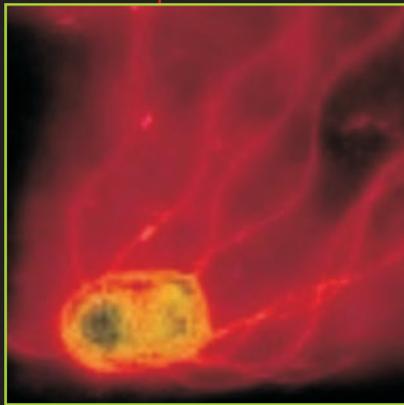


**UNTERSUCHUNGEN ZUR INAKTIVIERUNG VON
AUSGEWÄHLTEN KRANKHEITSERREGERN UND
INDIKATORORGANISMEN IM BODEN BEI DER
ANWENDUNG VON THERMISCHEN VERFAHREN
UND KALK**

KRZYSZTOF WASIAK



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

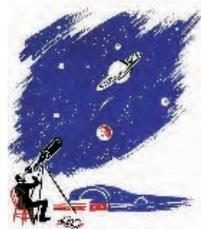
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Hygiene
und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Fachbereich vertreten durch Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

und

**dem Institut für Umwelt und Tierhygiene
der Universität Hohenheim Stuttgart**

Betreuer: Prof. Dr. R. Böhm

**Untersuchungen zur Inaktivierung von ausgewählten
Krankheitserregern und Indikatororganismen im Boden bei
der Anwendung von thermischen Verfahren und Kalk**

**INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. Beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**eingereicht von
KRZYSZTOF WASIAK
Tierarzt aus Radom/Polen**

Gießen 2009

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Vetreinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Prof. Dr. R. Böhm

Tag der Disputation: 30. 04. 2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Problematik der Bodenkontamination mit Mikroorganismen in Freilandhaltung	2
2.2	Vorkommen und Tenazität von Mikroorganismen im Boden und anderen Medien	3
2.2.1	Tenazität der Mikroorganismen und Faktoren, die sie beeinflussen	4
2.2.1.1	Tenazität der Mikroorganismen abhängig von anderen physikalischen Einflüssen	5
2.2.1.2	Tenazität der Mikroorganismen abhängig von Temperatur	6
2.2.1.3	Tenazität der Mikroorganismen abhängig von chemischen Einflüssen	7
2.2.1.4	Tenazität der Mikroorganismen abhängig von protektiver Wirkung der Proteine	8
2.3	Gesetzliche Grundlagen	8
2.3.1	Tierseuchengesetz (TierSG)	8
2.3.2	Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG)	8
2.3.3.	Pflanzenschutzgesetz (PflSchG)	9
2.4	Charakterisierung der in den Untersuchungen erfassten Bakterien (Prüforganismen)	9
2.4.1	<i>Escherichia coli</i>	9
2.4.2	Enterokokken	10
2.4.3	Salmonellen	11
2.5	Charakterisierung des in den Untersuchungen erfassten Virus	13
2.5.1	<i>Bovines Parvovirus</i> (BPV)	13
2.6	Physikalische Methoden der Bodendesinfektion	13
2.6.1	Bodendämpfung	14
2.6.2	Bodenerhitzung mit Propangas	15
2.6.3	Bodenerhitzung mit Sonnenenergie unter Anwendung von Solarfolien	15
2.6.4	Bodenerhitzung mit Mikrowellen	16
2.6.5	Bodenkalkung	17
3.	Eigene Untersuchungen	18
3.1	Material und Methoden	18
3.1.1	Bakteriologische Methoden	19
3.1.1.1	Ermittlung der Gesamtbakterienzahl (GBZ) bei 37 °C	19
3.1.1.2	Nachweis von <i>Escherichia coli</i>	20

3.1.1.3	Nachweis von <i>Enterococcus faecalis</i>	21
3.1.1.4	Nachweis von <i>Salmonella</i> Typhimurium	22
3.1.2	Benutzte Expositionstechniken	23
3.1.2.1	Einmischverfahren zur Kontamination der Untersuchungsmatrix	23
3.1.2.2	Aluminiumkeimträgertechnik für Bakterien	24
3.1.2.3	Anwendung von Mikroorganismen in „freier Suspension“	24
3.1.3	Virologische Methoden	24
3.1.3.1	Zellkulturen	24
3.1.3.2	Virusvermehrung	26
3.1.3.3	Herstellung der Keimträger zur Tenazitätsprüfung mit BPV	26
3.1.3.4	Elution der Proben	27
3.1.3.5	Virusnachweis	28
3.1.4	Laborversuche	29
3.1.4.1	Tenazitätsversuche mit Bakterien im Wasserbad	29
3.1.4.2	Bestimmung der Tenazität in autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden	30
3.1.4.3	Bestimmung der Tenazität bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten in nativen Böden	31
3.1.4.4.	Bestimmung der Tenazität auf den Keimträgern im Boden	31
3.1.5	Halbtechnische Versuche zur Bodendesinfektion mit Kalk	31
3.1.5.1	Versuche mit Kalk in verschiedenen Zubereitungsformen	34
3.1.5.2	Orientierungsversuche mit Kalkmilch in verschiedenen Konzentrationen	34
3.1.5.3	Versuche mit Kalkmilch (1,25 kg Ca (OH) ₂ /m ²)	36
3.1.5.4	Versuche mit Kalkmilch (5,0 kg Ca (OH) ₂ /m ²)	38
3.1.5.5	Versuche mit Kalkmilch (2,5 und 5,0 kg Ca (OH) ₂ /m ²)	39
3.1.5.6	Versuche mit gemahlenem Branntkalk	40
3.1.5.7	Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten zwischen 58,9 % und 90,9 %	40
3.1.5.8	Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten von 30 % und 50 %	41
3.1.6	Feldversuche	41
3.1.6.1	Versuche mit einem Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem mit Injektorbrenner	41
3.1.6.2	Versuche zum Einsatz von „Solarfolien“	46
3.1.6.3	Versuche zum Einsatz eines Gerätes zur Bodendämpfung	47
3.1.6.4 .	Versuche zur Anwendung von Branntkalk	48

3.2	Ergebnisse	52
3.2.1	Ergebnisse der Laborversuche	52
3.2.1.1	Tenazität in autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden	52
3.2.1.2	Tenazität bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten	52
3.2.1.3	Tenazität der Mikroorganismen auf den Keimträgern im Boden	53
3.2.2	Ergebnisse der halbtechnische Versuche zur Bodendesinfektion mit Kalk	58
3.2.2.1	Versuche mit Kalk in verschiedenen Zubereitungsformen	58
3.2.2.2	Orientierungsversuche mit Kalkmilch in verschiedenen Konzentrationen	59
3.2.2.3	Versuche mit Kalkmilch (1,25 kg Ca(OH) ₂ /m ²)	63
3.2.2.4	Versuche mit Kalkmilch (5,0 kg Ca(OH) ₂ /m ²)	65
3.2.2.5	Versuche mit Kalkmilch (2,5 und 5,0 kg Ca(OH) ₂ /m ²)	68
3.2.2.6	Versuche mit gemahlenem Branntkalk	72
3.2.2.7	Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten zwischen 58,9 % und 90,9 %	75
3.2.2.8	Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten von 30 % und 50 %	78
3.2.3	Ergebnisse der Feldversuche	80
3.2.3.1	Ergebnisse der Versuche mit einem Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem mit Injektorbrenner	80
3.2.3.1.1	1. Versuch	80
3.2.3.1.2	2. Versuch	83
3.2.3.1.3	3. Versuch	87
3.2.3.1.4	4. Versuch	90
3.2.3.2	Ergebnisse der Versuche zum Einsatz von „Solarfolien“	93
3.2.3.2.1	1. Versuch	93
3.2.3.2.2	2. Versuch	96
3.2.3.2.3	3. Versuch	100
3.2.3.3	Ergebnisse der Versuche zum Einsatz eines Gerätes zur Bodendämpfung	101
3.2.3.4	Ergebnisse der Versuche zur Anwendung von Branntkalk	104
3.2.3.4.1	1. Versuch zur Branntkalkanwendung	104
3.2.3.4.2	2. Versuch zur Branntkalkanwendung	108
3.2.3.4.3	3. Versuch zur Branntkalkanwendung	112
4	Diskussion	117
4.1	Ergebnisse der Laborversuche	117
4.1.1	Tenazität im autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden	118

4.1.2	Tenazität bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten des Bodens	118
4.1.3	Tenazität von Bakterien auf im Boden exponierten Keimträgern bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten	119
4.2	Ergebnisse der halbtechnischen Versuche zur Kalkanwendung	120
4.3	Ergebnisse der Feldversuche	127
4.3.1	Grundsätzliche Bemerkungen zur Verwendung der Keimträgertechnik bei den Untersuchungen zur thermischen Desinfektion	128
4.3.2	Ergebnisse beim Einsatz des Bodenverbesserungs- und Sanierungssystems mit Injektorbrenner	132
4.3.3	Ergebnisse der Versuche mit Solarfolien	134
4.3.4	Ergebnisse der Bodendämpfung	137
4.3.5	Ergebnisse der Feldversuche zur Kalkung	139
5	Schlussfolgerung	140
5.1	Halbtechnische Versuche mit Kalk	140
5.2	Feldversuche	141
5.2.1	Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem mit Injektorbrenner	141
5.2.2	Bodendämpfung	141
5.2.3	Kalkung	142
5.2.4	Solarfolien	143
6	Zusammenfassung	144
7	Literaturverzeichnis	148
8	Anhang	165
8.1	Abbildungsverzeichnis	165
8.2	Tabellenverzeichnis	167
8.3	Abkürzungen	171
8.4	Puffer und Lösungen	173

1 Einleitung

Die in den zurückliegenden Jahren durch Aufstockungsmaßnahmen vermehrte Umstellung auf alternative Haltungsformen für Legehennen und die Zunahme der Freilandhaltung von Schweinen, bringt allerdings 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 einen 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 ökologisch bedenklichen Chemikalien als Desinfektionsmitteln 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 Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 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, wirkungsvolle Methode war daher das eigentliche Hauptziel der durchgeführten Untersuchungen.

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 erprobt. Erfahrungswerte liegen allerdings aus Untersuchungen hinsichtlich der Bekämpfung von Unkraut sowie von Erregern für Pflanzenkrankheiten mit thermischen Verfahren vor.

Um Erkenntnisse zur Desinfektion von menschen- und tierpathogenen Erregern zu gewinnen, wurden zunächst Vorversuche zur exakten quantitativen Einmischung ausgewählter Bakterienarten im Boden im Labormaßstab durchgeführt.

Es wurden labor- und halbtechnische Versuche sowie Untersuchungen im Freiland (Hauptversuche) zur Reduktion ausgewählter Mikroorganismen durch den Einfluss unterschiedlicher Desinfektionsverfahren untersucht. Bei den Versuchen zur Desinfektion der Böden wurden diese künstlich mit unterschiedlichen Erregern kontaminiert. Dazu wurden

Salmonella Typhimurium, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* sowie *Bovines Parvovirus* angewandt. Ziel der praxisnahen Untersuchungen war, erstmalig Erkenntnisse zur umweltfreundlichen Desinfektion unterschiedlicher Böden zu erhalten.

In Laborversuchen im Wasserbad mit Boden bei unterschiedlichem TS-Gehalt wurden erste Erkenntnisse zur thermischen Einwirkung im Boden auf die Tenazität unterschiedlicher Mikroorganismen gewonnen. In halbtechnischen Versuchen wurde der Einfluss von Kalk bei unterschiedlichen Wassergehalten untersucht. In Großversuchen (Freiland) schlossen sich Untersuchungen zur thermischen Bodenbehandlung mit einem Injektorbrenner („BVS“-System) und der sog. "Haubendämpfung" an. Dabei wurden unterschiedliche Böden bei verschiedenen Wassergehalten berücksichtigt. Sporadisch wurde zusätzlich der Einfluss der Sonneneinstrahlung auf die Tenazität von lokalisierten Mikroorganismen unter einer Solarfolie im Boden untersucht. Die Versuche wurden durch den Einsatz von Branntkalk (CaO), Löschkalk (Ca(OH)₂) und Kalkmilch zur „Bodendesinfektion“ in Labor- und Großversuchen mit Bodenkalkung ergänzt.

2 Literatur

2.1 Problematik der Kontamination des Bodens mit Mikroorganismen in Freilandhaltung

In einer konzentrierten Tierhaltung, wie sie in aller Regel eine ökonomisch zu betreibende Schweinehaltung (FRIES, 2000) oder auch die Masthähnchenhaltung (BANDICK et al., 1998) darstellt, können Salmonellen zu einem großen Bestandsproblem werden wie z.B. bei Untersuchungen in der Einstreu von Liegeboxen von Milchkühen, nachgewiesen werden konnte (BÖHM et al., 2004). Salmonellen stellen als Erreger einer Zoonose eine besondere Gefahr für den Menschen dar. Hinzu kommen fäkalcoliforme Keime und Enterobacteriaceae. 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 in diesem Zusammenhang mögliche Infektionskrankheiten verlaufen mit Beteiligung des Verdauungs- und des Urogenitaltraktes. Bei Stallhaltung enden die pathogenen Agentien in der Regel auf dem Stallfußboden und letztendlich in Mist und Gülle. Durch die Düngung von landwirtschaftlichen Nutzflächen mit Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft (Gülle, Jauche, Festmist), gelangen fäkale Indikatorbakterien und gegebenenfalls pathogene Mikroorganismen auf die Bodenoberfläche. Wenn kontaminierte Wirtschaftsdünger landwirtschaftlich verwertet werden, besteht somit die Gefahr einer zum Teil weiträumigen Verschleppung von Seuchenerregern (STRAUCH, 1991a,b). In der Liste einer EU-Arbeitsgruppe werden u.a.

Salmonellen und *E. coli* als bakterielle Infektionserreger besonders erwähnt, die Probleme für die tierische und menschliche Gesundheit verursachen können, wenn sie mit Fäzes auftreten.

Auch sämtliche Viren, zu denen die Bovinen Parvoviren, die zu den umweltstabilsten unter den Viren gehören (SCHIRM, 2005), die aus dem infizierten Tierkörper in die Umwelt gelangen, können in den Wirtschaftsdüngern vorhanden sein (STRAUCH, 1991a).

2.2 Vorkommen und Tenazität von Mikroorganismen im Boden und anderen Medien

Es ist Tatsache, dass der Boden als Reservoir für bestimmte Krankheitserreger (Indikatororganismen) gelten kann. Forschungsergebnisse haben inzwischen gezeigt, dass Boden bei der Übertragung von Krankheitserregern des Intestinaltraktes eine bedeutendere Rolle spielt als bisher angenommen wurde (SANTAMARIA et al., 2003).

Salmonellen kommen im oberen Bodenhorizont auf manchen Tierausläufen in Baden-Württemberg in einer Konzentration bis zu 10^4 KBE/100 g Boden vor (ANONYM, 2002).

Im Bereich der Abwasserentsorgung gehören Salmonellen zu den am besten untersuchten Krankheitserregern. SILLI et al. (1990) und SCHINDLER et al. (1991) beschreiben umfangreich die Salmonellenvielfalt in Vorflutern und in kleinen Oberflächengewässern. Kläranlagenabläufe sind seuchenhygienisch bedenklich, wenn Mängel im Kläranlagensystem auftreten (LEISSNER, 1988).

Mikroorganismen werden in verschiedenen Medien in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. GUBER, et al. (2005) berichten, dass *E. coli* in tierischen Feces in einer Konzentration von 10^5 KBE/g vorkommen und 1 bis 5 Monate überleben. *E. coli* kommen nach Untersuchungen von WEIGEL (1995) im Festmist und in Gülle in einer Anzahl von 10^5 bis 10^6 KBE/g und nach MALACK et al. (2007) mit mehr als 10^8 KBE/g im Schlamm vor. Die Mikroorganismen aus tierischem Kot kontaminieren Boden und Grundwasser (SHELTON et al., 2005; GUBER, et al., 2005).

Die maximalen Konzentrationen von Fäkalstreptokokken nach 6 bis 12 Tagen lagen nach einer Gülledüngung bei 10^5 und 10^6 KBE/100 g TS (WEIGEL, 1995).

Im Boden können Viren von Tieren (tierpathogene Viren) sowie vom Menschen (humanpathogene Viren) vorkommen. Die mit Kot und Sekreten von Nutz- und Wildtieren ausgeschiedenen tierpathogenen Viren können im Boden nachgewiesen werden. Sie sind den Picorna-, Rota-, Parvo- und Adenoviren zuzuordnen. Von infizierten Nutz-, Haus- und freilebenden Tieren können enterale Viren über Kot und Sekrete ausgeschieden werden. Problematisch dürfen vor allem Mist und Gülle aus Massentierhaltungen sowie Abwässer aus Schlachthöfen sein (DÜRKOP, 2000 in: WALTER, 2000). Gülle kann trotz 200-tätiger

Lagerung noch ein Infektionspotential besitzen (PESARO et al., 1995 in: DÜRKOP, 2000 in: WALTER, 2000).

In den oberen 10 cm der Bodenschichten können die Virusgehalte in Sand- und sandigem Lehmboden zwischen $0,5$ bis $9,1 \times 10^3$ PFU/100 g schwanken (HURST et al., 1980 in: WALTER, 2000; FATTAL et al., 1984 in: WALTER, 2000).

2.2.1 Tenazität der Mikroorganismen und Faktoren, die sie beeinflussen

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 (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Auswirkung unterschiedlicher Faktoren auf die Tenazität von Bakterien im Boden (nach SCHWARZ, 2003, modifiziert)

EINFLUSS-FAKTOREN	AUSWIRKUNG
Temperatur	-wesentlicher Überlebensfaktor -bei kühlen Wetterlagen ist die Tenazität erheblich größer als bei warmen -deutliche Abhängigkeit von Temperaturen für Leptospiren, Salmonellen (Gülle, Mist, Boden) -ein entgegengesetztes Verhalten, d.h. ein schnelleres Absterben im Winter für koliforme Bakterien in schlammgedüngten Waldböden
Bodenfeuchtigkeit	-in feuchten Böden und während Regenperioden längere Überlebenszeiten
Bodenwasserspeicherkapazität	-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 vergrößert 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

2.2.1.1 Tenazität der Mikroorganismen abhängig von anderen physikalischen Einflüssen

Seit langem ist bekannt, dass feuchte Hitze (Heißwasser, Dampf) Mikroorganismen wesentlich stärker schädigt, als trockene Hitze bei gleicher Temperatur. Eine Erkenntnis, die in der Sterilisationspraxis breite Anwendung findet (WALLHÄUSSER, 1995). Die Tenazität der Mikroorganismen im Boden wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst.

Der obere Bodenhorizont, in dem 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). Eine zunehmende Belastung mit organischen Verbindungen, z.B. über Klärschlammverwertung, 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 vor Umwelteinflüssen schützen (KONOWALCHUK et al., 1974). Da diese Pflanzenextrakte bei einem pH-Wert von 4,5 unlöslich werden und ausflocken und erst bei einem pH-Wert von 7,5 wieder in Lösung gehen, ist ein protektiver Effekt der umhüllten Viren im sauren Milieu denkbar (WALTER et al., 2000).

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).

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 im gröberen sandigen Lehm. Diese Tatsache wird auf einen protektiven Effekt der größeren Wasserbindungskapazität des Tones im Vergleich zum Sand zurückgeführt. Je höher der Wassergehalt wird, umso länger ist die Viruspersistenz (BLANC und NASER, 1996 in: DÜRKOP, 2000 in: WALTER, 2000). Andere Autoren (PESARO et al., 1995) weisen darauf hin, dass virale Inaktivierung schneller im Flüssigmist als in Festmist verläuft.

Im Erdboden bleiben Salmonellen bei 8 °C 1-4 Monate vermehrungsfähig, können aber selbst angetrocknet an Gegenständen jeder Art längere Zeit überleben und sich bei genügender Feuchtigkeit, Nährstoffgehalt (Eiweiß) und geeigneten Temperaturen vermehren (DEDIÉ et al., 1993).

Salmonellen überlebten im gefrorenen, feuchten Boden 2 Jahre (PIOCH et al., 1989).

Manche Mikroorganismen sind im trockenen Boden durch 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 (van LOENEN et al., 2002).

2.2.1.2 Tenazität der Mikroorganismen abhängig von der Temperatur

Die Inaktivierungsrate von pathogenen Mikroorganismen steigt mit zunehmender Temperatur (DUNHAM, 1977; MARTENS et al., 1999; WELLINGER et al., 1991).

Den Viren ist gemeinsam, dass sie zu den potenziellen Durchfallerregern gehören und sehr umweltresistent sind. Dies hängt von verschiedenen Faktoren, wie z. B. der Temperatur, der Lichteinstrahlung und dem Vorhandensein mikrobieller Enzyme ab (WALTER, 2000).

Nach BRÄUNIGER et al. (2000) ist das Bovine Parvovirus sehr resistent gegenüber trockener Hitze bei 100 °C. 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 (BRÄUNIGER et al., 1994).

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 KÖHLER (1993) ist der Nachweis von Bovinem Parvovirus (Stamm Haden) in verschiedenen Böden bei Lagerungstemperaturen von 4 °C über einen einheitlich langen Zeitraum, bis zur 44. Woche möglich, bei einer Temperatur von 20 °C kann das Virus bis 28 Wochen überleben.

Die Viruspersistenz ist von der Bodenart abhängig (YEAGER, et al., 1979). Tonhaltige Böden haben eine protektive Wirkung.

Parvoviren besitzen eine große Stabilität gegenüber Chloroform- und Ätherbehandlungen sowie Hitze (56 °C) und Säure (pH 3-9) (ABINATI et al., 1961).

Nach ROBERTS und HART (2000) liegt die Inaktivierung des Bovinen Parvovirus bei konzentriertem Faktor VIII (Plasma) in trockener Hitze bei 80 °C bei 72 Stunden. Die Autoren meinen, dass eine Resistenz des Bovinen Parvovirus vom Virustyp und vom Medium abhängig ist. SPILLMANN et al. (1987) haben bei der Pasteurisierung von tierischen Abfällen eine Inaktivierung des Bovinen Parvovirus bei 70 °C in 30 min um 0,72 Zehnerpotenzen ($0,72 \log_{10}$) erzielt.

Für den Temperaturbereich, in dem sich Salmonellen vermehren können, werden meist 43 °C-47 °C als obere und 5 °C als untere Grenze genannt (DEDIÉ et al., 1993).

Die Hitzeempfindlichkeit von Salmonellen ist abhängig vom Serovar und Substrat. Salmonellen sterben in der Regel bei 60 °C innerhalb weniger Minuten, bei 70 °C innerhalb

weniger Sekunden ab; in anderen Substraten sind höhere Temperaturen bzw. längere Einwirkungszeiten notwendig (PIETSCH, 1981 in: DEDIE et al., 1993). Nach SCHOMBURG und MÜLLER (1987) ist eine Tenazität der Salmonellen von Medium und Umweltbedingungen abhängig.

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 Enterokokken aus anderen Proben (Rinder- oder Schweinegülle) noch nach 150 min bei 60 °C nachgewiesen werden. Die Enterokokken haben sich als wärmeresistenter erwiesen.

Es ergab sich einen D-Wert von 1,7 Stunden für Salmonellen bei einem Inaktivierungsversuch im Wasserbad bei einer Temperatur von 50 °C. Bei 55 °C errechnete sich nach einem Wasserbadversuch für *Salmonella* Senftenberg ein D-Wert von 0,42 Stunden (HOFERER, 2001).

Für *Enterococcus faecalis* ließ sich bei einer Temperatur von 50 °C im Wasserbad ein D-Wert von 3,42 Stunden errechnen. Der entsprechende Inaktivierungsverlauf von *Enterococcus faecalis* für den Wasserbadversuch bei 55 °C ergab einen D-Wert von 2,42 Stunden (HOFERER, 2001).

HOFERER (2001) errechnete einen D-Wert im Wasserbadversuch von 1,57 Stunden für *Escherichia coli* (EHEC) bei einer Temperatur von 50 °C. Bei 55 °C lag der D-Wert für EHEC bei 0,39 Stunden.

2.2.1.3 Tenazität der Mikroorganismen abhängig von chemischen Einflüssen

Untersuchungen von LANG (1987; zit. in: SCHIRM, 2005) belegen, dass beim Einsatz von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine Inaktivierungszeit von drei Stunden angesetzt werden muss, um *E. coli* bei einem pH-Wert von 12,6 ausreichend reduzieren zu können.

Bei der Verwendung von 0,3 kg CaO/kg TS kann *S. Senftenberg* und *E. coli* innerhalb von einer Stunde und Enterokokken nach 3-5 Stunden unabhängig vom eingesetzten Substrat um 5 Zehnerpotenzen reduziert werden (SCHIRM, 2005).

Das Bovine Parvovirus kann bei Freisetzung von Ammoniak in kürzeren Zeitspannen inaktiviert werden. Im Praxisbetrieb wurde beim Einsatz von 0,9 kg CaO/kg TS im 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 Bovinen Parvovirus ausgegangen werden kann (SCHIRM (2005)).

2.2.1.4 Tenazität der Mikroorganismen abhängig von der protektiven Wirkung der Proteine

In der Literatur wird für Salmonellen und andere Bakterien das Phänomen der Erlangung einer erhöhten Hitzeresistenz durch Adaptation beschrieben (KATSUI et al., 1982).

Die Anzüchtung von Mikroorganismen oberhalb ihres Temperaturvermehrungsoptimums soll zu einer erworbenen Thermoresistenz führen können (NEIDHARDT et al., 1987; YAMAMORI et al., 1982, zit. in KNOP, 1997).

MACKEY et al. (1986) beobachteten, dass sich die Inaktivierungszeit von *S. Typhimurium* bei 55 °C bzw. 59 °C nach 30 minütiger 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 et al., 1986). Nach LEMAUX et al. (1978) werden solche Proteine gebildet, wenn Bakterienzellen innerhalb ihres Vermehrungsbereichs von niedrigeren auf höhere Temperaturen erwärmt werden. Für *E. coli* ist eine vorübergehende Expression solcher Hitzeproteine belegt (YAMAMORI et al., 1982).

Die Mikroorganismen können auch mittels chemischen Methoden, z.B. Alkalisierung durch Kalkung, mit CaO (Brantkalk) oder Ca(OH)₂ (Löschkalk) in ihrer Konzentration reduziert werden.

2.3 Gesetzliche Grundlagen

2.3.1 Tierseuchengesetz (TierSG)

Dieses Gesetz regelt die Bekämpfung von Seuchen, die bei Haustieren oder Süßwasserfischen oder bei anderen Tieren auftreten und auf Haustiere oder Süßwasserfische übertragen werden können (ANONYM, 2004).

2.3.2 Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG)

Dieses Gesetz soll nachhaltig die Funktionen des Bodens sichern oder wiederherstellen. Hierzu sind schädliche Bodenveränderungen abzuwehren, den 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 (ANONYM, 1998).

2.3.3 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 (ANONYM, 1998).

2.4 Charakterisierung der in den Untersuchungen erfassten Bakterien (Prüforganismen)

2.4.1 *Escherichia coli*

Die Bakterien *Escherichia coli* aus der Familie der *Enterobacteriaceae* gehören zu den am besten untersuchten Mikroorganismen überhaupt. Sie sind Bestandteil der normalen Darmflora gesunder Menschen und Tieren (BURKHARDT, 1992).

E. coli sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchen, die zwischen 2,0 und 6,0 µm lang und 1,1-1,5 µm breit sind. Die Mehrzahl der Stämme ist beweglich. Ein Teil der Stämme bilden Hämolysine. Die Abgrenzung von den anderen *Enterobacteriaceae* erfolgt vorwiegend anhand biochemischer Reaktionen, wie Laktosespaltung (ROLLE und MAYR, 2002).

Colistämme, die sich durch spezielle Virulenzfaktoren auszeichnen, treten als Erreger von Durchfallerkrankungen, Infektionen anderer Organe wie Nieren und Harnwege und auch Allgemeininfektionen in Erscheinung (SELBITZ und BISPING, 1995).

In pathogenetischer Hinsicht werden heute 4 große Gruppen enteropathogener Colibakterien unterschieden: die mit wässrigen, choleraähnlichen Durchfällen einhergehenden, enterotoxinbildenden *E. coli* (ETEC), die Shigellen ähnlichen enteroinvasiven *E. coli* (EIEC), die bereits seit Jahrhunderten bekannten pathogenen *E. coli* bei Säuglingen (EPEC)) und die Erreger der hämorrhagischen Colitis (EHEC) mit Hemolytic uremic syndrome (LEVINE, 1987). Letztere sind als Zoonosenerreger zu betrachten (DEDIE et al., 1993; SELBITZ und BISPING, 1995), deren wichtigste Infektionsquelle in Rinderbeständen zu suchen ist (SELBITZ und BISPING, 1995).

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 *E. coli* (EHEC) aus nicht hitzebehandelter Vorzugsmilch, die durch tierische Fäkalien kontaminiert wurde, sind nach BEUTIN et al. (1995,1996) eine Ursache für schwere Nierenerkrankungen bei Kindern.

2.4.2 Enterokokken

Der Enterokokkengruppe im Darm von Menschen und Tieren wurde innerhalb der Gattung *Streptococcus* lange eine gewisse Sonderstellung eingeräumt, bis sie als eigene Gattung abgetrennt wurde (ROLLE und MAYR, 2002).

Enterokokken können in fermentierten Lebensmitteln wie Würsten, Oliven und Gemüse vorkommen, aber auch in Milchprodukten, wo sie z.B. für den Geschmack von Käse direkt verantwortlich sind. Jedoch sind einige Enterokokken-Arten pathogen und können eine Lebensmittelvergiftung hervorrufen (FOLIQUIÉ MORENO et al., 2006).

Die hauptsächlich bei Geflügel auftretenden Spezies von Enterokokken sind *Ec. faecalis* (Syn. *Sc. glycerinaceus*), *Ec. faecium* (Syn. *Sc. durans*), *Ec. avium* und *Ec. gallinarum* (HEIDER, MONREAL, MÉSZÁROS, 1992).

Zur Gattung *Enterokokken* gehören kugelförmige oder ovoide grampositive Bakterien mit einem Durchmesser bis zu 2 µm. Sie treten einzeln, in Paaren oder als kurze Ketten auf. Für die Abgrenzung der Enterokokken sind Wachstums- und Toleranzkriterien (Sherman-Kriterien) wesentlich. Sie beinhalten die Vermehrung in einem Bereich von 25-45 °C, bei einem pH-Wert von 9,6 in Anwesenheit von 6,5 % NaCl und 40 % Galle. Die meisten Enterokokken besitzen das Gruppenantigen D, einige sind beweglich (ROLLE und MAYR, 2002). Enterokokken zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber mesophilen Temperaturen, Schwankungen von Temperatur, Salzkonzentrationen und hohen pH-Werten aus (PODBIELSKI et al., 2002). Im Gegensatz zu anderen Enterokokken 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. Die Untersuchungen von LAMBERT (2003) belegen, dass eine thermische Inaktivierung von *Streptococcus faecalis* im Wasser bei 60 °C liegt. Sie sind nach SLANETZ (1964) 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 Bakterien. 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 Enterokokken erst recht von der Elimination dieser pathogenen Organismen ausgegangen werden. FRANZ et al. (1999) weisen diesen Bakterien die Indikatoreigenschaften zu.

Die häufigsten durch Enterokokken verursachten Krankheitsbilder sind: Mastitiden, Pneumonien, Urogenitalinfektionen, Endokarditiden und Septikämien (ROLLE und MAYR, 2002). Beim Geflügel treten Dottersackinfektionen, Septikämien, Lebergranulomatose und Endokarditis auf. Unter anderem kann es durch *Ec. faecalis* zum Malabsorptionsyndrom von Kücken kommen (HEIDER, G., MONREAL, G., MÉSZÁROS, J., 1992). Beim Menschen sind Enterokokken, vor allem *E. faecalis*, für 5-20 % der berichteten Fälle von bakterieller Endokarditis verantwortlich (HARDIE und WHILEY 1997).

2.4.3 Salmonellen

Nach der Hühner-Salmonellen-VO ist der Nachweis von *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* in Hühnerzuchtbetrieben und Brütereiern mitteilungs-pflichtig. Salmonellenbefunde bei Rindern sind nach der Rindersalmonellose-VO anzeigepflichtig (ANONYM, 2004).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (ANONYM, 2007) berichtet, dass der prozentuale Anteil 9,1 % für *Salmonella* Typhimurium betrug und 7,6 % für *Salmonella* Enteritidis an allen positiven Herden (Masthähnchen) im Herbst 2005 bis Herbst 2006. Insgesamt sind die deutschen Masthähnchenbestände erheblich mit Salmonellen belastet. Die ermittelte Rate von 17,5 % der betroffenen Bestände beinhaltet *S. Typhimurium* und *Salmonella* Enteritidis als die am häufigst auftretenden Serovare.

Salmonellen zählen weltweit zu den bedeutsamsten bakteriellen Infektionserregern bei Menschen und Tieren. Die weltweite seuchenhygienische Bedeutung der Salmonellosen liegt in der Eigenschaft der Übertragbarkeit zwischen Mensch und Tier. Salmonellen gehören zu der Familie *Enterobacteriaceae*. Die Gattung *Salmonella* wird durch die zwei Arten *Salmonella enterica* repräsentiert. Salmonellen sind 2-3 µm lange, plumpe, gramnegative, sporenlose, peritrich begeißelte, mit Ausnahme von *S. Pullorum* und *S. Gallinarum*, bewegliche Stäbchen (D'AOUST, 1997; MILLER und PEGUES, 2000; ROLLE und MAYR, 2002). Salmonellen sind morphologisch von anderen Darmbakterien wie *E. coli* nicht zu unterscheiden. Sie vermehren sich fakultativ anaerob. Auf dem Agar bilden sie 2-4 mm breite runde, glänzende Kolonien (STELLMACHER und SCHÖLL, 1987; LE MINOR, 1992;). Wenn eine subletale Schädigung der Bakterien erwartet wird, sind die in einem gepufferten Peptonwasser vorangereichert, leicht geschädigten Salmonellen wieder zu reaktivieren (ROLLE und MAYR, 2002). Bei Temperaturen zwischen +7 und +47 °C können sich Salmonellen bei ausreichendem Nährstoffangebot (60 mg Protein pro L) vermehren (BÖHM, 1993). Zu ihrer Isolierung aus Untersuchungsmaterial muss die Begleitflora durch Selektivnährmedien unterdrückt werden (VASSILIADIS, 1983; ULLMANN, 1994).

Die Gattung *Salmonella* wurde in zwei Spezies untergliedert: *Salmonella enterica*, mit Subspezies *Enterica* mit Serovaren u. a.: *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella* Enteritidis,

Salmonella Paratyphi, *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Typhimurium, die bei warmblütigen Wirbeltieren Krankheiten hervorruft und *Salmonella enterica*, deren Stämme der Subspezies Salomae, Arizonae, Diarizonae, Hautenaе und Indica zusammen mit Stämmen von *Salmonella bongori* vor allem bei poikilothermen und kaltblütigen Wirbeltieren vorkommen (LE MINOR und POPOFF, 1987; BOCKEMÜHL, 1992; POPOFF et al., 1992; BAUMGART, 1999; BRENNER et al., 2000; TINDALL et al., 2005).

Die Salmonellen sind als etwa 2500 Serovare im Kaufmann-White Schema zusammengefasst, das die Bakterien aufgrund ihrer Antigene unterscheidet (POPOFF, et al., 2000). Nur die Stämme Subspezies *Salmonella enterica* (früher Subgenus I) dürfen mit Großbuchstaben und nicht kursiv genannt werden z.B. *Salmonella* Typhimurium statt *Salmonella enterica* subsp. enterica Serovar Typhimurium (LE MINOR und POPOFF., 1987). Kaufmann baute auf den Arbeiten Whites auf und schuf 1934 mit der ersten Antigentabelle die Grundlage für das heute noch gebräuchliche Kauffmann-White-Schema (SELBITZ et al., 1995) Entsprechend den Eigenschaften der diagnostisch wichtigen Antigene erfolgt die Serotypisierung auf der Basis des Kauffmann-White-Schemas, in dem heute 2449 Serovare definiert sind (ROLLE und MAYR, 2002), von denen über 70 % der Spezies *Salmonella enterica* angehören (LE MINOR und POPOFF, 1987).

Die Pathogenität der Salmonellen beruht auf der Bildung von Enterotoxinen (Exotoxin), von denen das letztere seinen Wirkungsort im Darm hat und entweder nach oraler Aufnahme dorthin gelangt oder da selbst nach massiver Keimvermehrung produziert wird. Salmonellen bilden ferner den sog. vaskulären Permeabilitätsfaktor (PF) aus. Die stärkste PF-Aktivität wurde bei *S. Typhimurium* festgestellt. Zwischen den einzelnen *Salmonellen*-Serotypen bestehen erhebliche Pathogenitätsunterschiede. Klinisch manifeste Erkrankungen mit Todesfolge lassen sich nur bei Küken der verschiedenen Geflügelarten bis zum Alter von 2 Wochen auslösen. Sie werden vor allem durch *S. Typhimurium*, bei Enten auch durch *S. Enteritidis* verursacht, während die Infektionen bei den anderen Salmonellen-Serotypen meist latent verlaufen (HEIDER, G., MONREAL, G., MÉSZÁROS, J., 1992).

Die Verbreitung von Salmonellen in der Außenwelt findet häufig durch Kot von Kleintieren und Vögeln statt. Die Gefährdung des Menschen besteht nach ROLLE und MAYR (2002) 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) untersuchte Typhusepidemie in Stuttgart und Wien, die ihren Ursprung in der Düngung von Gemüse mit Abwässern hatte.

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. Die Bekämpfung der Enteritis-Salmonellosen des Menschen beruht auf der Senkung des Infektionsdrucks in den Haustierbeständen und die Vermeidung der Kontamination in Verbindung mit der Verhinderung der Vermehrung und Anreicherung der Salmonellen in Lebensmitteln (ROLLE und MAYR, 2002).

2.5 Charakterisierung des in der Untersuchungen erfassten Virus

2.5.1 *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 26 nm). 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 (LIEBERMANN, 1992).

MARTENS et al. (1999), HOFERER (2001) und DURHAM und JOHNSON (1985) bezeichnen die Parvoviren als Viren mit sehr hoher Tenazität. BPV sind sehr resistent gegen trockene Hitze (100 °C) und die Inaktivierung ist im großen Umfang von Restfeuchte der Lyophilisate abhängig. Wenn sich die Restfeuchte von 2 auf 1 % reduziert, verlängert sich die Inaktivierungszeit der Exposition auf das 2,5-fache (BRÄINIGER et al., 2000).

2.6 Physikalische Methoden der Bodendesinfektion

Hitze ist das weitaus zuverlässigste Mittel zur Inaktivierung bzw. Abtötung von Mikroorganismen (STRAUCH und BÖHM, 2002). 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; GUDEHUS, 2005).

In der Literatur fehlen Daten bezüglich höheren Absterbetemperaturen von Bodenorganismen bei einer bestimmten Einwirkungsdauer. Eine enger abgegrenzte Darstellung von Absterbetemperaturen einiger Bodenorganismen gibt BOLLEN (1969 in: HEGE und ROSS, 1972) an, der eine Behandlungsdauer mit der jeweiligen Temperatur von 30 min zugrunde legt. Sporenbildende Bakterien sind gegenüber Hitze ausgesprochen resistent und können Temperaturen bis zu 100 °C ertagen. Darunter ist besonders *Bacillus subtilis* von Bedeutung, bei dem nachgewiesen werden konnte, dass er gute Voraussetzungen für die biologische Bekämpfung von *Rhizoctonia* bietet. 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 auszukommen. Dann bliebe ein Teil der saprophytischen Organismen am Leben und könnte den Pflanzen durch Antagonismen zu neu eindringenden 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 (POLLMANN, 1995) und Tabakmosaikvirus bei über 90 °C (LORENZ, 2004).

2.6.1 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 Pilzschädlinge 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 Dampfatmosphäre, 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 Sattdampf. Bei zunehmendem Druck steigt die Sattdampf Temperatur. 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.

Wichtig ist, dass es sich dabei um „feuchte“ Hitze handelt. In trockenem Zustand können die Keime oft weitaus höhere Temperaturen überstehen als in feuchtem (GUDEHUS, 2005).

Der größte Teil der Pflanzenkrankheiten wird durch Pilzerreger verursacht (HEGE et al. 1972). Man dämpft daher Böden, um sie von Pilzen frei zu machen.

2.6.2 Bodenerhitzung mit Propangas

Die Bekämpfung der bodenbürtigen Erreger von 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, CO₂- und CO-Ausstoß, und eine Gefährdung der bodenbewohnenden Nützlinge ist nicht auszuschließen.

2.6.3 Bodenerhitzung mit Sonnenenergie unter Anwendung von Solarfolien

Die „Bodensolarisation“ ist das Abdecken der Bodenflächen mit einer Kunststoffolie, wobei die Temperatur der Bodenumgebung unter der Folie steigt und bis 60 °C erreicht werden kann.

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 van LOENEN, 2002). Diese relativ neue Desinfektionstechnik wurde als nicht chemische Alternative zu Methylbromid betrachtet (UNEP, 2000). Erfahrungen der „Solarisation“ des Bodens zur möglichen Inaktivierung von Fäkalkeimen und Krankheitserregern tierischer Herkunft liegen bisher in der Literatur nicht vor.

Die Bekämpfung von Unkräutern und Nematoden durch Solarisation mittels farbloser Polyethylenfolia (PE) wurde im Sommer 1990 im Freiland untersucht. Nach 32-tägiger Solarisation nahm die Keimung der vorherrschenden Unkräuter ab. Die Wirkung war auf die oberste Bodenschicht bis 5 cm Tiefe beschränkt. Gegen pflanzenparasitische Nematoden betrug die Wirkung der Solarisation etwa 90%, gegen saprophytische Nematoden rund 60%, aber nach 70 Tagen hatten sich die Nematodenpopulationen wieder weitgehend erholt. Nach Bewässerung wurde in 5 cm Tiefe eine höhere Bodentemperatur erreicht (KUMAR et al., 1993).

2.6.4 Bodenerhitzung mit Mikrowellen

Unter Mikrowellen wird eine elektromagnetische Strahlung verstanden, deren Wellenlänge im Zentimeter- und Millimeterbereich 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) bakterielle und virale Krankheitserreger zuverlässig inaktiviert werden.

Mikrowellen wurden auch zur Inaktivierung von Viren im Flüssigmist benutzt (KUHLMANN, 1982).

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) und BENZ (1986) 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 Erreger abgetötet werden. Bisher fehlen allerdings wissenschaftliche Veröffentlichungen zu dieser Problematik.

LECHOWICH et al. (1969) kommen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass durch Mikrowellen alleine 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.

2.6.5 Bodenkalkung

Laut EuLA (ANONYM, 2008) wird Kalk in vielen nationalen Rechtsvorschriften oder Richtlinien (Deutschland, Frankreich, Österreich, Schweiz) als wirksames Desinfektionsmittel aufgeführt und allgemein zur Vor-Ort-Desinfektion bei der Vieh- und Geflügelhaltung angewandt. Dies erfolgt sowohl routinemäßig, als Vorbeugemaßnahme als auch zur speziellen Desinfektion beim Ausbruch bestimmter Seuchen wie z.B. der Maul- und Klauenseuche², der Aujeszkyschen Krankheit³ oder der Afrikanischen Schweinepest (ASF)⁴. Eine im Jahr 2007 vom Institut Pasteur de Lille durchgeführte wissenschaftliche Untersuchung hat gezeigt, dass der H5N1-Virus (Vogelgrippe-Erreger) durch Kalk wirksam und schnell (innerhalb von 5 Minuten bei 40 °C) *in vitro* inaktiviert wird. Diese Inaktivierung wird aufgrund der durch Kalk verursachten pH-Wert-Erhöhung hervorgerufen und erfolgt schneller als die Inaktivierung des die Afrikanische Schweinepest verursachenden Virus bei der Kalkanwendung unter ähnlichen Bedingungen. In der Vergangenheit wurde Kalk erfolgreich zur Bekämpfung der Vogelgrippe eingesetzt, so z.B. in Japan (2004), in der Türkei (2006) und in Deutschland (2007).

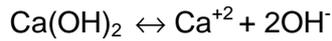
Der Kalk wird zur Prävention und Bekämpfung der Vogelgrippe (Aviäre Influenza) verwendet. Zur Desinfektion des Bodens außerhalb von Geflügelställen wird empfohlen 500 g ungelöschtem, körnigen Kalk pro m² Boden. Danach wird der Boden mit Wasser benetzt (BEGOS, 2008 in: ANONYM (EuLA), 2008). Zur Desinfektion des Lehmbodens im Stall wird es 500 g ungelöschten Kalk pro m² feuchten Boden aufgestreut (VALANCONY, 2000 in: ANONYM (EuLA), 2008).

Kalk wird weltweit zur Desinfektion des Bodens verwendet. Für die Umwelt ist Kalk unbedenklich und gilt dementsprechend auch als Umweltfreundliches Desinfektionsmittel. Er ist als Düngemittel zugelassen. Kalk ist außerdem zur Desinfektion von Flüssigmist als auch zur Herstellung bakterizider Kalkanstriche verwendbar. Calciumhydroxid entsteht durch Zugabe von gebranntem Kalk (CaO) zu Wasser.

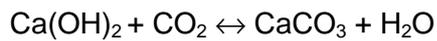
Die Wirkungsweise der Alkalien, zu welchen Kalk gehört, beruht vor allen auf dem hohen pH-Wert, durch den die Zellwand der Bakterien zerstört wird (STRAUCH und BÖHM, 2002).

Brantkalk (CaO) erhöht die Temperatur, den pH-Wert und den Inhalt des freien Ammoniaks (NH₃) in dem Biosolid. Calciumhydroxid wird als Pulver oder Granulat zur Hygienisierung von Festmist oder ähnlichen Substraten verwendet. Die chemischen Reaktionen entstehen, wenn Brantkalk (CaO) mit Wasser reagiert (ABU-ORF et al., 2004):





In einer Langzeitreaktion findet dann die Carbonatisierung des noch vorliegenden freien Kalkhydrates mit dem Kohlendioxid aus der Luft statt (PESCHEN, 1985):



Branntkalk (CaO) ist das am häufigsten verwendete Flächendesinfektionsmittel in der Teichwirtschaft, insbesondere zur Desinfektion von Erdteichen. Er ist auf die Fläche bezogen, billig und relativ umweltverträglich. In Forellenteichen wird er nach der Reinigung der Teiches auf den noch feuchten Boden ausgebracht. Nur in Verbindung mit Wasser, beim sog. Löschen, entsteht die desinfizierende Kalklauge (STRAUCH und BÖHM, 2002).

In der Literatur findet man zahlreiche Berichte über die Desinfektion von Abwässern oder Bioabfall mit Kalk. Im Fall eines Seuchenausbruchs wurde Kalk zur Desinfektion von Teichböden angewandt. STRAUCH und BÖHM (2002) empfehlen nach einem Seuchenausbruch zunächst den feuchten Teichboden mit 1 kg/m² zu bestreuen, dann den Teich möglichst hoch anzustauen und so lange Branntkalk zuzugeben, bis der pH-Wert über 12 erreicht wird.

Kalk ist weltweit zur Desinfektion der Ausläufe für Geflügelhaltung erfolgreich angewandt worden (PILOTTO et al. 2007).

Ägyptische Tierärzte berichten über die Verwendung von Kalk zur Desinfektion von Geflügelausläufen in der Sahara. Das aus der Luft abgeschiedene Kondenswasser spendet in dieser Gegend die für die chemischen Reaktionen nötige Feuchte (ANONYM, 2006).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

Nachfolgend werden zunächst die angewendeten bakteriologischen und virologischen Untersuchungstechniken und Grundmethoden zusammenfassend dargestellt. Anschließend werden die durchgeführten Laborversuche und halbtechnischen Versuche, die für die Praxisversuche nützlichen grundlegenden Erkenntnisse liefern sollten, beschrieben, gefolgt von der Darstellung der Feldversuche unter Praxisbedingungen.

3.1.1 Bakteriologische Methoden

3.1.1.1 Ermittlung der Gesamtbakterienzahl (GBZ) bei 37 °C

Für die Bestimmung der Gesamtbakterienzahl wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

elektronische Waage

Schottflaschen

Flaschenschüttler

Reagenzgläser

Reagenzglasschüttler

0,9 %-ige NaCl-Lösung¹

0,1 n Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat-Lösung²

Standard-I-Agar³

Drahtspatel

Brutraum, 37 °C

Gasbrenner

Zur Vorverdünnung wurden 20 g Boden (Eigenschaften des Bodens im Kapitel 3.1.6.4) in 180 ml einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung (bei den Kalkversuchen wurde NaCl mit 0,1 n NaH_2PO_4 gepuffert) eingewogen und ca. 20 h bei 5 °C auf den Schüttler gebracht. Nach ausreichender Durchmischung wurde je 1 ml der Probe in geometrischer Reihe jeweils 9 ml NaCl-Lösung pipettiert. Anschließend wurde jeweils 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe auf zwei parallele Standard-I-Agarplatten pipettiert und mit einem ausgeglühten Drahtspatel bzw. Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Der Ansatz wurde bei 37 °C 24 h lang bebrütet (Koch'sches Oberflächenverfahren). Ausgezählt wurden nur die Platten, mit 50-250 (mindestens 30-40) Kolonien. Aus beiden parallelen Ansätzen wurde der arithmetische Mittelwert bezogen auf 1 ml der Probe errechnet .

¹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.06400.9025

² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 106346 1000

³ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07881.5000

3.1.1.2 Nachweis von *Escherichia coli*

In den Tenazitätsversuchen wurde stets *E. coli* (63/K12, DSM Nr.: 498) angewandt.

Die Proben wurden wie unter Pkt. 3.1.1.1 beschrieben aufbereitet (20 g) und vorverdünnt.

Handelte es sich um Keimträger wurden diese in 9 ml einer 0,9 %-igen Natriumchloridlösung verbracht und ca. 20 h bei 5 °C mit 150 rpm geschüttelt. Zum qualitativen Nachweis von *E. coli* wurden abweichend davon folgende Materialien eingesetzt:

MUG-Laurylsulfat-Bouillon⁴

0,5 n NaOH⁵

Kovac's Reagenz⁶

Der Nachweis von *E. coli* bzw. von fäkalkoliformen Bakterien erfolgte quantitativ mit Hilfe des "Most-Probable-Number" (MPN)-Verfahrens. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (1 ml der Vorverdünnung in 9 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung in geometrischer Reihe) angesetzt.

Anschließend erfolgte zur Anreicherung aus jeder Verdünnungsstufe die Überimpfung von je 1 ml in drei parallele Röhren MUG-Laurylsulfat-Bouillon. Diese wurden 48 h lang bei 37 °C inkubiert. Die Spaltung von MUG, erkennbar an einer hellblauen Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm, wurde unmittelbar nach der Inkubationszeit geprüft.

Zur Fluoreszenzablesung wurden 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 wurden die MUG-positiven Ansätze mit 0,5 ml Kovac's Reagenz überschichtet. Nur Röhren die eine Rotfärbung aufgrund der Indolbildung aufwiesen, wurden als *E. coli* positiv gewertet. Die Auswertung erfolgte anhand der korrigierten MPN-Tabelle nach DE Man (1977).

⁴ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 12588

⁵ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.06498

⁶ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 9293

3.1.1.3 Nachweis von *Enterococcus faecalis*

In den Tenazitätsuntersuchungen wurde stets *Enterococcus faecalis* (DSM Nr.: 2570) angewandt. Die Bodenaufbereitung (20 g) und Vorverdünnung erfolgte wie unter 3.1.1.1 beschrieben.

Zum quantitativen Nachweis von *Enterococcus faecalis* wurden abweichend davon folgende Medien eingesetzt:

- Azid-Dextrose (AD)-Bouillon⁷
- Kanamycin-Äskulin (KAA)-Agar⁸

Der Nachweis der Enterokokken erfolgte quantitativ mit Hilfe des „Most-Probable-Number“ (MPN)-Verfahrens. Dazu wurde entsprechend wie beim quantitativen Nachweis von *E. coli* beschrieben (Pkt. 3.1.1.2) 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. Die Anreicherung der Enterokokken erfolgte dann aus jeder Stufe der Verdünnungsreihe durch die Überimpfung von jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe parallel in drei Röhrchen Azid-Glukose (AD)-Bouillon à 9 ml und Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C für 48 h. Das Natriumazid unterdrückt die Vermehrung von gramnegativen Bakterien. Es kommt somit zur mehr oder weniger selektiven Vermehrung der grampositiven Enterokokken, 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-Äskulin-Azid (KAA)-Agar ausgestrichen. Die Agarplatten wurden auf den Rückseiten so markiert, dass auf jeder Platte drei Felder zu erkennen waren. Beim Ausstreichen wurden 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 D⁹ Test 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 DE Man (1977).

⁷ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.01590.0500

⁸ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.05222.0500

⁹ Innogenetics GmbH, Art. Nr. 5586-12

3.1.1.4 Nachweis von *Salmonella* Typhimurium

In den Tenazitätsversuchen wurde stets *Salmonella* Typhimurium, Stamm „Zoosal oral“ verwendet. Der Nachweis des Prüfkeims *Salmonella* Typhimurium erfolgte je nach Versuchsanstellung quantitativ und/oder qualitativ. Für den qualitativen Nachweis von Salmonellen aus 50 g Probe wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

Schottflaschen (500 ml)
 gepuffertes Peptonwasser¹⁰
 Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon¹¹
 Brutraum (37 °C und 43 °C)
 Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar¹²
 Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar¹³
 Drahtöse
 Objektträger-Agglutinations-Kit¹⁴

Zur Voranreicherung wurden 50 g Boden in 450 ml mit 0,1 n NaH₂PO₄ gepuffertem Peptonwasser eingewogen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 0,1 ml dieser Voranreicherung wurden anschließend in 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon überführt, 22 h bei 37 °C und 43 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Ausstreichen der Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon auf Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar) und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) und anschließend wurde bei 37 °C über 24 h inkubiert. Auf dem BPLS-Agar wurden die blassrosafarbenen und durchscheinenden Kolonien als positiv gewertet. Auf XLD-Agar gelten die schwärzlich erscheinenden Kolonien als „verdächtig“ für Salmonellen. Diese verdächtigen Bakterienkolonien wurden auf Standard I-Agar mittels eines Drei-Ösen-Ausstrichs vereinzelt und anschließend erneut bei 37 °C 24 h lang bebrütet. Zur Bestätigung der Anwesenheit von

¹⁰ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. CM 509

¹¹ Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 1858-17

¹² Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 1880-17

¹³ Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 0788-17

¹⁴ DADE Behring Vertriebs GmbH+Co, D-65835 Liederbach, D-Berlin, Antisalmonella O19; BECTON DICKINSON Art. Nr. ORMT 191 C30 (Polivalent I). Art. Nr. ORMT 191 C30 (Polivalent II), D-69006

Salmonellen durch die morphologische Auswertung der Bakterienkolonien auf BPLS- und XLD-Agarplatten erfolgte die Verifizierung der Befunde durch Objektträgeragglutination mittels Polyvalentem Salmonella-Faktorens Serum mit Anti O-4 Antigenen. Zum quantitativen Nachweis wurde wie folgt vorgegangen:

Handelte es sich um Bodenproben wurde eine Menge von 20 g wie unter 3.1.1.1 beschrieben, vorverdünnt, handelte es sich um Keimträger wurden diese in 9 ml einer 0,9 %-igen Natriumchloridlösung verbracht und ca. 20 h bei 4 °C mit 150 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte der quantitative Nachweis der Salmonellen mittels der MPN-Methodik. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde gepuffertes Peptonwasser (9 ml) verwendet wobei drei Parallelen in doppelter Ausführung angefertigt und diese bei 37 °C 24 h lang bebrütet wurden. Aus dieser sog. „Voranreicherung“ wurden dann jeweils 0,1 ml in eine sterile Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon pipettiert.

Aus der Selektivanreicherung wurden anschließend von allen Verdünnungsstufen bei den mindestens eines der drei Reagenzgläser durch Bakterienwachstum getrübt war, Parallelausstriche angefertigt, wobei die Agarplatten zu diesem Zweck in je drei gleich große Abschnitte unterteilt wurden. Für diesen Arbeitsschritt wurden XLD- und BPLS-Agar verwendet. Das weitere Vorgehen ist beim qualitativen Nachweis weiter oben beschrieben.

Die Anzahl der im Grenzbereich des Wachstums solchermaßen festgestellten positiven Parallelansätze von drei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurden zum Erstellen eines 3-stelligen MPN-Codes herangezogen. Die Auswertung erfolgte anhand der korrigierten MPN-Tabelle nach DE MAN (1977).

3.1.2 Benutzte Expositionstechniken

3.1.2.1 Einmischverfahren zur Kontamination der Untersuchungsmatrix

Dazu wurde der jeweilige Boden mit den o. g. Mikroorganismen gleichmäßig kontaminiert, so dass pro Gramm Boden eine definierte Anzahl der zu überprüfenden Mikroorganismen zu erwarten war. Der Boden wurde mit mindestens 10^4 für *E. coli* und 10^7 (Salmonellen und Enterokokken) KBE/g Boden des jeweiligen Prüfkeims kontaminiert, um einen Reduktionserfolg von mindestens 4 Zehnerpotenzen durch die Behandlung sicher nachweisen zu können.

In den Versuchen wurden die nachstehenden Prüforganismen verwendet: *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis*. Das Inokulum *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* wurde aus Kolonienmaterial, das in Standard-I-Bouillon 24 h bei 37 °C bebrütet wurde, hergestellt. Abweichend davon wurden die Salmonellen im Peptonwasser angezüchtet. Auf eine gleichmäßige Einmischung des Inokulums in den Boden wurde geachtet (Kapitel 3.1.5).

3.1.2.2 Aluminiumkeimträgertechnik für Bakterien

In Versuchen, in denen eine Kontamination der behandelten Matrix nicht möglich war oder aus Sicherheitsgründen vermieden werden musste, wurde die Keimträgertechnik zur Tenazitätsprüfung eingesetzt. Die verwendeten Aluminiumkeimträger waren 1 cm breit, 5 cm lang und 1 mm dick. Vor Gebrauch wurden die Keimträger mit 70 % Ethanol 2-3 Stunden entfettet, mit Aqua dest. gespült, auf eine Glasperlschicht in einer Petrischale horizontal gelagert und hitzesterilisiert. Jeder Keimträger wurden mit 0,05 ml (50 µl) Bakteriensuspension beimpft und bei 37 °C 1 h getrocknet.

3.1.2.3 Anwendung von Mikroorganismen in „freier Suspension“

Außer der Keimträgertechnik erfolgte zusätzlich in den Feldversuchen die Anwendung einer Mikroorganismensuspension (ca. 1 m² Bodenfläche wurde mit je einem Liter einer Suspension von *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium (Typ Zoosal oral) und *Enterococcus faecalis* Typ 13, KBE>10⁸/ml kontaminiert).

Vor dem eigentlichen Erhitzungsversuch wurden von jeder mit den drei Mikroorganismenarten kontaminierten Bodenfläche 5 Proben (Kontrollproben) gezogen und qualitativ auf Salmonellen, *E. coli* und Enterokokken, wie weiter oben beschrieben, untersucht. Abweichend davon wurde zum Nachweis der überlebenden *E. coli* und Enterokokken anstatt 20 g nur 1 g der Probe untersucht.

3.1.3 Virologische Methoden

3.1.3.1 Zellkulturen

Das in den Versuchen verwendete Bovine Parvovirus¹⁵ (BPV) wurde auf bovinen embryonalen Lungenzellkulturen (BEL) in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium DMEM + 10 % FKS vermehrt. Für das Auftauen, die Vermehrung und für die Passage wurde folgendes Material eingesetzt:

Wasserbad (37 °C)

Zentrifuge¹⁶

¹⁵ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim

¹⁶ Minifuge T, Rotor 3360, Heraeus Sepatech, D-37520 Osterode am Harz

Mikroskop¹⁷

Brutschrank¹⁸

Zentrifugenröhrchen (50 ml)¹⁹

Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM, siehe Anhang)²⁰

Fötale Kälberserum (FKS 126L)²¹

nichtessentielle Aminosäuren (NEA)²²

Zellkulturflaschen (50 ml²³ + 200 ml²⁴)²³

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

Das Auftauen der Zellsuspension erfolgte jeweils bei 37 °C im Wasserbad. Nachdem die gefrorene Zellsuspension auf ein erbsengroßes Stück zusammenschmolzen war, wurde der gesamte Inhalt des Einfriercups 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 107 x 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 % FKS vorsichtig resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun in kleinen Zellkulturflaschen (50 ml) in einen Brutschrank verbracht (37 °C, 4,5 % CO₂). 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 dann erneut 1 ml Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %, 37 °C) auf die Zellen 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 DMEM + 10 % FKS vorsichtig suspendiert und in mittlere Zellkulturflaschen überimpft. Die weitere Verwendung der Zellen fand dann statt, wenn eine Konfluenz des Zellrasens erreicht war.

¹⁷ Auflichtmikroskop Wilovert, 200370 Will-Wetzlar GmbH

¹⁸ Heraeus Sepatech, D-37520 Osterode am Harz

¹⁹ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 22726 (ohne Stehrand)

²⁰ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. T 043-50

²¹ Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. SO-115

²² Biochrom/Seromed[®], D-12247 Berlin, Art. Nr. K029

²³ Greiner GmbH, D-72636 Frickenhausen, Art. Nr. 690160

²⁴ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 178905

3.1.3.2 Virusvermehrung

In den Tenazitätsversuchen kam das Bovine Parvovirus (Stamm Haden) zum Einsatz. Zur Virusvermehrung wurden die BEL-Zellen wie oben beschrieben, in Gewebekulturflaschen bis zur Konfluenz vermehrt. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde der Zellrasen jeweils mit 5 ml einer auf 37 °C vorgewärmten phosp hatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) zweimal vorsichtig gewaschen.

Nun wurden jeweils 1 ml Virussuspension und 4 ml DMEM auf die Zellen gegeben, die Kulturflaschen geschwenkt und für eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) aufbewahrt. 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 sich auf zwei Dritteln des Zellrasens ein zytopathischer Effekt (CPE) zeigte. 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 wurde die Suspension zur Entfernung der Zellreste in 50 ml-Zentrifugenröhrchen 20 min bei 1800 x g/4 °C zentrifugiert. Der Überstand stellte nun die Ausgangssuspension des BPV dar und wurde bis zur weiteren Verwendung portionsweise in 15 ml-Zentrifugenröhrchen bei -80 °C tiefgefroren.

3.1.3.3 Herstellung der Keimträger zur Tenazitätsprüfung mit BPV

Die Keimträger wurden aus Zetapor-Membranen mit einer Stanze ausgestanzt und autoklaviert. Für das Beladen der Keimträger wurden folgende Materialien benötigt:

Virussuspension 1:10 verdünnt

Zetapor-Membranen²⁵

Polycarbonat-Membranen²⁶

²⁵ Zetapor Membranen Art. Nr.: NM293-11-02055

²⁶ Polycarbonat-Membranen, INFILTEC Art. Nr.: KN1CP 81030

Filtrationsvorsatz²⁷

Dichtungsring²⁸

Pinzette

Erlenmeyerkolben

Spritzen 2 ml²⁹

Pertrischale

Pipetten

Zum Beladen der Keimträger wurde eine definierte Menge (1 ml) der Virussuspension an Zetapor-Membranen adsorbiert und so in Tütchen aus Polycarbonat-Membranen (Kantenlänge 25 mm) eingeschweißt, sog. *Sandwich*-Keimträger. Die Polycarbonatmembranen wiesen Poren einer definierten Größe von 10 nm auf.

Aufgrund dieser geringen Porengröße kann kein Virus aus dem System entweichen und die Umgebung kontaminieren. Um die empfindlichen Prüfkörper im Boden vor mechanischen Beschädigungen durch die Fräswerkzeuge zu schützen, wurden sie zusätzlich mit einer Alufolie umwickelt. Der Virustiter in der Ausgangssuspension betrug 10^7 KID₅₀/ml.

Die beladenen Keimträger wurden mit der sie umhüllenden Aluminiumfolie in der Regel ca. 5 cm tief in die Erde eingelegt, bevor die Exposition in den entsprechenden Behandlungsprozessen erfolgte. Nach Beendigung des jeweiligen Versuches erfolgte die Entnahme der Keimträger zur Untersuchung des verbliebenen Virustiters im Laboratorium. Die Keimträger wurden vor und nach dem Versuch in einer Kühlbox bei 10 °C aufbewahrt.

3.1.3.4 Elution der Proben

Die Elution der Viren erfolgte nach der Exposition bzw. bei den Kontrollen in Beef-Extrakt-Lösung (siehe Anhang) bei einem pH von 8,5 unter Einsatz von Ultraschall, um die Viren von den Membranen abzulösen. Entsprechend der Anzahl der Keimträger wurden dazu Schraubgläschen vorbereitet, die mit jeweils 1 ml Beef-Extrakt-Lösung befüllt und entsprechend beschriftet wurden. Die Polycarbonatbriefchen, in denen sich die Membranen

²⁷Cuno, D-55130 Mainz, Art. Nr. 64085-01-1 MDS

²⁸Sartorius, D-37075 Göttingen, Art. Nr. 6980569

²⁹Henke-Sass-Wolf GmbH, D-78532 Tuttlingen, Art. Nr. 11497

befanden, wurden mit einer Pinzette am Rand gehalten, mit einer Schere aufgeschnitten und die Keimträger wurden in das bereitgestellte Schraubgläschen gegeben. Die Gläschen wurden anschließend auf Eis im Ultraschallwasserbad für 5 min 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 °C eingefroren.

3.1.3.5 Virusnachweis

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

Vor der Titration wurden die eluierten Proben aufgetaut und bei ca. 800 x g/20 °C, 20 min zentrifugiert. Für die Titration nach der Endpunktverdünnungsmethode in Röhrchen wurden folgende Materialien benötigt:

Eppendorfröhrchen mit Virussuspension

Zellkultur (Flasche mit Monolayer) BEL

DMEM

Penicillin-Lösung³⁰

Streptomycinsulfat-Lösung³¹

Amphotericin-Lösung³²

FKS

sterile Glasröhrchen³³

96-well-Mikrotiterplatte³⁴

Mikroskop³⁵

Die Zellen wurden 1 Tag vor der Titration in die Platten eingesät, wobei in jede Kavität der Mikrotiterplatte jeweils 100 µl einer verdünnten Zellsuspension pipettiert wurde. Die Dichte der Zellsuspension wurde dabei so bemessen, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der

³⁰ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. A321-42

³¹ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. A321-27

³² Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. A2612

³³ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 9620701

³⁴ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 149026

³⁵ Auflichtmikroskop Wilovert, 200370 Will-Wetzlar GmbH

Titration bereits am Plattenboden angeheftet und einen noch nicht ganz geschlossenen Zellrasen gebildet hatten. Vor der Viruszugabe wurde das Medium aus der Mikrotiterplatte entfernt.

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, und 0,8 % Amphotericin-Lösung) 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 weiterpipettiert wurden. Je 100 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden dann in jeweils vier parallele Kavitäten einer 96-well-Mikrofilterplatte überführt. Zusätzlich wurden in die erste Reihe der Platte pro Kavität 100 μ l Titrationsmedium ohne Virus pipettiert. Die Kavitäten dieser Reihe dienten bei der späteren Auswertung als Kontrolle des Zellwachstums.

Nach Zugabe der Proben aus den jeweiligen Verdünnungsstufen folgte eine Inkubation der Mikrotiterplatte für 5 bis 7 Tage bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO₂).

Die Zellrasen in der Mikrotiterplatte wurden täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Als infiziert galt eine Vertiefung, wenn mindestens ein Herd mit zytopathisch veränderten Zellen erkennbar war. Die Endablesung erfolgte erst dann, wenn keine weiteren positiven Wells mehr zu erwarten waren.

Als Titer wird der positive dekadische Logarithmus derjenigen Verdünnung bezeichnet, bei welcher statistisch die Hälfte der Ansätze reagiert (Angabe in $\log_{10} \text{KID}_{50} / \text{Testvolumen}$). Ermittelt wurde dieser Wert nach dem Schätzverfahren von SPEARMAN und KAERBER (1931). Die ermittelte Virusmenge in 100 μ l wurde auf 1 ml umgerechnet.

3.1.4 Laborversuche

3.1.4.1 Tenazitätsversuche mit Bakterien im Wasserbad

Die Versuche wurden mit künstlich kontaminiertem Boden (Sandig toniger Lehm; Bodenpunkte: 65-74) aus dem Gelände der Universität Hohenheim und mit in den Boden eingebrachten Keimträgern sowie mit den Prüfkeimen *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen Temperaturen und Einwirkungszeiten durchgeführt.

Der Boden wurde wie unter 3.1.2.1 beschrieben mit einer Suspension der Prüfbakterien die zwischen 10^8 und 10^9 KBE/ml enthielt, durchmischt und in einem Wasserbad bei Temperaturen von 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C und unterschiedlich langen Expositionszeiten (Tab.2) behandelt.

Bei Keimträgerversuchen, die unmittelbar nachdem sie wie unter 3.1.2.2 beschrieben, mit den entsprechenden Prüfbakterien kontaminiert waren, wurden sie in mit Boden angefüllten Schottflaschen eingebracht, die auf die jeweilige Prüftemperatur vorgewärmt waren und sofort im entsprechend temperierten Wasserbad exponiert. Nach verschiedenen Zeiten (Tab. 2) wurden die Keimträger aus den Schottflaschen entnommen und die Anzahl von überlebenden *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* auf den exponierten und auch bei den im Kühlraum bei +5 °C aufbewahrten Kontrollkeimträgern bestimmt. Die in den jeweiligen Versuchsansätzen gewählten Untersuchungsparameter sind im Detail der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Untersuchungsparameter in den Wasserbadversuchen zur thermischen Inaktivierung von *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* und *E. coli* im Boden

Versuchsansatz	Prüfbakterien	Temperaturen	Expositionszeit (min)	Bodenart	TS-Boden		Weitere Angaben in Tab. Nr.:
Boden	<i>Ent. F.</i>	65 °C	10, 20, 30	A N	85 %	85 %	4
		70 °C	10, 20, 30	N	75 %	86 %	5
		65 °C	10, 20, 30	N	77 %	86 %	6
Keimträger	<i>E. coli</i>	50 °C	10, 20, 30, 40, 50	N	75 %	86 %	12
		65 °C	10, 20, 30, 45, 60	N	76 %	87 %	9
	<i>Ent. F.</i>	65 °C	10, 20, 30	N	77 %	88 %	10
		70 °C	10, 20, 30	N	75 %	88 %	11
		50 °C	10, 20, 30, 40, 50	N	76 %	87 %	7
	S. Typh.	55 °C	10, 20, 30, 45, 60	N	77 %	88 %	8
		50 °C	10, 20, 30, 40, 50	N	75 %	86 %	12

A = Autoklavierter Boden; N = Natürlicher, gewachsener Boden Sandig toniger Lehm; Bodenpunkte: 69; *E. coli* = *Escherichia coli* *Ent. F.* = *Enterococcus faecalis*; S. Typh. = *Salmonella Typhimurium*; Tab. Nr. = Tabellenummer

3.1.4.2 Bestimmung der Tenazität in autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden

In den Versuchen wurde Boden in 4 Schottflaschen im nativen Zustand und in 4 Schottflaschen (20 g pro Flasche) nach dem Autoklavieren bei 120 °C, 1 bar und 20 min verwendet. Die Versuche dienen dazu, festzustellen, ob das Ergebnis der Keimzahlbestimmung im nativen Boden durch die Begleitflora wesentlich beeinflusst wird. Die mit *Enterococcus faecalis* beimpften Böden mit einem Trockensubstanzgehalt von 85 % wurden im Wasserbad einer Temperatur von 65 °C für 10, 20 und 30 min ausgesetzt.

Danach wurden die Probengefäße dem Wasserbad entnommen und ihr gesamter Inhalt in Trypton-NaCl-Lösung gebracht und wie weiter oben beschrieben, quantitativ untersucht.

3.1.4.3 Bestimmung der Tenazität bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten in nativen Böden

Diese Versuche wurden durchgeführt, um festzustellen, ob der Trockensubstanzgehalt des Bodens (mineralisch und organisch) einen Einfluss auf die Thermoresistenz der Prüfbakterien hat, exemplarisch wurde das Verhalten von den relativ thermoresistenten Enterokokken bei zwei definierten Trockensubstanzgehalten untersucht. Die Menge des Ansatzes war mit dem vorherigen Versuch gleich. Der mit *Enterococcus faecalis* beimpfte Boden wurde auf einen Trockensubstanzgehalt von 75 % und einen Trockensubstanzgehalt von bis 86 % eingestellt und im Wasserbad einer Temperatur von 70 °C 10 min, 20 min und 30 min erhitzt. Danach wurden die Probengefäße dem Wasserbad entnommen und ihr gesamter Inhalt (20 g je Probe) in Trypton-NaCl-Lösung gebracht und weiter quantitativ wie in Pkt. 3.1.1.2 bis 3.1.1.4 beschrieben. Zur Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes wurden ca. 20 g Boden bei 105 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz (2 Tage) getrocknet. Der Trockensubstanzgehalt (TS) wurde errechnet mit der Formel:

$$\text{TS (\%)} = \frac{\text{Bruttomasse nach der Trocknung} - \text{Masse des Einwaagegefäßes}}{\text{Einwaage}} \times 100$$

3.1.4.4 Bestimmung der Tenazität auf den Keimträgern im Boden

Die mit *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium und *E. coli* beimpften Aluminiumkeimträger wurden in 12 (6 Flaschen pro Trockensubstanz) Schottflaschen mit einer Bodenschicht von 5 cm – ein Keimträger pro Schottflasche bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten von 75 bis 88 % – verbracht und im Wasserbad Temperaturen von 50 °C, 57 °C, 65 °C, 67 °C und 70 °C ausgesetzt. Nach 10 min, 20 min, 30 min und 60 min wurden die Probengefäße dem Wasserbad entnommen und die Anzahl KBE der überlebenden Prüfbakterien, wie in Pkt. 3.1.1.2 bis 3.1.1.4 beschrieben, bestimmt.

3.1.5 Halbtechnische Versuche zur Bodendesinfektion mit Kalk

In den Versuchen wurde der Einfluss des Trockensubstanzgehaltes im Boden (Sandig toniger Lehm; Bodenpunkte: 65-74), des pH-Wertes und der angewandten Kalkmenge auf die Reduktion von Prüforganismen untersucht. Dabei wurden verschiedene Arten von Kalk in

Mengen von 300 g Kalk pro Container verwendet. Diese waren Branntkalk (CaO-Pulver) bzw. Weißfeinkalk DIN 1060 CL 90 und CaO-gekörnt; Kalkhydrat (EN-459-1 oder EN 12518), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -pulverförmig und in wässriger Form als sog. Kalkmilch.

In 40x50 cm großen Plastikcontainer wurden *Enterococcus faecalis* und *Salmonella* Typhimurium Typ „*Zoosal oral*“ manuell mit einem Metallstab mit kreisartigen Bewegungen in den Boden eingemischt. Der mit den Mikroorganismen kontaminierte natürliche Lehmboden von Ackerflächen (Uni-Hohenheim) wurde dann bei unterschiedlichen Wassergehalten mit verschiedenen Kalkmengen und –zubereitungen versetzt. Die Bodenproben (je 50 g) wurden zu unterschiedlichen Zeiten aus den Container entnommen und qualitativ bzw. quantitativ mit dem MPN-Verfahren untersucht. Zusätzlich wurde der pH-Wert in allen Kalkansätzen gemessen. Überprüft wurde auch die Mischbarkeit des Bodens mit Kalk und der Verlauf des pH-Wertes während der Versuche sowie der Einfluss des hohen alkalischen pH-Werts auf die Überlebensfähigkeit der Prüforganismen im Boden.

In acht Versuchen wurden die Prüforganismen mit oder ohne Wasserzusatz in den Boden eingemischt und in die Plastikcontainer gefüllt. Vor der Kalkung des Bodens wurden Proben entnommen und die Ausgangskeimkonzentrationen ermittelt. Danach erfolgte die Kalkung mit verschiedenen Mengen des Kalks (siehe Tab. 3). Die Behälter mit dem Boden wurden während des Versuches bei Temperaturen von + 4 und +20 °C gehalten. Die ersten Proben wurden etwa 20 min nach dem Einmischen der Bakteriensuspension aus dem gekalkten Boden entnommen, die weiteren Bodenproben wurden nach verschiedenen Zeiten (Tage) gezogen und untersucht. Die Bodentiefe, also die gesamte Arbeitsschicht, betrug etwa 5-10 cm in den verschiedenen Versuchsansätzen.

Im ersten Versuch wurden je 300 g Branntkalk; CaO-gemahlen; CaO-körnig und Kalkhydrat; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ohne Wasserzusatz und als Kalkmilch mit einer Branntkalkmenge von 300 g und mit einem Wassergehalt von 600 g in den Boden in Plastikcontainer eingemischt um die Wirksamkeit der einzelnen Kalkeinsätze zu prüfen.

Im zweiten Versuch wurde der Boden mit je 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und einer 33,33 %-, 20 %-, 14,2 %- und 11,1 %-igen Kalkmilch versetzt (siehe Anhang).

Im 3., 4. und 5. Versuch wurde eine 14,2 %-ige Kalkmilch mit verschiedenen Mengen an Kalkhydrat, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ von 250 g bis 1000 g und davon unterschiedliche Mengen dieser Lösung für 20 Liter Boden ($0,2 \text{ m}^2 \times 0,1 \text{ m} = 0,02 \text{ m}^3$) angewandt.

Im 6. Versuch wurde CaO in einer Menge von 640 g pro Bodendesinfektion ohne Wasserzusatz angewandt.

Im 7. Versuch wurde CaO in Mengen von 3,2 g in 100 g Boden mit 58,9 %- 66,7- % und 90,9 %-igem TS-Gehalt eingemischt.

Im 8. Versuch wurde CaO in Mengen von 32 g pro 1000 g Boden mit 30 %-igem TS-Gehalt und 19,2 g pro 600 g Boden mit 30 %-igem TS-Gehalt angewandt. In der Tabelle 3 sind die unterschiedlichen Mengen von Kalk und Wasser in der Übersicht dargestellt.

Tab. 3: Tabellarische Übersicht zu acht Laborversuchen bei unterschiedlichen Mengen von Kalk und Wasser

Versuch-Nr.	Mikroorganismen	Kalkart	Menge	Wasserzusatz	gemessener TS-Gehalt des Bodens nach der Kalkung	Höhe der Bodenschicht bzw. Bodenmenge
1	S. Typh.	CaO-gemahlen	300 g	ohne	85-87 %	5 cm
		CaO-körnig	300 g	ohne	84-86 %	
		Ca(OH) ₂ -gemahlen	300 g	ohne	83-86 %	
		Ca(OH) ₂ -Kalkmilch	300 g	600 g	71-74 %	
2	S. Typh.	Ca(OH) ₂ -Kalkmilch	300 g	600 g	75-79 %	5 cm
			300 g	1200 g	71-76 %	
			300 g	1800 g	66-69 %	
			300 g	2400 g	65-71%	
3	S. Typh. <i>Ent. f.</i>	Ca(OH) ₂ -Kalkmilch	250 g	1500 g	74-76 %	10 cm
4	S. Typh. <i>Ent. f.</i>	Ca(OH) ₂ -Kalkmilch	1000 g	6000 g	68-71 %	10 cm
5	S. Typh. <i>Ent. f.</i>	Ca(OH) ₂ -Kalkmilch	500 g	3000 g	71-77%	10 cm
		Ca(OH) ₂ -Kalkmilch	1000 g	6000 g	67-71%	10 cm
6	S. Typh. <i>Ent. f.</i>	CaO-gemahlen	640 g	ohne	89-93 %	10 cm
7	S. Typh.	CaO-Kalkmilch	3,2 g	9,09 g	90,91 %	100 g
			3,2 g	33,3 g	66,70 %	
			3,2 g	41,1 g	58,90 %	
8	S. Typh.	CaO-gemahlen	32 g	700 g	30 %	1000 g
			19,2 g	300 g	50 %	

TS-Gehalt: Trockensubstanzgehalt
 S. Typh.: *Salmonella Typhimurium*
 Ent. f.: *Enterococcus faecalis*

3.1.5.1 Versuche mit Kalk in verschiedenen Zubereitungsformen

Das Ziel des Versuches war, in Erfahrung zu bringen, in welcher Form Kalk am besten auf die Reduktion bestimmter in den Boden eingemischter Mikroorganismen wirkt.

Es wurden verschiedene Arten von Kalk in Mengen von 300 g Kalk pro Container und der Prüfstamm *Salmonella* Typhimurium Typ „*Zoosal oral*) verwendet. Die geprüften Kalkzubereitungen waren Branntkalk als Pulver, Branntkalk gekörnt, Kalkhydrat als Pulver und Kalkhydrat als Kalkmilch (Tab. 3).

Bei der prozentualen Berechnung der Kalkmilch wurden die Volumenanteile des Kalks und des Wassers berücksichtigt. Weil Wasser etwa doppelt so schwer wie $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ist, wurden auf 1 Volumenanteil Kalk 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und auf 1 Volumenanteil Wasser 600 g H_2O abgewogen, was einer 33,33-prozentigen Kalkmilch entsprach. Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft den in Boden eingemischten Kalk für die Versuche zur Tenazität ausgewählter Mikroorganismen in einem Plastikcontainer:



Abb. 1: Plastikcontainer mit 8 kg Boden, 300 g CaO gemahlen und eingemischt

3.1.5.2 Orientierungsversuche mit Kalkmilch in verschiedenen Konzentrationen

In diesem Versuchsansatz wurde Kalkhydrat, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mit Wasser in den Mengen: 1 Teil $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 1 Teil H_2O = 1+1 somit 1 + 2; 1 + 3 und 1 + 4 gemischt und zur Desinfektion des Bodens verwendet. 1 Teil entspricht 600 ml Wasser oder 600 ml Kalk. Als Prüforganismus wurde *Salmonella* Typhimurium verwendet. Die Plastikcontainer wurden während des Versuchs auf einer Temperatur von + 20 °C gehalten. Die Proben wurden nach 20 min, dem ersten, dritten und sechsten Tag nach Zugabe der Kalkzubereitung entnommen und

quantitativ untersucht. An jedem Untersuchungstag wurde der Trockensubstanzgehalt des Bodens bestimmt.

Im Einzelnen wurde auf 1 Volumen $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1 Volumen H_2O verwendet, was einem Gewicht von 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 600 g H_2O entspricht. Das Gemisch wurde jeweils in 8 kg Boden eingebracht. Pro 1 kg Boden wurden somit 38 g Kalk angewandt. Abweichend vom generellen Vorgehen wurden 50 ml Bakteriensuspension mit *Salmonella* Typhimurium nach dem Einmischen der Kalkmilch dazugegeben. Die unterschiedlichen Versuchsansätze wurden nachfolgend als A-D bezeichnet.

Versuch A (Zugabe von 600 g H_2O)

Bei der Verwendung von 1 Volumen Kalk und 1 Volumen Wasser wurden 300 g Kalk und 600 g Wasser eingesetzt.

Versuch B (Zugabe von 1200 g H_2O)

Bei 1 Volumen Kalk und 2 Volumen Wasser wurden 300 g Kalk und 1200 g Wasser verwendet.

Versuch C (Zugabe von 1800 g H_2O)

Bei der Verwendung von 1 Volumen Kalk und drei Volumen Wasser wurden 300 g Kalk und 1800 g Wasser eingesetzt.

Versuch D (Zugabe von 2400 g H_2O)

Bei der Verwendung von 1 Volumen Kalk und 4 Volumen Wasser wurden 300 g Kalk und 2400 g Wasser eingesetzt.

Bei der prozentualen Berechnung der Kalkmilch wurden die Volumenanteile des Kalks und des Wassers berücksichtigt. Bei der Variante A wurden, weil Wasser doppelt so schwer wie $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ist, auf 1 Volumenanteil Kalk 5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und auf 1 Volumenanteil Wasser 10 kg H_2O abgewogen, was somit einer 33,33-prozentigen Kalkmilch entsprach.

Die Volumenanteile Kalk und Wasser ergaben bei der Variante B einen Volumenanteil mit 5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 2 Volumenanteile Wasser mit 20 kg H_2O . Das entspricht einer 20-prozentigen Kalkmilch.

Bei der Variante C mit 1 Volumenanteil mit 5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 3 Volumenanteile Wasser mit 30 kg H_2O entspricht dies einer 14,2 %-igen Kalkmilch.

Bei der Variante D mit 4 Volumenanteilen Wasser entspricht dies einer 11,1 %-igen Kalkmilch.

Eine Darstellung der Berechnung der Kalk- und Wassermengen zur Herstellung einer verdünnten Kalkmilch befindet sich im Anhang.

Die vier nachfolgenden Abbildungen zeigen vier Plastikcontainer mit jeweils dem gleichen Boden bei Einmischung verschiedener Wassermengen und gleichen Mengen an Kalkhydrat. Die nachfolgenden Abbildungen 2 bis 5 zeigen die Bodenproben, die mit 300 g Löschkalk und mit unterschiedlichen Mengen an Wasser vermischt wurde:



Abb. 2: Bodenproben mit 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 600 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden (Versuch A)

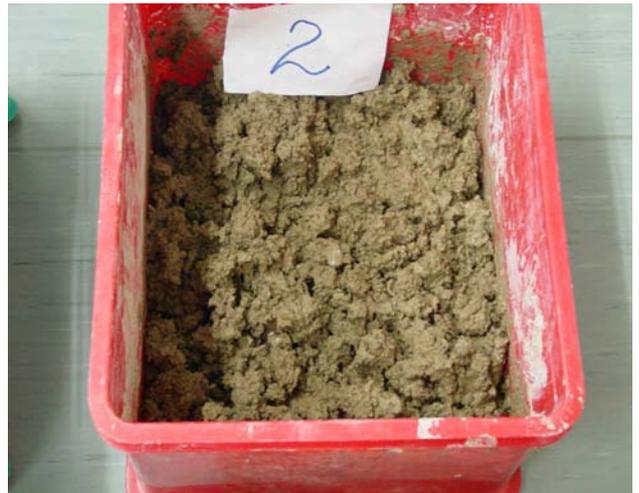


Abb. 3: Bodenproben mit 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 1200 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden (Versuch B)



Abb. 4: Bodenproben mit 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 1800 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden (Versuch C)



Abb. 5: Bodenproben mit 300 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 2400 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden (Versuch D)

3.1.5.3 Versuche mit Kalkmilch ($1,25 \text{ kg Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$)

In diesem Versuch wurden neben einem Ansatz mit 200 ml einer Suspension mit *Salmonella* Typhimurium als Prüfstamm auch ein entsprechender Ansatz mit *Enterococcus faecalis* angesetzt. Die Keimsuspensionen wurden in je zwei Plastikcontainern in möglichst gleichmäßiger Verteilung auf die Bodenoberfläche aufgegossen. Nach 30 min Trockenzeit wurden dann die ersten 10 cm der Bodenschicht gleichmäßig durchmischt. Die

Plastikcontainer blieben während des Versuchs bei Zimmertemperatur stehen. Je zwei Plastikcontainer wurden mit $1,25 \text{ kg Ca(OH)}_2/\text{m}^2$, umgerechnet $12,5 \text{ g Ca(OH)}_2$ pro 1 l Boden als 14,2 %-ige Kalkmilch (1Teil Ca(OH)_2 und 3 Teile Wasser) behandelt, während je zwei weitere nur mit den Prüfkeimsuspensionen als Kontrollen ohne Kalk angesetzt wurden. Es wurden jeweils 2 Proben vom nicht gekalkten Boden und je 5 Stichproben vom gekalkten Boden bis 5 cm Bodentiefe nach 20 min (0. Tag,) sowie am 1., 2., 3. und 4. Tag entnommen und die Anzahl der überlebenden Prüfkeime mittels MPN-Verfahren bestimmt.

Im den halbtechnischen Versuchen mit Löschkalk wurde dabei nach folgendem Arbeitsschema vorgegangen:

1. Aufgießen einer Suspension mit Prüfmikroorganismen auf die Bodenoberfläche in den Plastikcontainern
2. 30 min einwirken lassen, dann gleichmäßiges Einmischen bis 10 cm Bodentiefe
3. Entnahme von 5 bis 10 Kontrollproben bis max. 5 cm Bodentiefe
4. Einmischen von Kalkmilch aus Kalkhydrat
5. Nach 24 h Entnahme von 5-10 Stichproben, Untersuchung nach dem MPN-Verfahren

Die Proben wurden in den einzelnen Versuchen aus den Containern an verschiedenen Tagen entnommen. Das Arbeitsschema gilt für alle weiteren Laborversuche bei der Verwendung von Ca(OH)_2 (Löschkalk).

Die nachfolgenden Abbildungen 6 + 7 zeigen einen Plastikcontainer als Kontrolle mit einem mit Prüfmikroorganismen vermischten Boden (Abb. 6) und mit Boden der mit 250 g Ca(OH)_2 als 16,7 % Kalkmilch versetzt wurde (Abb. 7).



Abb. 6: Kontrolle; Boden ohne Kalkmilch



Abb. 7: Boden behandelt mit Kalkmilch

3.1.5.4 Versuche mit Kalkmilch (5,0 kg Ca (OH)₂/m²)

Hier wurde eine erhöhte Menge Kalkmilch ausgebracht, so dass eine vierfach so hohe Konzentration im Boden erreicht wurde (5,0 kg Ca (OH)₂ pro m²). Anders als vorher wurde in diesem Versuch auch der pH-Wert in der Erdschicht unterhalb der Arbeitsschicht von mehr als 10 cm Tiefe gemessen.

Dieser Versuch war in der Durchführung mit dem unter 3.1.5.3 beschriebenen Ansatz vergleichbar. Der Unterschied bestand darin, dass 5 kg Ca(OH)₂/m², umgerechnet 50,0 g Ca(OH)₂ pro 1 l Boden als 14,2 %-ige Kalkmilch (1Teil Ca(OH)₂ und 3 Teile Wasser) statt 1,25 kg Ca(OH)₂/m² verwendet wurde.

Die Abbildungen 8, 9 und 10 zeigen drei Plastikcontainer, einer als Kontrolle (Abb. 8) und der zweite Container gefüllt mit Ca(OH)₂ zur Desinfektion des Bodens (Abb. 9). Im einen Container wurde die obere Bodenschicht abgetragen (Abb.10).



Abb. 8: Kontrolle im 4. Laborversuch



Abb. 9: Boden behandelt mit Kalkmilch, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ohne abgetragene obere Erdschicht



Abb. 10: Boden behandelt mit Kalkmilch, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mit der abgetragenen oberen Erdschicht

3.1.5.5 Versuche mit Kalkmilch (2,5 und 5,0 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$)

In diesem Versuch wurde $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als Kalkmilch in einer Menge von 2,5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$ und 5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$, umgerechnet 25,0 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pro 1 l Boden und 50,0 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pro 1 l Boden für die Desinfektion des Bodens verwendet. Als Prüforganismen wurden wie in den zwei vorhergegangenen Versuchen *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* verwendet. In zwei parallelen Ansätzen wurden in zwei Plastikcontainern 2,5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als 14,2 %-ige Kalkmilch (1 Teil $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 3 Teile Wasser) pro Quadratmeter Boden und in zwei weiteren Plastikcontainern a 5 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pro Quadratmeter Boden ausgebracht. Ein Container mit nicht gekalkten jedoch mit Prüfkeimen kontaminiertem Boden wurde als Kontrolle verwendet. Nach 20 min (0. Tag) wurden von jedem Container 2 Proben entnommen. Die Probe aus der Kontrolle (nicht gekalkter Boden) bestand aus 5 Einzelproben. Nach 24 h wurden 2 Proben aus der Kontrolle und je 5 Proben aus den 4 Containern mit gekalktem Boden entnommen. Am 7. Tag wurden die Proben nach dem gleichen Muster wie nach 24 h gezogen. Bei jeder Probennahme wurden der TS-Gehalt und pH-Wert des Bodens ermittelt. Die Kalk- und H_2O -Mengen wurden, wie im Kpt. 3.1.5 dargestellten Verfahren ermittelt.

3.1.5.6 Versuche mit gemahlenem Branntkalk

In zwei Containern, je 0,2 m² groß, wurde je 200 ml einer Suspension von *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosaloral“ und *Enterococcus faecalis* als Prüforganismen mit dem Boden bis in 10 cm Bodentiefe vermischt.

In diesem Versuch wurde CaO als Pulver in einer Menge von 3,2 kg/m², umgerechnet 32,0 g CaO pro 1 l Boden verwendet. In einem Container wurden 640 g CaO mit 20 l Boden vermischt, jedoch kein Wasser zugegeben, um zu prüfen, ob der natürliche Wassergehalt des Bodens in Kombination mit Branntkalk gegebenenfalls für eine Desinfektion ausreichen würde. Ein entsprechender Kontrollansatz wurde wie in den vorherigen Versuchen mitgeführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden nach 20 min (0. Tag) sowie am 1., 2., 3. und 4. Tag gezogen und nach dem MPM-Verfahren untersucht. Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt den mit Branntkalk vermischten Boden.

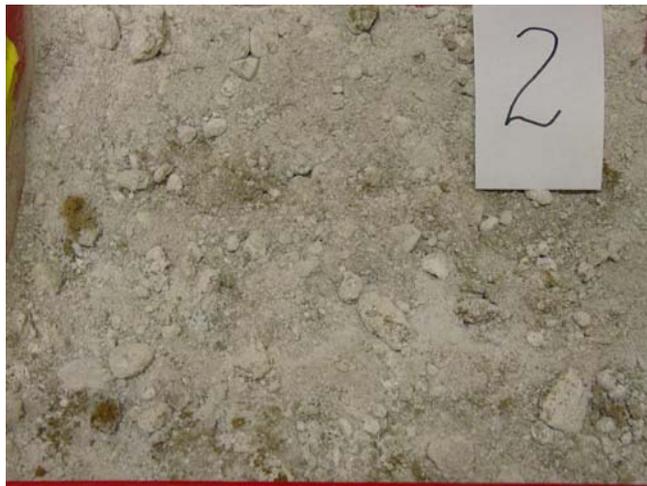


Abb. 11: Container gefüllt mit Boden, vermischt mit CaO

3.1.5.7 Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten zwischen 58,9 % und 90,91 %

In diesem Versuch wurden Böden mit unterschiedlichem Feuchtigkeitsgehalt verwendet, um auch diesen Einflussparameter in seiner Auswirkung auf den Desinfektionserfolg erfassen zu können. Der Kalk wurde in einer Menge von 3,2 kg CaO-Pulver pro m² Boden angewandt. In jedem Behälter befanden sich 300 g Boden. Pro 100 g Boden wurden 3,2 g CaO eingemischt. Als Prüforganismus wurde nur *Salmonella* Typhimurium verwendet. In 5 Plastik-Behältern mit einem Fassungsvermögen von 1 l wurden auf 90 g Boden jeweils 10 ml Keimsuspension eingemischt. Als Kontrolle wurde ein Behälter mit identischem Inhalt, aber ohne CaO, vorbereitet. In je weiteren fünf Behältern wurden entsprechende Ansätze die

Boden mit 66,7 % TS und 58,9 % TS enthielten sowie die entsprechenden Kontrollen angesetzt.

Die Probenentnahme erfolgte am 1. Tag (24 h nach der Einmischung der Prüforganismen in den Boden), sowie am 3. und am 7. Tag. Aus jedem Behälter wurden jeweils 2 Proben entnommen, ebenso aus den Kontrollbehältern. Bei allen Proben erfolgte die Keimzählermittlung mit dem MPN-Verfahren. In den Behältern mit 66,7 % TS und 58,9 % TS bildete sich eine Wasserschicht über der Bodenoberfläche, deswegen wurde vor jeder Probennahme die Wasser-Bodenschicht gut gemischt, um eine homogene Probe zu erhalten. Am Tag der Probennahme wurden jeweils der pH-Wert und der TS-Gehalt des gekalkten Bodens erfaßt. Die Behälter wurden während des Versuches auf einer Temperatur von 4°C gehalten und waren über die gesamte Versuchsdauer mit Alufolie abgedeckt.

3.1.5.8 Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten von 30 % und 50 %

In diesem Versuch wurde die Reduktion der Prüforganismen bei 30 % und 50 % TS-Gehalt des Bodens untersucht. Pro Quadratmeter des befeuchteten Bodens wurde 3,2 kg CaO angewandt. Der pH-Wert des Bodens vor dem Versuch betrug 7,3. Die Versuchsdurchführung war ansonsten so wie unter 3.1.5.7 beschrieben.

3.1.6 Feldversuche

3.1.6.1 Versuche mit einem Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem mit Injektorbrenner

Im Rahmen der Erarbeitung einer praktikablen und zuverlässigen Methode zur Bodendesinfektion wurde die Möglichkeit der Anwendung des Bodenverbesserungs- und Sanierungssystems (BVS-Gerät) der Firma „Pedosan“ zur Bodendesinfektion unter praktischen Bedingungen im Feld (Ackerboden) untersucht. Das Gerät wurde ursprünglich zur Sanierung von Böden, insbesondere zur Eliminierung von Unkräutern, Samen und Bodennematoden entwickelt (Abb. 12, 14 und 15).

Das BVS-Gerät ist ein mobiles Fahrzeug mit 1,4 m Breite und für den Einsatz im Freiland konzipiert. Bei der Anwendung des Gerätes laufen folgende Arbeitsschritte ab:

- a) das Lockern des zu behandelten Bodens. Dies erfolgt durch drei am Gerät angebrachte, schnell laufende Umkehrbodenfräsen mit variabler Tiefeinstellung von 0-20 cm
- b) der feinkrümelige Boden wird durch die Schneidmesser der Umkehr-Bodenfräse auf ein geschlossenes Edelstahlscharnier-Transportband geschleudert und über eine

Abzieheinrichtung in gleichmäßiger Höhe verteilt

- c) danach durchläuft der Boden eine Thermokammer (siehe Abb. 15), in der er in nur wenigen Sekunden auf eine Temperatur von ca. 70 °C und mehr erhitzt wird

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 Propangas.

- d) Nach dem Verlassen der Thermokammer fällt der erhitzte Boden mit der durch die Brenner direkt behandelten Seite nach unten, so dass durch die Wärmeabstrahlung nach oben ein nochmaliges Durchdringen der Hitze durch das Material und zu einem hohen Abtötungsgrad der Mikroorganismen beitragen kann (Abb. 16).

Mit der Anlage ist eine Tagesflächenleistung, je nach Bodenbeschaffenheit (trockener, lockerer Boden), von ca. 2000 m² bei einer Bearbeitungstiefe von 10 cm möglich.



Abb. 12: BVS-Bodensanierungsgerät mit Zugmaschine in Vorbereitung während des praktischen Einsatzes

Aus der nachfolgenden Abbildung 13 wird die Versuchsfläche ersichtlich, die mit einer üblichen Ackerfräse aufgelockert wurde.



Abb. 13: Ein mit einer Ackerfräse zur Bodendesinfektion mit dem BVS-Gerät vorbereitetes Feld



Abb. 14: Umkehrbodenfräse mit Rotation gegen die Arbeitsrichtung zur besseren Zerkleinerung der Bodenpartikel bei variabler Tiefeneinstellung



Abb. 15: Thermokammer, in der die Bodenpartikel mit Hilfe der Umkehrfräsen geschleudert werden und somit hohen Temperaturwerten ausgesetzt sind



Abb. 16: Erhitzter Boden mit starker Dampfentwicklung

Zur Validierung der Anlage unter Praxisbedingungen wurde neben den bakteriellen Prüfkeimen *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. Typhimurium* auch das als besonders thermoresistent geltende Bovine Parvovirus eingesetzt.

In insgesamt 4 Untersuchungsreihen wurden zu unterschiedlichen Terminen und den dabei jeweilig vorherrschenden Witterungsbedingungen die praktischen Untersuchungen auf einem

Feld (Sandiger Lehm, Bodenpunkte: 40) am Stadtrand einer süddeutschen Großstadt durchgeführt. Der erste Vorversuch wurde im Sommer mit Lufttemperatur um 27 °C durchgeführt. Der zweite und der dritte Versuch wurden bei einer Lufttemperatur von über 30 °C und unter der strahlenden Sonne im Sommer durchgeführt. Der 4. Versuch wurde im Herbst im Regen bei einer Temperatur von etwa 17 °C gemacht.

Während der Versuche zur Ermittlung der keimabtötenden Wirkung des „BVS-Systems“ auf in den Boden eingebrachte Fäkalkeime wurde zu Beginn der Untersuchungen eine Versuchsfläche von ca. 1,40 m Breite und ca. 30 m Länge vorbereitet, indem diese mit einer üblichen Ackerfräse aufgelockert wurde. Die Temperatur des Bodens wurde elektronisch mit einem Thermometer gemessen.

In einem 1. Versuch, der als „Vorversuch“ zur Überprüfung der Keimträgertechnik und vor allem zur Bestimmung der „Wiederfindungsrate“ der Keimträger unter Praxisbedingungen diente, 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 (Kpt. 3.1.2.2). Dies war notwendig, um die brennbaren Polycarbonat-Membranen mit den Parvoviren (Kpt. 3.1.3.3) vor der direkten Einwirkung der Brennerflamme zu schützen. Die parallele Anwendung von „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern, auch bei den bakteriologischen Untersuchungen, sollte es ermöglichen, den Einfluss der schützenden Aluminiumfolie auf die thermische Inaktivierung abzuschätzen und um etwaige mechanische Ablösungseffekte auf den mit Bakterien beimpften Keimträgern kontrollieren zu können. Somit war bei einem gleichgeschalteten Einsatz der „Keimträgertechnik – geschlossen“ ein direkter Vergleich der Tenazität der untersuchten Bakterien und Viren gegeben.

Einige der Kontrollproben wurden bei Temperaturen von + 4 °C im Labor belassen, die anderen Kontrollproben wurden zum Versuch gebracht. Alle Kontrollproben wurden parallel ausgewertet. Beim Auspacken der Keimträger für den Versuchsansatz vor Ort wurden diese mehrere Sekunden der direkten Sonneneinstrahlung in den Petrischalen ausgesetzt. Die Unterschiede in der Reduktion der Prüforganismen zwischen den im Labor belassenen, gekühlten und den zum Versuch gebrachten Keimträgern zeigten auf, in wieweit sich die Prüforganismen inzwischen im Freien reduzieren, bevor sie in den Boden gebracht wurden.

Nach der Exposition wurden die Keimträger inklusive der nicht exponierten Kontrollproben einzeln sofort in ein Reagenzglas mit 10 ml Trypton-NaCl-Lösung eingebracht. Die Proben wurden auf einem Rundschüttler über Nacht geschüttelt, um die an der Oberfläche der Keimträger haftenden Mikroorganismen in Suspension zu bringen. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der abgeschwemmten Bakterien.

Zusätzlich wurden mit den 3 bakteriellen Prüfkeimen auch ausgewählte Bereiche des nativen Bodens für die Tenazitätsuntersuchungen kontaminiert, indem je 1 Liter der entsprechenden Suspension mit 10^8 bis 10^9 KBE/ml auf 1 m^2 der Versuchsfläche ausgebracht wurde.

3.1.6.2 Versuche zum Einsatz von „Solarfolien“

Auf einem freien Wiesengelände (Sandig toniger Lehm; Bodenpunkte:65-74) der Universität Hohenheim wurden im Frühling bis zum Sommer (Temperaturen in Tab. 39, 44 und 46) Versuche mit Solarfolien durchgeführt.

Der erste Versuchsdurchgang wurde im Frühling mit Lufttemperatur um $17 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $24 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Der zweite Versuchsdurchgang wurde im Sommer mit Lufttemperatur um $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $27 \text{ }^\circ\text{C}$ gemacht. Der dritte Versuch wurde im Sommer mit Lufttemperatur von über $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Die Vorbereitung der Keimträger als auch die Auswertung erfolgte analog den Großversuchen bei der Bodenerhitzung.

Die weißen und schwarzen Folie hatten eine Stärke von $0,15 \text{ mm}$, aus Polyethylen, nicht beschichtet, zwei Meter breit und fünf Meter lang. Es handelte sich um übliche in der Landwirtschaft angewandte Folien. Folienhersteller: „Werra-Plastic“, 36269 Philippsal.

Die Versuche wurden auf einem Wiesengelände der Versuchsbetriebe durchgeführt. Zur Durchführung der Tenazitätsuntersuchungen wurden drei Versuchsflächen abgesteckt. Eine der drei Versuchsflächen wurde mit schwarzer Folie abgedeckt, die zweite mit weißer Folie, die dritte wurde nicht abgedeckt und diente als Kontrollfläche. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns war ein ca. 5 cm hoher Grasbestand vorhanden. Es wurden nur Keimträgerversuche mit nicht in Aluminiumfolie eingehüllten Keimträgern durchgeführt. Die Vorbereitung der Keimträger als auch die Auswertung erfolgte, wie in Kpt. 3.1 beschrieben. Es wurden drei Versuchsdurchgänge zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, die sich in den verwendeten Prüforganismen unterschieden. Vor der Probenahme wurde die Temperatur des Bodens in $2\text{-}10 \text{ cm}$ Tiefe mit einem Maximalthermometer gemessen.

Die Konzentration je Bakterienart in der Suspension betrug über 10^7 KBE/ml. Bovines Parvovirus in $10^{4,3}; 10^{4,5}$ KID₅₀ in $100 \text{ }\mu\text{l}$ wurde als Kontrolle am 0. Tag in den Boden gebracht.

Die aus dem Boden gezogenen Proben wurden sofort in ein Erhaltungsmedium in ein Reagenzglas verbracht. Die Proben mit Viren wurden im gekühlten Zustand von der Versuchsstelle gebracht.

Ein erster Versuchsdurchgang wurde mit *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* durchgeführt.

Es wurden 10 mit *Enterococcus faecalis* beimpfte Keimträger unter die schwarze Folie, 10 Keimträger unter die weiße Folie und 5 Keimträger als Kontrolle ohne Folie unabgedeckt in 5 cm Bodentiefe gebracht. Die Proben wurden am 13., 22., 28., 35. und 41. Tag gezogen (2 Keimträgern je Folie und 1 Keimträger als Kontrolle).

Es wurden 8 mit *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ beimpften Keimträger unter die schwarze Folie, 8 Keimträger unter die weiße Folie und 8 Keimträger als Kontrolle ohne Folie unabgedeckt in 5 cm Bodentiefe gebracht. Die Proben wurden am 13., 22., 28. und 35. Tag gezogen (2 Keimträger je Folie und 2 Keimträger als Kontrolle).

In einem zweiten Versuchsdurchgang wurde zusätzlich zu den im ersten Versuchsdurchgang verwendeten bakteriellen Prüfkeimen auch das Überlebensverhalten von *E. coli* und Parvoviren überprüft.

Es wurden 8 mit *Enterococcus faecalis* beimpfte Keimträger unter die schwarze Folie, 8 Keimträger unter die weiße Folie und 8 Keimträger als Kontrolle ohne Folie unabgedeckt in 5 cm Bodentiefe gebracht. Die Proben wurden am 7., 14., 21. und 28. Tag gezogen (2 Keimträger je Folie und 2 Keimträger als Kontrolle).

Es wurden 8 mit *Salmonella* Typhimurium beimpfte Keimträger unter die schwarze Folie, 8 Keimträger unter die weiße Folie und 5 Keimträger als Kontrolle ohne Folie unabgedeckt in 5 cm Bodentiefe gebracht. Die Proben wurden am 7., 14., 21. und 28. Tag gezogen (2 Keimträger je Folie und 1 Keimträger als Kontrolle).

Es wurden 5 mit *E. coli* 63 beimpften Keimträger unter die schwarze Folie, 5 Keimträger unter die weiße Folie und 5 Keimträger als Kontrolle ohne Folie in 5 cm Bodentiefe gebracht. Die Proben wurden am 7., 14., 21., 28. und 35. Tag gezogen (1 Keimträger je Folie und 1 Keimträger als Kontrolle).

Es wurden 12 mit Bovinem Parvovirus beimpfte Keimträger unter die schwarze Folie, 12 Keimträgern unter die weiße Folie und 12 Keimträger als Kontrolle ohne Folie in 5 cm Bodentiefe gebracht. Die Proben wurden am 0. 7., 14., 21., 28. und 35. Tag gezogen (2 Keimträger je Folie und 2 Keimträger als Kontrolle).

In einem dritten Versuchsdurchgang wurde nur *Salmonella* Typhimurium eingesetzt.

Es wurden 12 mit *Salmonella* Typhimurium beimpften Keimträger unter die schwarze Folie, 12 Keimträger unter die weiße Folie und 12 Keimträger als Kontrolle im Labor bei einer Temperatur von +25 °C belassen (abgedunkelt). Die Proben wurden am 0. 7., 14., 21., 28. und 35. Tag gezogen (2 Keimträger je Folie und 2 Keimträger als Kontrolle).

3.1.6.3 Versuche zum Einsatz eines Gerätes zur Bodendämpfung

Das eingesetzte Gerät der Familie Veigel war ein handelsüblicher im Gartenbau angewandter Dampfautomat der Firma „Moeschle“ mit Dampfkessel und mit einer

hydraulisch schwenkbaren Dämpfhaube. Die Haube ist 5 m lang und 3 m breit, somit konnte eine Bodenfläche von 15 m² behandelt werden.

Der Praxisversuch zur Bodendämpfung wurde auf einem Feld in der Nähe einer Großstadt durchgeführt. Die Versuchsfläche bestand aus leichtem, aufgelockertem Boden (Löß-Lehm). Der Versuch wurde bei trockenen Witterungsbedingungen mit Lufttemperaturen um 25 °C im Spätsommer durchgeführt.

In dem Versuch wurden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Bovines Parvovirus* (BPV) zur Validierung verwendet. In den Boden wurden „offene“ und „geschlossene“ Keimträger eingebracht. Zusätzlich erfolgte die Anwendung einer Keimsuspension. Der Versuchsablauf war mit dem Versuch des Injektorbrenners vergleichbar.

Vor der Hitzebehandlung wurde neben der Bestimmung des Wassergehaltes des Bodens die Bodentemperatur in verschiedenen Zeitabständen während und nach der Hitzeeinwirkung in 5, 10 und 15 cm Bodentiefe mit einem Thermometer elektronisch gemessen und über eine Zeitspanne von insgesamt 40 Minuten (Versuchsende) verfolgt. Die Dämpfung dauerte 20 min.

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

12 „offene“ und 12 „geschlossene“ Keimträger, beimpft mit je *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium Typ „*Zoosal oral*“, sowie 12 Keimträger mit Viren wurde in 5 cm Bodentiefe eingebracht. Direkt nach der Hitzeeinwirkung wurden die Keimträger mit Bakterien in Trypton-NaCl-Lösung (Erhaltungsmedium) gegeben. Zusätzlich wurden mit den 3 bakteriellen Prüfkeimen auch ausgewählte Bereiche des nativen Bodens für die Tenazitätsuntersuchungen kontaminiert, indem je 1 Liter der entsprechenden Suspension mit 10⁸ KBE/ml auf ca. 1 m² der Versuchsfläche ausgebracht wurde.

3.1.6.4 . Versuche zur Anwendung von Branntkalk

Ausgehend von den Ergebnissen der halbtechnischen Versuche wurden drei Praxisversuche zur Kalkung des Bodens durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde im Versuch 1 + 2 handelsüblichen Branntkalk (CaO-Pulver bzw. Weissfeinkalk; CaO-Gehalt: 94 %) DIN 1060 CL 90 in einer Menge von 0,8 kg/m² + 1,6 kg/m² und im 3. Versuch 1,6 kg/m² + 3,2 kg/m² Boden ausgebracht.

Die Versuche wurden auf Feldflächen mit Boden (Sandig toniger Lehm bis toniger Lehm; Bodenpunkte: 65-74 je nach Einzelprobe) des Versuchsbetriebes der Universität Hohenheim im Herbst durchgeführt. Der erste Versuch wurde mit Lufttemperatur von 7 °C

bis 12 °C (Bodentemperatur von 11 °C), der zweite Versuch mit 10 °C bis 19 °C (Bodentemperatur von 16 °C) und der dritte mit Lufttemperatur von 7 °C bis 10 °C durchgeführt.

Die bakterizide Wirkung der Kalkbehandlung des Bodens wurde mit den Prüforganismen: *E. coli*, *Enterococcus faecalis* sowie *Salmonella* Typhimurium untersucht. Die Prüforganismen wurden sowohl als Suspension zur direkten Kontamination der Prüfmatrix als auch auf Keimträgern ohne Umhüllung mit Aluminiumfolie eingesetzt.

Im einzelnen wurden zunächst in jedem Versuch 6 Versuchsflächen in der Größe von 1,0 m x 1,0 m abgesteckt.

Auf jeweils einem Quadratmeter Fläche wurden dann je nach Versuch die o.g. Mengen von Kalk ausgebracht und mit einer üblichen landwirtschaftlichen Bodenfräse 5 cm tief umgefräst. Abbildung 17 zeigt die mit unterschiedlichen Kalkmengen beaufschlagten Versuchsflächen.

Anschließend wurde von jedem Prüforganismus ein Liter Prüfkeimsuspension mit 10^8 bis 10^9 KBE/ml möglichst gleichmäßig mit einer Gießkanne je 1 m² der Bodenoberfläche ausgebracht.

5 Keimträger wurden in jedem Versuch zusätzlich mit den 3 obengenannten Bakterienarten auf die jeweilige Versuchsfläche Kalk ausgebracht (Abb. 18).

Die Zahl der Proben und der Tag der Probenahme war je nach Versuch unterschiedlich. An jedem Tag der Probenahme wurde der pH-Wert des gekalkten Bodens gemessen.

Als Kontrolle dienten Parzellen ohne Kalkbehandlung, ansonsten wurden diese auf die gleiche Art und Weise mit Bakteriensuspensionen und mit Keimträgern behandelt, wie die Versuchsflächen. Nach jede Probenahme wurden die Keimträger in Reagenzgläser mit Erhaltungsmedium (0,9 %-ige NaCl-Lösung) verbracht (1 Keimträger pro Röhrchen) während die Bodenproben (je Probe ca. 100 g) in Schottflaschen (eine Probe pro Flasche) gefüllt wurden.

Im 1. Versuch erfolgte die Messung des pH-Werts im gekalkten Boden am 0., 1. und 4.Tag. Die Proben wurden als Keimträger aus Parzellen mit 0,8 kg und 1,6 kg CaO am 1. und 4. Tag gezogen. An den gleichen Tagen wurden 5 Bodenproben für die qualitative Untersuchung aus allen gekalkten Flächen entnommen. Die Kontrollproben wurden in Mengen von 2 Keimträgern und 2 Bodenproben pro Bakterienart am 0., 1. und 4.Tag entnommen.

Im 2. Versuch erfolgte die Messung des pH-Werts im gekalkten Boden am 0., 1., 2., 6. und 13. Tag. Die Proben wurden als Keimträger von mit 0,8 kg und 1,6 kg CaO gekalkten Parzellen am 1., 2. und 6. Tag gezogen. Es wurden 3 Bodenproben je Bakterienart für eine qualitative Untersuchung aus allen gekalkten Flächen am 1., 2., 6. und 13. Tag entnommen.

Als Kontrollproben wurden 2 Keimträger pro Bakterienart für die quantitative Untersuchung am 0. Tag entnommen.

Im 3. Versuch erfolgte die Messung des pH-Werts im gekalkten Boden am 0., 3. und 6. Tag. Die Proben wurden als Keimträger mit 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m² der gekalkten Parzellen am 0., 2. und 6. Tag gezogen. Es wurden 5 Bodenproben je Bakterienart für die qualitative Untersuchung aus allen gekalkten Flächen am 0., 2. und 6. Tag entnommen. Die Kontrollproben wurden in Mengen von 2 Keimträgern für die quantitative und 2 Bodenproben für die qualitative Untersuchung pro Bakterienart am 0., 2. und 6. Tag entnommen.

Vor dem Einbringen der Keimträger wurden Bodenproben entnommen, um den pH-Wert des Bodens zu messen und auf den Gehalt jener Mikroorganismen zu untersuchen, die in freier Suspension bei der Kalkanwendung auf die Bodenoberfläche der Versuchspartzen ausgebracht worden waren. Die Keimträger wurden am 1. und 4. Tag nach der Kalkbehandlung entnommen und auf die Überlebensfähigkeit der Prüforganismen untersucht.



Abb. 17: 6 Versuchsflächen mit Kalk; im Vordergrund 0,8 kg CaO/m², im Hintergrund 1,6 kg CaO/m²

Das primäre Ziel war, in Erfahrung zu bringen, ob relevante Mikroorganismen, die stellvertretend für pathogene Erreger angewandt wurden, durch die Kalkung der Versuchsböden reduziert bzw. inaktiviert werden können. Neben der primären Fragestellung zur Inaktivierung der Prüfbakterien sollte in diesem Versuchsansatz auch ermittelt werden, ob es möglich ist, durch ein Fräsen des Bodens bis 15 cm Bodentiefe nach der erfolgten Desinfektion (Versuchsende) die kalkhaltige Oberschicht mit Bodenmaterial soweit zu verdünnen, dass der pH-Wert des Bodens vom stark alkalischen Bereich wieder zum

Neutralpunkt gesenkt werden kann. Daher wurden 13 Tage nach Versuchsbeginn die gekalkten Flächen mit einer Bodenfräse 15 cm tief gefräst und anschließend der pH-Wert gemessen (Abb. 19). Der pH-Wert der Proben wurde mit einem Microprocessor pH-Meter (pH 535 Multical, WTW) gemessen. Als Messlösung diente 20 g Boden, der in 200 ml CaCl_2 -Lösung eingewogen wurde. Die Messelektrode wurde mit Aqua dest. abgespült und in die Messlösung eingetaucht. Danach wurde eine stabile Anzeige abgewartet und der pH-Wert abgelesen.



Abb. 18: Einbringung der mit den Prüforganismen kontaminierten Keimträger in ca. 5 cm Bodentiefe der jeweils gekalkten Versuchsflächen



Abb. 19: Fräsen der Versuchsflächen bis ca. 15 cm Bodentiefe zur Realkalisierung des Bodens nach Ende der Versuche

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Ergebnisse der Laborversuche

3.2.1.1 Tenazität im autoklavierten und nicht autoklavierten Boden

Es wird ersichtlich, dass bei 65 °C die Anzahl von *Enterococcus faecalis* in autoklaviertem Boden einer schnelleren Reduktion unterliegt als in nicht autoklaviertem Boden. Das lässt den Schluss zu, für die weiteren Tenazitätsversuche, wenn immer möglich, gewachsenen Boden zu verwenden, was auch im weiteren Verlauf der Versuche geschehen ist.

Aus Tabelle 4 wird die Tenazität der *Enterococcus faecalis* in einem autoklavierten und nicht autoklavierten Boden bei Erhitzung im Wasserbad ersichtlich.

Tab. 4: Konzentrationen überlebender *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen Einwirkzeiten im Wasserbad bei 65 °C und TS-Gehalt von 85 % mit autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden. Angaben in log₁₀ je KBE/g

Boden	Konzentration nach verschiedenen Einwirkzeiten			
	0 min	10 min	20 min	30 min
autoklaviert	2,4E + 06	2,4E + 06	4,3E + 04	2,4E + 04
nicht autokl.	2,4E + 06	8,6E + 06	1,8E + 07	1,8E + 07

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden autokl.: autoklaviert

TS: Trockensubstanz Temp.: Temperatur

3.2.1.2 Tenazität bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten

Die Ergebnisse dieser Voruntersuchung sind in der Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt. Bei der Prüftemperatur von 65 °C lässt sich bei beiden geprüften TS-Gehalten eine Inaktivierungskinetik über den gesamten Prüfzeitraum feststellen (Tab. 5). Ohne dass die Ergebnisse statistisch abgesichert sind, lässt sich die Tendenz erkennen, dass die verschiedenen TS-Gehalte der Bodenproben keinen Einfluss auf die Tenazität der untersuchten *Enterococcus faecalis* auszuüben scheinen.

Tab. 5: Konzentrationen überlebender *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen Einwirkzeiten im Wasserbad bei 65 °C bei unterschiedlichem TS-Gehalt des Bodens. Angaben in log₁₀ je KBE/g

TS-Gehalt des Bodens	Konzentration nach verschiedenen Zeiten			
	0 min	10 min	20 min	30 min
77 %	3,0E + 08	4,6E + 06	3,0E + 05	1,5E + 04
86 %	3,0E + 08	8,6E + 05	8,6E + 03	4,8E + 04

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden Temp.: Temperatur

TS: Trockensubstanz

3.2.1.3 Tenazität der Mikroorganismen auf den Keimträgern im Boden

Die Ergebnisse dieser Voruntersuchung sind in den Tabellen 6 bis 11 sowie in den Abbildungen 20 bis 22 zusammenfassend dargestellt. Die Tabellen 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen mit *Salmonella* Typhimurium. Es wird ersichtlich, dass bei 50 °C sich die Anzahl der Salmonellen innerhalb von 50 min reduziert, allerdings nur um 1-2 Zehnerpotenzen. In Proben mit höherem TS-Gehalt des Bodens ist der Keimgehalt höher (siehe Tab. 6). 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. 7). Abbildung 20 zeigt das Verhalten von *Salmonella* Typhimurium auf Keimträgern im Wasserbad bei 55 °C und TS-Gehalten des Bodens von 77 % bis 88 %. Es lässt sich eine geringe Tendenz ablesen, dass die verwendeten Salmonellen bei hohen TS-Gehalten eine höhere Tenazität aufweisen.

Tab. 6: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 50 °C. Angaben in log₁₀ je KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 87 %	Konzentration bei TS 76 %
0	4,6E + 07	4,6E + 07
10	4,6E + 05	4,6E + 07
20	4,6E + 07	4,6E + 07
30	4,6E + 07	4,6E + 06
40	4,6E + 06	8,6E + 05
50	4,6E + 06	8,6E + 05

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension Temp.: Temperatur

TS: Trockensubstanz

Tab. 7: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 55 °C. Angaben in log₁₀ je KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 88 %	Konzentration bei TS 77 %
0	8,6E + 07	8,6E + 07
10	4,6E + 06	4,6E + 05
20	8,6E + 05	3,0E + 05
30	8,6E + 04	3,0E + 05
45	4,6E + 05	8,6E + 04
60	4,6E + 04	8,6E + 03

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension Temp.: Temperatur
 TS: Trockensubstanz

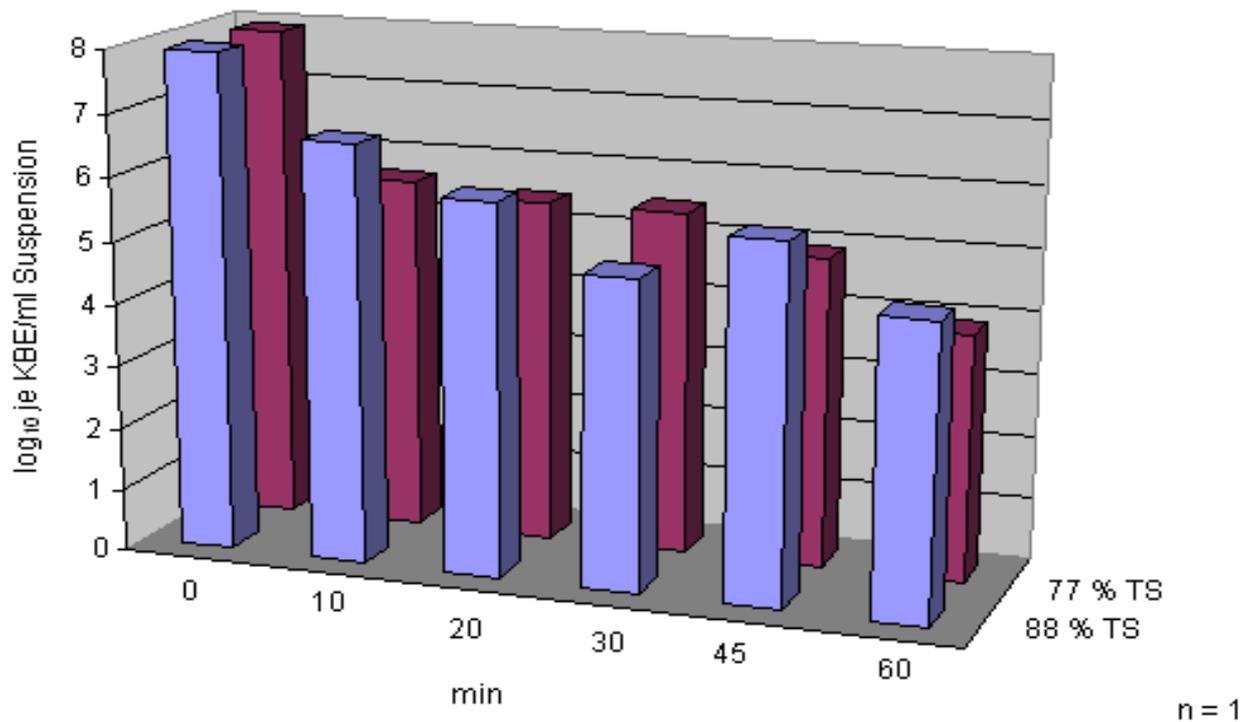


Abb. 20: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ in KBE/ml Suspension bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 55 °C (Tab. 7)

Die Tabellen 8, 9 und 10 zeigen die Ergebnisse der Tenazitätsprüfung mit *Enterococcus faecalis* auf Keimträgern 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 verschiedenen TS-Gehalten sind die Unterschiede im Überlebensverhalten gering (Tab. 8 und 9). Es wurden in etwa vergleichbare Ergebnisse dokumentiert. Nach 30 Minuten reduzierte sich die Zahl von *Enterococcus faecalis* um 4 Zehnerpotenzen, diese Werte wurden auch bei einer Erhitzung über eine Stunde lang festgestellt (Tab. 8 und 9).

Tab. 8: Konzentrationen überlebender *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 65 °C. Angaben in log₁₀ je KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 87 %	Konzentration bei TS 76 %
0	8,6E + 07	8,6E + 07
10	8,6E + 05	8,6E + 05
20	1,8E + 04	4,6E + 04
30	8,6E + 03	8,6E + 03
45	1,8E + 05	8,6E + 04
60	4,6E + 04	8,6E + 04

KBE: Koloniebildende Einheiten/ ml Suspension Temp.: Temperatur
TS: Trockensubstanz

Abb. 21 zeigt das Verhalten von *Enterococcus faecalis* auf Keimträgern im Wasserbad bei 65 °C und TS-Gehalten des Bodens von 76 % bis 87 %. Hier lässt sich keinerlei Tendenz hinsichtlich höherer Tenazität bei hohen TS-Gehalten erkennen.

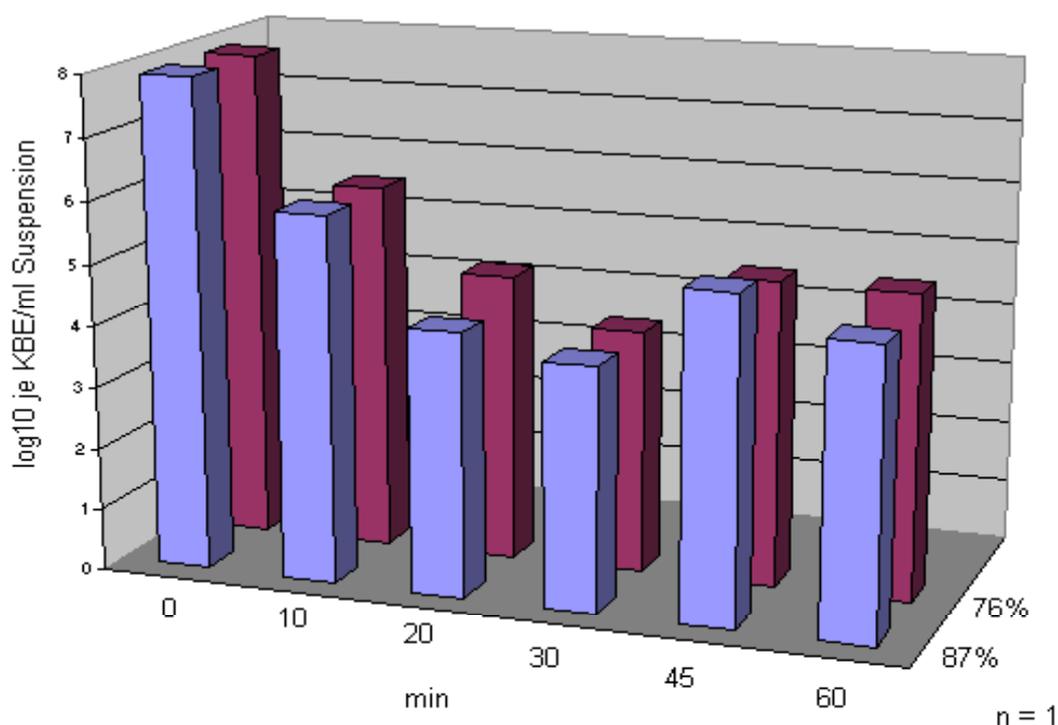


Abb. 21: Konzentrationen überlebender *Enterococcus faecalis* in KBE/ml Suspension bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 65 °C (Tab. 8)

Tab. 9: Konzentration überlebender *Enterococcus faecalis* verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 65 °C. Angaben in log₁₀ je KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 88 %	Konzentration bei TS 77 %
0	3,0E + 08	3,0E + 08
10	8,6E + 05	2,3E + 05
20	8,6E + 03	3,0E + 05
30	4,8E + 04	1,5E + 04

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension Temp.: Temperatur
 TS: Trockensubstanz

Bei 70 °C konnten spätestens nach 20 min keine *Enterococcus faecalis* mehr nachgewiesen werden (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Konzentrationen überlebender *Enterococcus faecalis* bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 70°C. Angaben in log₁₀ je KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 88 %	Konzentration bei TS 75 %
0	2,4E + 06	2,4E + 06
10	n. n.	2,3E + 00
20	n. n.	n. n.
30	n. n.	n. n.

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension n. n.: nicht nachgewiesen
 TS: Trockensubstanz Temp.: Temperatur

Die Tabelle 11 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 den hohen TS-Gehalten innerhalb der Erwärmungsphase 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 (siehe Tab. 11 und Abb. 22).

Tab. 11: Konzentrationen überlebender *E. coli* bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 50°C. Angaben in log₁₀ je KBE/ml

Zeit (min)	Konzentration bei TS 86 %	Konzentration bei TS 75 %
0	8,6E + 05	8,6E + 05
10	8,6E + 05	8,6E + 03
20	1,8E + 06	8,6E + 03
30	8,6E + 05	4,6E + 04
40	4,6E + 05	8,6E + 03
50	4,6E + 05	8,6E + 03

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension Temp.: Temperatur
 TS: Trockensubstanz

Abb. 22 zeigt das Verhalten von *E. coli* auf Keimträgern im Wasserbad bei 50 °C und TS-Gehalten des Bodens von 75 % und 86 % in einer graphischen Übersicht, die auf eine Tendenz zu höherer Tenazität dieses Prüfkeims bei hohen TS-Gehalten hinweist.

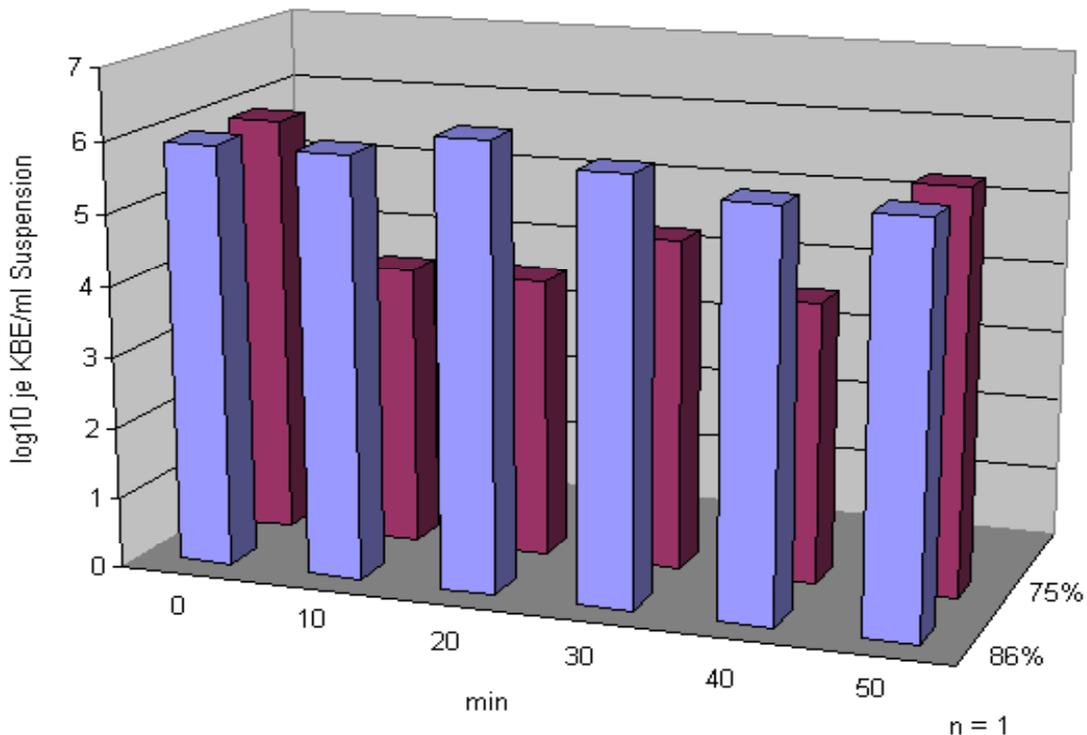


Abb. 22: Konzentrationen überlebender *E. coli* in KBE/ml Suspension bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 50 °C (Tab. 11)

3.2.2 Ergebnisse der halbtechnischen Versuche zur Bodendesinfektion mit Kalk

3.2.2.1 Versuche mit Kalk in verschiedenen Zubereitungsformen

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle 12 dargestellt. Der qualitative Nachweis der Salmonellen nach dem ersten, dritten und sechsten Tag der Untersuchung zeigt, dass die Anwendung des Kalks zur Desinfektion des Bodens in Pulverform ohne zusätzliche Wasserzufuhr nicht so effektiv ist wie mit Wasserzusatz. Beim Einsatz der 50 %-igen Kalkmilch konnten *Salmonella* Typhimurium am 1. Tag nur in einer Probe, am 3. Tag dann wieder in beiden Parallelproben nachgewiesen werden. Am 6. Untersuchungstag waren beide Proben negativ. Bei der Anwendung von Branntkalk (gekörnt und in Pulverform) als auch beim Kalkhydrat konnten *Salmonella* Typhimurium in allen Proben, auch nach Tagen Einwirkzeit nachgewiesen werden. Der TS-Gehalt des Bodens war an den Stellen am höchsten, an denen Kalk als Pulver angewandt wurde. An den Stellen des Bodens, an denen

Ca(OH)₂ als Kalkmilch eingemischt wurde, war der TS-Gehalt aufgrund des hohen Wassergehaltes am niedrigsten.

Es konnte somit die Erkenntnis gewonnen werden, dass Kalkmilch am besten zur Reduktion von Salmonellen geeignet ist, weil nach Anwendung des Kalks als Kalkmilch nach 6 Tagen der Untersuchung keine Salmonellen mehr qualitativ nachgewiesen werden konnten. Zur Optimierung des Vorgehens, sollte in einem weiteren Versuchsdurchgang (siehe 3.2.2.2) die Kalkmilch als Lösung mit verschiedenen Wassermengen hergestellt werden, um festzustellen, welche Proportionen Kalk zu Wasser sich auf eine Reduktion der Salmonellen am effektivsten auswirkten

Tab. 12: Qualitative Darstellung überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ bei der Anwendung von Kalk in Mengen von 38 g Kalk pro 1 kg Boden. Keimsuspension mit der Ausgangskeimzahl von 10⁸ KBE/ml

Einwirkzeiten	0. Tag (40 min)			1. Tag			3. Tag			6. Tag		
	S.	TS	pH	S.	TS	pH	S.	TS	pH	S.	TS	pH
Boden	n.d.	81 %	7,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Boden + CaO Pulver	++	85 %	12,7	++	86 %	n.d.	++	87 %	n.d.	++	87 %	n.d.
Boden + CaO gekörnt	++	84 %	12,9	++	85 %	n.d.	++	85 %	n.d.	++	86 %	n.d.
Boden + Ca (OH) ₂ Pulver	++	83 %	12,8	++	85 %	n.d.	++	85 %	n.d.	++	86 %	n.d.
Boden + 50 % Kalkmilch	++	71 %	12,8	+ n.n.	72 %	n.d.	++	73 %	n.d.	n.n.	74 %	n.d. n.n.

+ qualitativer Nachweis von Salmonellen in 50 g Boden
n. n.: nicht nachgewiesen S.: *Salmonella* Typhimurium
KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension
14,2 %-ige Kalkmilch

n. d.: nicht durchgeführt
TS: Trockensubstanzgehalt
pH: pH-Wert

3.2.2.2 Orientierungsversuche mit Kalkmilch in verschiedenen Konzentrationen

Die Ergebnisse dieser Orientierungsuntersuchungen sind in den Tabellen 13 und 14 sowie in der Abbildung 23 zusammengefasst. Im Versuch C, nach Anwendung einer 14,2 %-igen Kalkmilch und einem erreichten pH-Wert von 13 im Boden, konnten *Salmonella* Typhimurium nach 24 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden (Tab. 13). Im Versuch D, bei der Anwendung einer 11,1 %-igen Kalkmilch, waren *Salmonella* Typhimurium gegenüber der Kontrollproben nach 24 Stunden um 1-2 Zehnerpotenzen reduziert. Am 3. Tag konnten sie

nicht mehr nachgewiesen werden (siehe Tab. 13). Im Versuch B, beim Einsatz einer 20 %-igen Kalkmilch und bei einem pH-Wert von 12,9 wurde die Anzahl KBE von *Salmonella* Typhimurium unter die Nachweisgrenze reduziert (siehe Tab 13). Im Versuch A, beim Einsatz einer 33,33 %-igen Kalkmilch, konnten *Salmonella* Typhimurium am. 1 Tag in Keimzahlen zwischen > 02 bis $7,5E + 03$ KBE/g Boden nachgewiesen werden. Am 3. Tag war *Salmonella* Typhimurium nur in einer Probe an der Nachweisgrenze nachweisbar, während am 6. Tag nur eine Probe negativ war und in zwei Proben *Salmonella* Typhimurium bei $4,6E + 02$ KBE/g Boden nachweisbar waren (Tab. 13).

Der pH-Wert betrug 12,9 bis 13,0 und der TS-Gehalt 79 %. Der TS-Gehalt in den Versuchsansätzen (Versuch A-D) stieg auf 79 % (Versuch A), auf 70 % (Versuch B), auf 69 % (Versuch C) bzw. auf 79 % (Versuch D). Die Messwerte sind im Einzelnen in Tab. 14 zu finden. Es zeigt sich, dass neben der Kalkkonzentration auch die Wassermenge, die mit dem Kalk auf den Boden kommt, einen Einfluss auf die bakterizide Wirksamkeit in der Matrix hat.

Tab. 13: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ bei der Anwendung von Kalkmilch; 38 g Kalk pro 1 kg Boden mit einem TS-Gehalt von 81 %; pH-Wert des Bodens: 7,8. Keimsuspensionsversuch. Angaben in log₁₀ je KBE/g

Einwirkzeiten	0		1		3		6	
	S	pH	S	pH	S	pH	S	pH
Kontrolle	4,3E+04 4,6E+06 4,6E+06	n. d.	n. d.		n. d.		n. d.	
Median	4,6E+06							
33 % Kalkmilch (1 + 1)* Versuch A	n. d.	13,2	6,1E+02 1,1E+03 7,5E+03	12,8	n. n. n. n. 3,6E+00	12,9	n. n. 4,6E+02 4,6E+02	12,9
Median	n. d.		1,1E+03	n. d.	0	n. d.	4,6E+02	
20 % Kalkmilch (1 + 2) Versuch B	n. d.	13,2	1,1E+03 4,3E+03 4,3E+04	12,8	2,3E+01 6,1E+02 9,2E+02	12,9	n. n. n. n. n. n.	12,9
Median	n. d.		4,3E+03	n. d.	6,1E+02	n. d.	0	n. d.
14,2 % Kalkmilch (1 + 3) Versuch C	n. d.	13,1	n. n. n. n. n. n.	12,9	n. n. n. n. n. n.	13,0	n. n. n. n. n. n.	13,0
Median	n. d.		0	n. d.	0	n. d.	0	n. d.
11,1 % Kalkmilch (1 + 4) Versuch D	n. d.	13,1	2,4E+02 9,3E+02 4,3E+03	13,0	n. n. n. n. n. n.	13,0	n. n. n. n. n. n.	13,0
Median	n. d.		9,3E+02	n. d.	0	n. d.	0	n. d.

*eine Volumenmenge Kalk mit einer Volumenmenge Wasser

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden n. n.: nicht nachgewiesen

S.: *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ n. d.: nicht durchgeführt

TS. Trockensubstanzgehalt

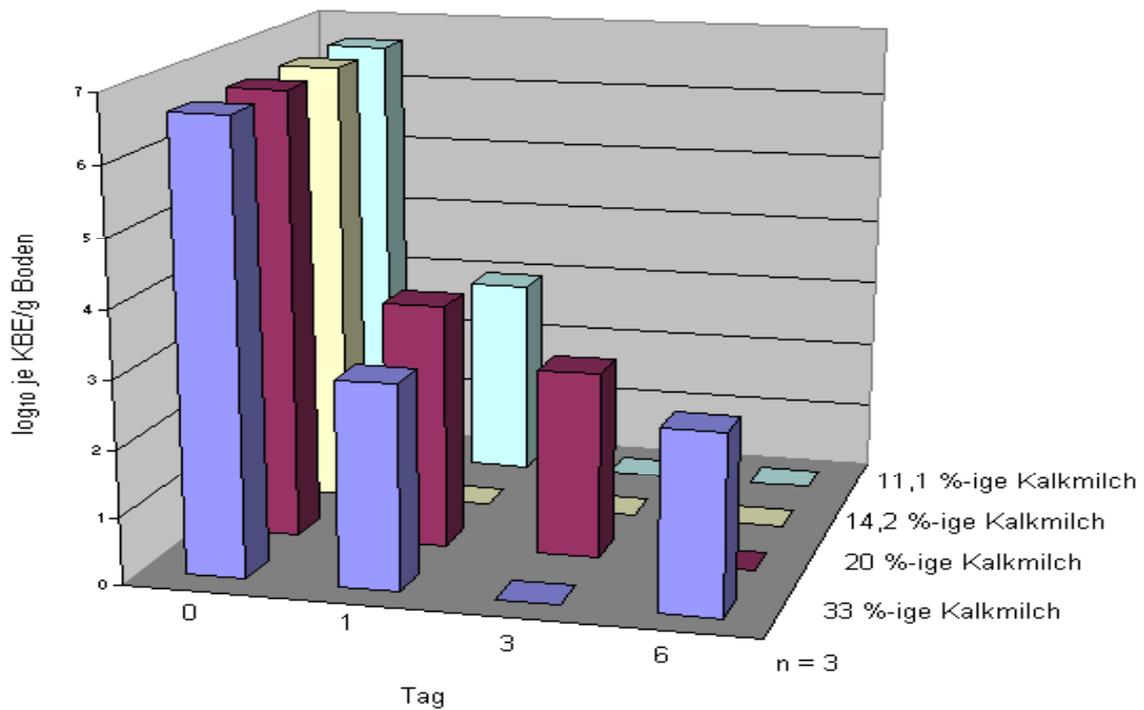


Abb. 23: Darstellung der Medianwerte überlebender *Salmonella* Typhimurium im Bo in KBE/g Boden den bei der Anwendung von Kalkmilch; 38 g Kalk pro 1 kg Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten (Tab. 13)

Tab. 14: Ergebnisse der Trockensubstanzgehalte des Bodens im 2. Versuch

Tag der Probenentnahme	TS-Gehalt des Bodens				
	Boden ohne Kalk	33 %-ige Kalkmilch	20 %ig-e Kalkmilch	14,2 %-ige Kalkmilch	11,1 %-ige Kalkmilch
0	80 %	75 %	71%	66 %	65 %
1	n. d.	78 %	72 %	68 %	66 %
3	n. d.	78 %	74%	68 %	68 %
6	n. d.	79 %	76 %	69 %	71 %

n. d.: nicht durchgeführt

3.2.2.3 Versuche mit 14,2 %-iger Kalkmilch (1,25 kg Ca (OH)₂/m²)

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 15 und 16 sowie in der Abbildung 24 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 12,4 wird die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) der eingemischten Salmonellen schon nach 40 min um eine bis zwei Zehnerpotenzen im Vergleich zu den Kontrollproben reduziert. Bis zum 2. Tag nimmt die Keimzahl weiter ab und sinkt um zwei bis fünf Zehnerpotenzen. Anschließend steigt sie wieder um ein bis zwei Zehnerpotenzen an. Dabei blieb der pH-Wert nahezu unverändert zwischen 12,3 und 12,4 (Tab. 15, Abb. 24).

Bei dem pH-Wert von 12,5 reduzierte sich die Anzahl der eingebrachten Enterokokken um zwei Zehnerpotenzen schon nach 40 min und sank bis zum 2. Tag weiter ab, um bis zum Ende der Einwirkungszeit ebenfalls wieder anzusteigen.

Insgesamt waren in diesem Versuch die Ergebnisse bei *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* nicht sehr unterschiedlich (Tab. 15).

Tab. 15: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ und Enterokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 14,2 %-igen Kalkmilch; 1,25 kg Kalkhydrat, Ca(OH)₂/m². (Der pH-Wert des nicht gekalkten Bodens vor dem Versuch: 7,8. Keimsuspensionsversuch)

Tag der Probeentnahme	0 Tag (40 min)		1 Tag		2 Tag				
	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.			
Kontrolle	1,1E+07	1,1E+07	2,4E+07	1,5E+07	1,4E+07	4,6E+06			
	1,1E+08	1,1E+07	4,6E+07	2,4E+07	4,6E+07	1,1E+08			
Median	6,0E+07	1,1E+07	3,5E+07	1,9E+07	3,0E+07	5,7E+07			
Versuch	2,4E+05	1,1E+05	9,3E+02	4,3E+03	2,4E+02	3,6E+00			
	4,6E+05	1,1E+05	9,3E+03	1,1E+04	2,4E+03	9,3E+02			
	1,1E+06	1,1E+05	4,6E+04	1,5E+04	1,1E+04	2,4E+03			
	1,1E+06	1,1E+05	9,3E+04	1,5E+04	2,4E+04	4,6E+04			
	1,1E+06	4,6E+05	1,5E+05	4,6E+04	1,1E+05	1,1E+06			
Median	1,1E+06	1,1E+05	4,6E+04	1,5E+04	6,7E+03	2,4E+03			
Tag der Probeentnahme	3 Tag		4 Tag		0	1	2	3	4
	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.	pH	pH	pH	pH	pH
Kontrolle	1,1E+07	1,1E+07	2,4E+07	1,5E+07	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	1,1E+08	1,1E+07	4,6E+07	2,4E+07	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Median	6,0E+07	1,1E+07	3,5E+07	1,9E+07	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Versuch	2,4E+05	1,1E+05	9,3E+02	4,3E+03	12,3	12,2	12,3	12,4	12,0
	4,6E+05	1,1E+05	9,3E+03	1,1E+04	12,4	12,3	12,3	12,4	12,1
	1,1E+06	1,1E+05	4,6E+04	1,5E+04	12,5	12,4	12,4	12,4	12,1
	1,1E+06	1,1E+05	9,3E+04	1,5E+04	12,5	12,4	12,4	12,4	12,2
	1,1E+06	4,6E+05	1,5E+05	4,6E+04	12,6	12,5	12,5	12,5	12,3
Median	1,1E+06	1,1E+05	4,6E+04	1,5E+04	12,5	12,4	12,4	12,4	12,1

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden S. Typh.: *Salmonella* Typhimurium
 Ent. f.: *Enterococcus faecalis*

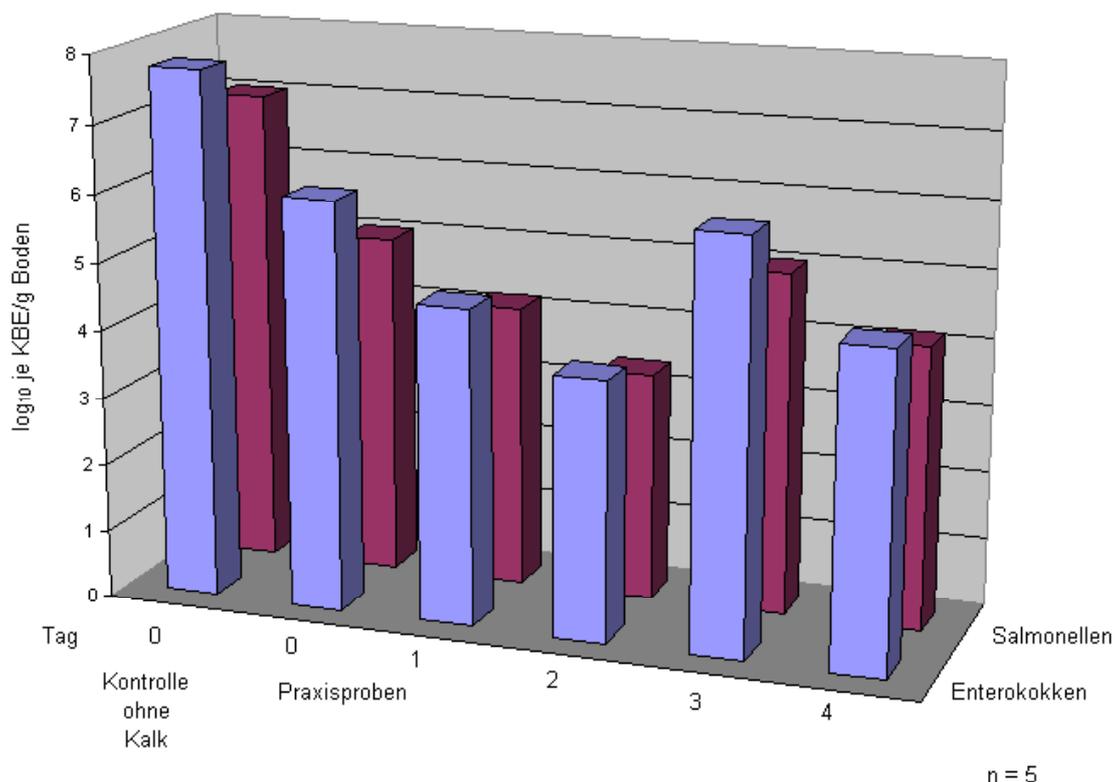


Abb. 24: Darstellung der Medianwerte der überlebenden *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ und *Enterococcus faecalis* in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 14,2%-igen Kalkmilch; 1,25 kg Kalkhydrat ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)/ m^2 Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten (Tab. 15)

Tab. 16: Ergebnisse der Trockensubstanzgehalte des Bodens im 3. Versuch

Tage der Probeentnahme	Boden ohne Kalk	Boden mit Kalk	pH-Wert
0	87 %	74,2 %	12,5
1	n. d.	73,7 %	12,4
2	n. d.	74,0 %	12,4
3	n. d.	74,2 %	12,4
4	n. d.	76,0%	12,1

n. d.: nicht durchgeführt

Bei Anwendung von 14,2 %-iger Kalkmilch, die einer Ausbringungsmenge von 1,25 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$ entspricht, und TS-Gehalten des Bodens zwischen 73,7 % und 76,0 %, liegen die pH-Werte zwischen 12,5 nach 40 min und 12,1 nach vier Tagen (Tab. 16). Trotz der relativ hohen pH-Werte waren Salmonellen sowie Enterokokken in Konzentrationen von 10^3 bis 10^5 KBE/g Boden noch nach dem 4. Versuchstag nachzuweisen.

3.2.2.4 Versuche mit 14,2 %-iger Kalkmilch (5,0 kg Ca (OH)₂/m²)

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 17; 18 und 19 sowie in der Abbildung 25 dargestellt.

Wie aus der Tabelle 18 zu entnehmen ist, werden im Bereich eines pH-Werts zwischen 12,8 und 12,9 die Salmonellen in vier von zehn untersuchten Proben schon am ersten Untersuchungstag in Ihrer Keimzahl bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Am zweiten Tag war dies in vier, am dritten Tag in sieben Proben und am vierten Tag in allen zehn untersuchten Proben der Fall (Abb. 25).

Die Enterokokken werden lediglich in einer von zehn untersuchten Proben am ersten Untersuchungstag bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Am zweiten Tag konnten in drei und am dritten Tag in acht Proben keine Enterokokken nachgewiesen werden. Am vierten Untersuchungstag waren nur noch in zwei von zehn untersuchten Proben Enterokokken in der Größenordnung von $3,6 \times 10^0$ KBE/g Boden nachzuweisen (Tab. 17, Abb. 25). Die Enterokokken wurden damit in einer Größenordnung von bis zu 7 Zehnerpotenzen reduziert.

Tab. 17: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ und Enterokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 14,2 %-igen Kalkmilch; 5 kg Kalkhydrat, Ca(OH)₂/m²

Tag der Probeentnahme	0 Tag (30 min)		1 Tag		2 Tag				
	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.			
Kontrolle	7,5E+07	2,3E+07	4,3E+07	1,5E+07	1,4E+07	4,6E+06			
	7,5E+07	3,5E+07	4,3E+07	2,4E+07	4,6E+07	1,1E+08			
Versuch	7,5E+02	4,6E+03	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.			
	7,5E+02	2,3E+03	n. n.	3,6E+00	n. n.	n. n.			
	1,1E+03	4,3E+03	n. n.	4,3E+01	n. n.	n. n.			
	1,1E+03	4,3E+03	2,3E+01	4,6E+01	n. n.	1,5E+01			
	4,6E+03	4,6E+03	2,3E+01	2,4E+02	3,6E+00	4,3E+01			
			2,4E+02	2,4E+02	4,3E+01	4,3E+01			
			9,3E+02	4,6E+03	2,4E+02	2,4E+02			
			2,3E+03	4,6E+04	3,8E+02	1,1E+03			
			2,4E+04	1,1E+05	4,3E+02	1,5E+01			
					7,5E+02	3,8E+03			
Median	1,1E+03	4,3E+03	2,3E+01	2,4E+02	2,3E+01	2,9E+01			
Tag der Probeentnahme	3 Tag		4 Tag		0.	1.	2	3	4
	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.	pH	pH	pH	pH	pH
Kontrolle	4,6E+08	1,1E+07	4,3E+07	1,1E+06	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	4,6E+08	1,1E+07	7,5E+07	1,5E+06					
Versuch	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,8	12,8	12,7	12,8	12,8
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,8	12,7	12,8	12,8
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,8	12,7	12,8	12,8
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,8	12,7	12,8	12,8
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,9	12,7	12,8	12,8
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,9	12,7	12,8	12,8
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,9	12,8	12,8	12,8
	4,3E+01	n. n.	n. n.	n. n.	12,9	12,9	12,9	12,8	12,8
	4,3E+01	2,3E+01	n. n.	3,6E+00	12,9	12,9	12,9	12,8	12,8
	4,3E+02	2,4E+02	n. n.	3,6E+00	12,9	12,9	12,9	12,8	12,8
Median	0	0	0	0	12,9	12,9	12,7	12,8	12,8

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden n. n.: nicht nachgewiesen

S. Typh.: *Salmonella* Typhimurium Ent. f.: *Enterococcus faecalis*

Kontrolle*: Boden ohne Kalk

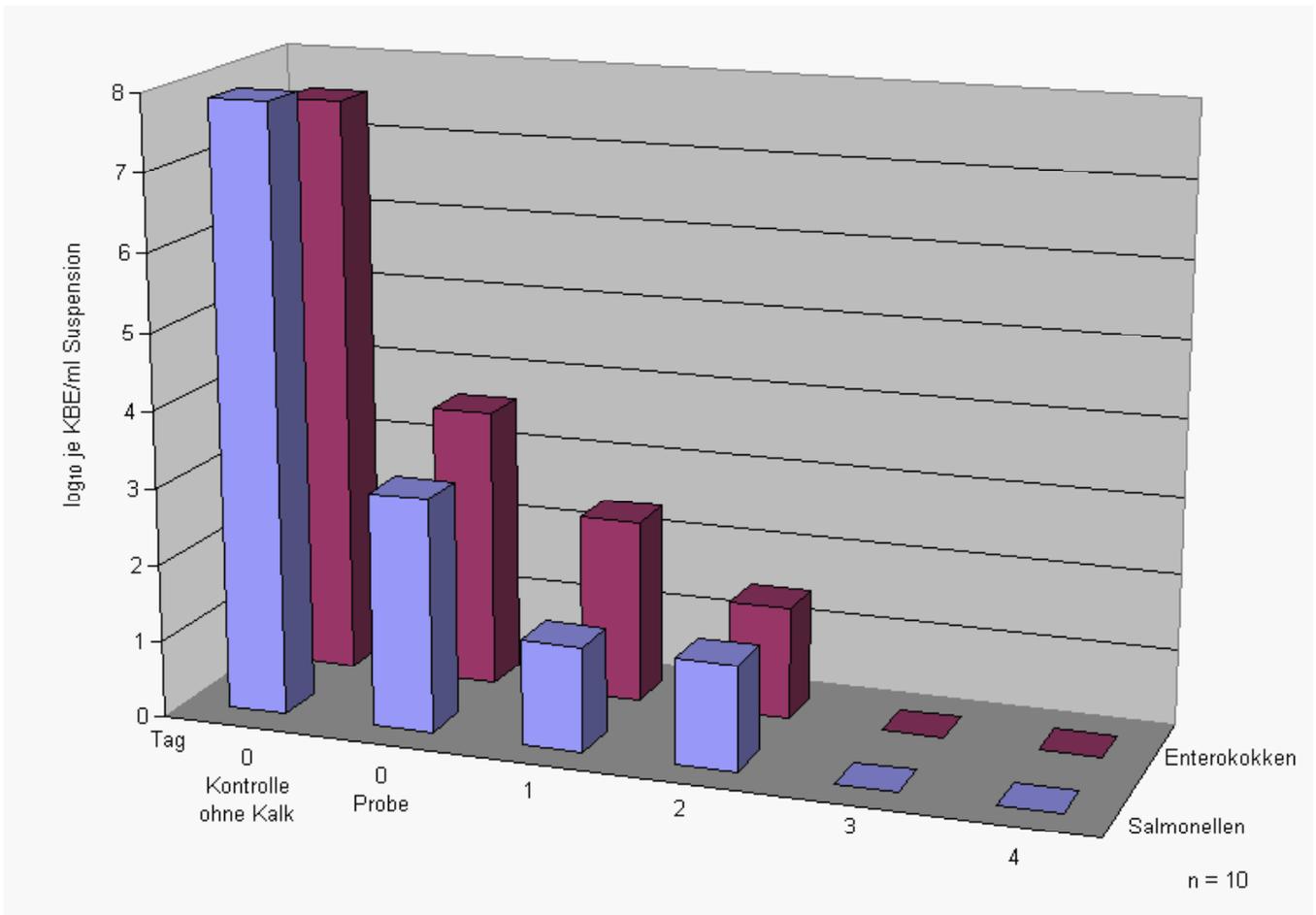


Abb. 25: Darstellung der Medianwerte der überlebenden *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ und *Enterococcus faecalis* in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 14,2%-igen Kalkmilch; 5 kg Kalkhydrat($\text{Ca}(\text{OH})_2$)/ m^2 Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten (Tab. 17)

Aus Tab. 18 werden die pH-Werte in unterschiedlichen Bodentiefen des 4. Versuches ersichtlich. Unter der Arbeitsschicht, also unterhalb von 10 cm, sank der pH-Wert von 12,7 auf 9,3. Die obere Bodenschicht wirkte wie ein Filter, der Kalkpartikel zurückhielt. Unter die Arbeitsschicht von 10 cm ist offensichtlich nur eine relativ geringe Menge Kalk durchgedrungen, was durch den geringeren pH-Wert tieferer Bodenschichten deutlich wird.

Tab. 18: Ergebnisse der pH-Messung des Bodens in unterschiedlichen Bodentiefen im 4. Versuch

pH des Bodens	
>10 cm Tiefe*	5 cm Tiefe
9,3	12,7
9,5	12,7
9,5	12,7
10,3	12,7
10,5	12,7

In der oberen Bodenschicht verändert sich bedingt durch die hohe zugegebene Flüssigkeitsmenge der TS-Gehalt nach unten. Der pH-Wert fällt bis zum 4. Tag nur unbedeutend von 12,9 auf 12,8 ab (Tab.19).

Tab. 19: Trockensubstanzgehalt des Bodens nach Ausbringung von 14,2 %-iger Kalkmilch in der Menge, so, dass 5 kg Kalkhydrat ($\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$) Boden eingearbeitet wurden

Tage der Probeentnahme	Boden ohne Kalk	Boden mit Kalk	pH-Wert
0	92 %	68 %	12,9
1	n. d.	69 %	12,9
2	n. d.	68 %	12,7
3	n. d.	69 %	12,8
4	n. d.	71 %	12,8

n. d.: nicht durchgeführt

3.2.2.5 Versuche mit 14,2 %-iger Kalkmilch (Vergleich 2,5 und 5,0 kg $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{m}^2$)

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 20 und in der Abbildung 26 dargestellt, die dazugehörigen pH- und TS-Werte sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

Bei der Anwendung einer Menge von Kalkmilch, die 2,5 kg Kalkhydrat/ m^2 entspricht, werden die Salmonellen bereits am 1. Tag bei zwei parallelen Ansätzen in zwei von zehn untersuchten Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Am 7. Tag ist dies in drei von zehn untersuchten Proben der Fall (siehe Tab. 20). In sieben von zehn untersuchten Proben werden am siebten Untersuchungstag die Salmonellen im Vergleich zu den Ausgangsproben

von 10^7 auf 10^2 KBE/g Boden und damit um fünf Zehnerpotenzen reduziert (Tab. 20, Abb. 26).

Bei der Anwendung von $5,0 \text{ kg Kalkhydrat/m}^2$ werden die Salmonellen bei zwei parallelen Ansätzen in sechs von zehn untersuchten Proben schon nach dem ersten Untersuchungstag und in acht von zehn untersuchten Proben am siebten Untersuchungstag in ihrer Keimzahl bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Am siebten Untersuchungstag werden Salmonellen in zwei von zehn untersuchten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben von 10^7 auf 10^1 KBE pro g Boden, also um sechs Zehnerpotenzen vermindert (Tab. 20, Abb. 26).

Bei der Anwendung von $2,5 \text{ kg Kalkhydrat/m}^2$ wird die Anzahl Enterokokken bereits am 1. Tag bei zwei parallelen Ansätzen in zwei von zehn untersuchten Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Am 7. Tag waren fünf von zehn untersuchten Proben negativ. Die Reduktionsrate betrug im Vergleich zu den Kontrollproben fünf Zehnerpotenzen (Tab. 20, Abb. 26).

Bei der Anwendung von $5,0 \text{ kg Kalkhydrat/m}^2$ werden die Enterokokken in zwei parallelen Ansätzen in sechs von zehn untersuchten Proben schon nach dem ersten Untersuchungstag bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Am siebten Tag ist dies in acht von zehn untersuchten Proben der Fall. In drei von zehn verbleibenden Proben ist eine Reduktion der Anzahl der Enterokokken im Vergleich zu den Kontrollproben von 10^7 auf 10^1 KBE/g Boden, also um sechs Zehnerpotenzen festzustellen (Tab. 20, Abb. 26).

Tab. 20: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ und Enterokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung von 14,2 %-iger Kalkmilch; 2,5 kg Kalkhydrat/m² und 5 kg Kalkhydrat/m². Angaben in KBE/g Boden

Tag der Probeentnahme	0 Tag (30 min)				1 Tag			
	S		E		S	S ₁	E	E ₁
Kontrolle	1,1E+07	1,1E+07	1,5E+07	4,3E+07	4,6E+07	1,1E+08	1,1E+07	1,1E+07
2,5 kg Ca(OH) ₂ /m ² Boden	1,4E+04	1,4E+04	7,5E+05	1,5E+06	n.n.	7,4E+00	n.n.	4,6E+02
	1,4E+04	1,4E+04	1,5E+06	1,5E+06	n.n.	1,1E+01	n.n.	4,6E+02
	4,6E+04	4,6E+04	1,5E+06	1,5E+06	3,0E+00	1,1E+01	9,2E+00	1,1E+03
	1,1E+05	1,1E+05	1,5E+06	1,5E+06	3,6E+00	7,2E+02	1,1E+02	1,1E+03
					7,4E+00	1,5E+03	1,1E+02	2,1E+03
Median	3,0E+04		1,5E+06		7,4E+00		2,8E+02	
5,0 kg Ca(OH) ₂ /m ² Boden	1,1E+03	1,1E+03	1,1E+04	1,1E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	4,6E+03	4,6E+03	1,1E+05	1,1E+05	n.n.	3,0E+00	n.n.	2,1E+01
	4,6E+04	4,6E+04	4,6E+05	4,6E+05	n.n.	1,1E+02	n.n.	1,1E+02
	7,5E+04	7,5E+04	1,1E+06	1,1E+06	n.n.	2,4E+02	n.n.	1,2E+02
					n.n.	7,5E+03	n.n.	1,1E+04
Median	2,5E+04		2,8E+05		0		0	
Tag der Probeentnahme	7 Tag				40 min	1 Tag	7 Tag	
	S		E		pH			
Kontrolle	2,4E+06		4,6E+06		n. d.			
2,5 kg Ca(OH) ₂ /m ² Boden	7,5E+06		1,1E+07					
	n.n.	7,4E+00	n.n.	3,0E+00	13,0	13,1	13,0	
	n.n.	1,1E+02	n.n.	9,2E+00	13,1	13,1	13,0	
	n.n.	1,1E+02	n.n.	4,3E+01	13,1	13,1	13,0	
	3,0E+00	1,1E+02	n.n.	2,4E+02	13,1	13,1	13,0	
3,0E+00	1,1E+02	n.n.	2,4E+02	13,1	13,1	13,0		
Median	5,2E+00		1,5E+00		13,1	13,1	13,0	
5,0 kg Ca(OH) ₂ /m ² Boden	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	13,1	13,1	13,1	
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	13,1	13,1	13,1	
	n.n.	n.n.	n.n.	3,0E+00	13,1	13,1	13,1	
	n.n.	1,1E+01	n.n.	3,0E+00	13,1	13,1	13,1	
	n.n.	1,1E+01	n.n.	2,3E+01	13,1	13,1	13,1	
Median	0		0		13,1	13,1	13,1	

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden n. n.: nicht nachgewiesen
 Typhimurium E.: *Enterococcus faecalis* n. d.: nicht durchgeführt
 E₁: Parallelansatz

S.: *Salmonella*
 S₁: Parallelansatz

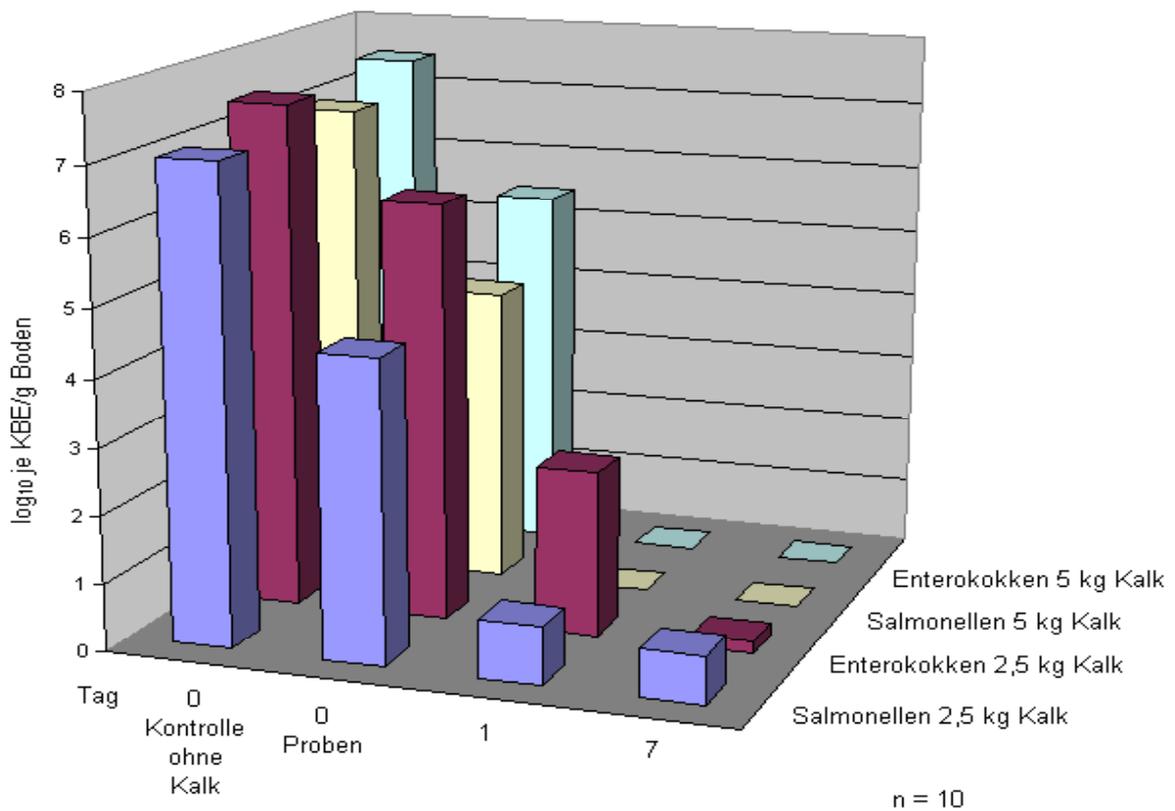


Abb. 26: Darstellung der Medianwerte der überlebenden *Salmonella Typhimurium* Typ „*Zoosal oral*“ und *Enterococcus faecalis* in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 14,2 %-igen Kalkmilch; 2,5 kg Kalkhydrat + 15 kg H₂O und 5,0 kg Kalkhydrat + 30 kg H₂O/m² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten (Tab. 20)

Wie aus der Tabelle 21 ersichtlich ist, verändern sich die TS-Gehalte des Bodens, entsprechend den zugegebenen Wassermengen, da sich das Wasser mit dem Kalk verbindet. Die pH-Werte bleiben über die gemessene Zeitdauer stabil.

Tab. 21: Ergebnisse der pH-Werte und der Trockensubstanzgehalte des gekalkten Bodens bei der Anwendung von 14,2 %-iger Kalkmilch; 2,5 kg Kalkhydrat/m² und 5 kg Kalkhydrat/m² (TS-Gehalt des Bodens ohne Kalk: 88 %)

Tage der Probeentnahme	pH- Wert		TS-Gehalt in %	
			Boden mit Kalk	
	bei 2,5 kg Kalk	bei 5 kg Kalk	bei 2,5 kg Kalk	bei 5 kg Kalk
0 (40 min)	13,0	13,1	71	67
	13,1	13,1		
	13,1	13,1		
	13,1	13,1		
	13,1	13,1		
1	13,1	13,1	72	71
	13,1	13,1		
	13,1	13,1		
	13,1	13,1		
	13,1	13,1		
7	13,0	13,1	77,5	71,5
	13,0	13,1		
	13,0	13,1		
	13,0	13,1		
	13,0	13,1		

n. d.: nicht durchgeführt

3.2.2.6 Versuche mit gemahlenem Branntkalk

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 22 und zusammenfassend in der Abbildung 27 dargestellt. Die Tabelle 23 enthält die dazugehörigen TS-Gehalte des Bodens.

Es zeigt sich, dass bei einem Trockensubstanzgehalt des Bodens von über 93 % und bei einem pH-Wert von 12,8 die Anzahl an Salmonellen bei den zwei parallelen Ansätzen in fünf von zehn untersuchten Proben schon nach dem ersten Untersuchungstag bis unter die Nachweisgrenze reduziert wird. Am 2. und 3. Untersuchungstag war jeweils nur eine Probe negativ. Am dritten Tag kam es wieder zu einem Anstieg der Anzahl überlebender Salmonellen, wobei am 4. Tag in allen zehn Proben wieder Salmonellen in einer Größenordnung zwischen 10¹ KBE/g Boden und 10⁵ KBE/g Boden nachgewiesen werden konnten. Der Medianwert lag dann bei 4,5 x 10³ KBE/g Boden (Tab. 22, Abb. 27).

Das Verhalten der eingebrachten Enterokokken war ähnlich. Am 1. Untersuchungstag sank ihre Anzahl in einer von zehn untersuchten Proben unter die Nachweisgrenze. Am 2., 3. und 4. Tag waren dann jeweils alle zehn Proben wieder positiv. Der Medianwert der Anzahl an Enterokokken betrug am 1. Tag 3,4 x 10³, am 2. Tag 2,1 x 10⁴, am 3. Tag 7,8 x 10² und am 4. Tag 7,8 x 10³ KBE/g Boden (Tab. 22, Abb. 27).

Tab. 22: Konzentrationen überlebender *S. Typhimurium* Typ „Zoosal oral“ und Entertokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk/m² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten

Tag der Probeentnahme	0 Tag ((30 min))		1 Tag		2 Tag				
	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.			
Kontrolle	1,1E+07 4,6E+07	1,1E+08 1,5E+07	1,1E+08 1,1E+08	4,3E+06 1,1E+07	4,6E+07 4,6E+07	4,6E+06 4,6E+06			
Versuch	n. n.	4,3E+01	n. n.	n. n.	n. n.	4,3E+01			
	n. n.	4,3E+01	n. n.	3,6E+00	2,4E+02	4,3E+03			
	4,3E+01	2,4E+02	n. n.	7,5E+02	2,1E+04	4,6E+03			
	9,3E+03	1,5E+05	n. n.	2,3E+03	2,3E+04	1,1E+04			
	1,1E+06	1,1E+06	n.n.	2,3E+03	2,4E+04	2,1E+04			
			7,4E+01	4,6E+03	4,6E+04	2,1E+04			
			2,4E+03	2,3E+04	4,6E+04	4,6E+04			
			9,3E+03	2,3E+04	1,1E+05	1,1E+05			
			4,3E+05	4,6E+04	1,1E+05	1,1E+05			
Median	4,3E+01	2,4E+02	3,7E+01	3,4E+03	3,5E+04		2,1E+04		
Tag der Probeentnahme	3 Tag		4 Tag		0	1	2	3	4
	S. Typh.	Ent. f.	S. Typh.	Ent. f.	pH	pH	pH	pH	pH
Kontrolle	4,3E+06 1,5E+07	1,1E+05 1,1E+06	4,6E+06 4,6E+07	2,4E+06 4,6E+07	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Versuch	n.n.	3,6E+00	4,3E+01	2,4E+02	12,8	12,7	12,2	12,6	12,3
	2,3E+01	2,3E+01	9,3E+01	2,4E+02	12,8	12,8	12,7	12,7	12,7
	2,3E+02	2,4E+02	2,4E+02	7,5E+02	12,8	12,8	12,7	12,7	12,7
	2,4E+02	4,6E+02	2,4E+02	1,5E+03	12,8	12,8	12,7	12,7	12,7
	4,6E+02	4,6E+02	1,5E+03	4,6E+03	12,8	12,8	12,7	12,7	12,7
	9,3E+02	1,1E+03	7,5E+03	1,1E+04		12,8	12,8	12,8	12,8
	9,3E+02	4,6E+03	2,1E+04	1,5E+04		12,8	12,8	12,8	12,8
	1,1E+03	1,1E+04	4,6E+04	2,4E+04		12,8	12,8	12,8	12,8
	1,1E+04	1,1E+04	1,1E+05	4,6E+04		12,8	12,8	12,8	12,8
1,1E+04	1,1E+04	1,1E+05	1,1E+05		12,9	12,8	12,8	12,8	
Median	6,9E+02	7,8E+02	4,5E+03	7,8E+03	12,8	12,8	12,7	12,7	12,7

n. n.: nicht nachgewiesen

Kontrolle*: Boden ohne Kalk

S. Typh.: *Salmonella* Typhimurium

Ent. f.: *Enterococcus faecalis*

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden

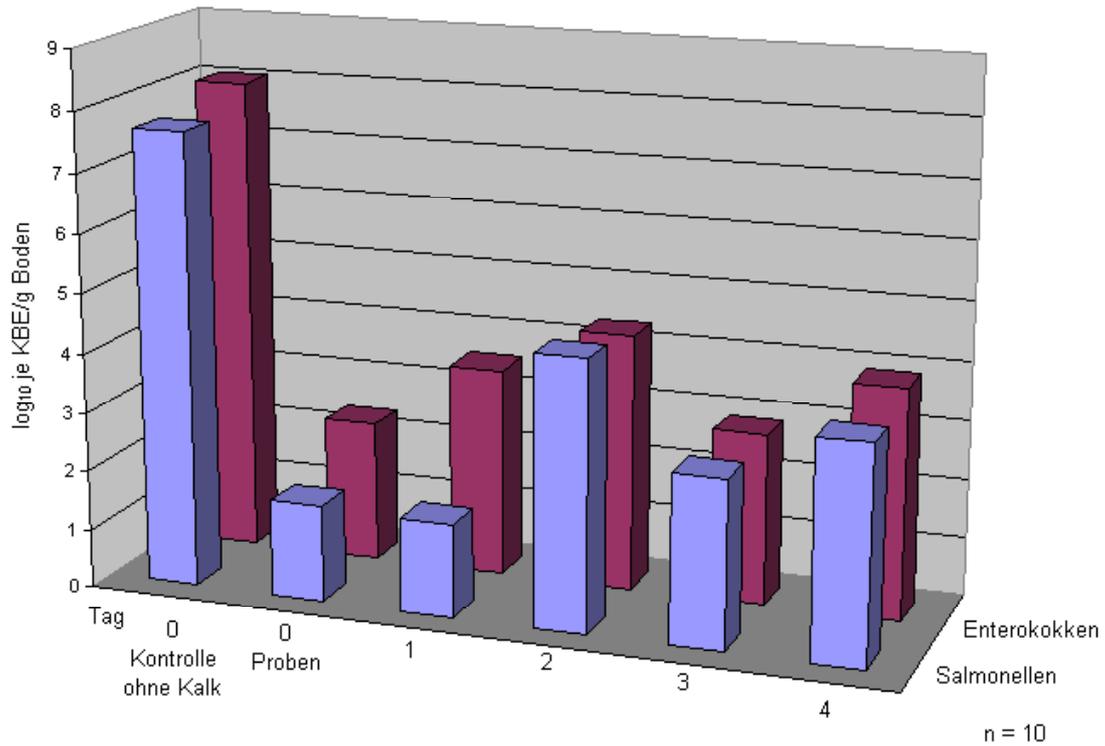


Abb. 27: Darstellung der Medianwerte der überlebenden *Salmonella Typhimurium* Typ „Zoosa loral“ und *Enterococcus faecalis* in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk/m² Boden (Tab. 22)

Der TS-Gehalt des behandelten Bodens veränderte sich gegenüber der Kontrolle nur unbedeutend und blieb über die gesamte Versuchsdauer im Bereich zwischen 88,9 % und 93,6 % wie der Tabelle 23 zu entnehmen ist.

Tab. 23: Ergebnisse der Trockensubstanzgehalte des Bodens.
Kalkmenge: 3,2 kg Branntkalk/m² Boden

Tag der Probeentnahme	TS-Gehalt in (%)	
	Boden ohne Kalk	Boden mit Kalk
0	89,3	88,9
1	n. d.	90,3
2	n. d.	93,1
3	n. d.	93,1
4	n. d.	93,6

n. d.: nicht durchgeführt

3.2.2.7 Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten zwischen 58,9 % und 90,9 %

Die Ergebnisse der Tenazitätsversuche, die in diesem Fall nur mit *Salmonella* Typhimurium durchgeführt wurden, sind in der Tabelle 24 im Einzelnen sowie in der Abbildung 28 zusammenfassend dargestellt. Die dazugehörigen TS-Gehalte des Bodens sind der Tabelle 25 zu entnehmen.

Nach einem Tag wird die Anzahl Salmonellen in den Bodenproben mit 90,9 %-igem TS-Gehalt in drei von zehn Proben im Vergleich zu den Ausgangsproben nicht oder nur unbedeutend reduziert und verbleiben im Bereich von 10^8 KBE/g Boden (Tab. 24). Der Medianwert liegt zu diesem Zeitpunkt zwischen $1,1 \times 10^6$ und $1,7 \times 10^4$ bzw. $2,2 \times 10^5$ KBE/g Boden (Tab. 24, Abb. 28).

Erst am 3. Tag nach Versuchsbeginn wird die Anzahl *Salmonella* Typhimurium im Boden bei einem TS-Gehalt von 58,9 % in fünf von zehn untersuchten Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. In den Bodenproben mit einem Trockensubstanzgehalt von 90,9 % bzw. 66,7 % überlebte *Salmonella* Typhimurium in relativ hohen Konzentrationen, nämlich bis zu $9,3 \times 10^4$ KBE/g Boden bei 90,9 % TS und bis zu $1,1 \times 10^6$ KBE/g Boden bei 66,7 %- TS (Tab. 24).

Am 7. Untersuchungstag war eine Inaktivierung der Prüfkeime bis unter die Nachweisgrenze in allen zehn untersuchten Proben nur bei einem TS-Gehalt von 58,9 % festzustellen. Bei einem TS-Gehalt des Bodens von 66,7 % waren in fünf von zehn untersuchten Proben keine Salmonellen mehr nachweisbar und in vier der verbleibenden Proben wurden die Salmonellen von 10^8 auf 10^1 KBE/g Boden reduziert sowie in einer Probe von 10^8 auf 10^2 KBE/g.

In den Proben mit 90,9%-igem Trockensubstanzgehalt des Bodens wurden dagegen zu diesem Zeitpunkt hohe Keimzahlen von *Salmonella* Typhimurium, bis 10^4 KBE/g Boden, festgestellt (Tab. 24). Diese Tendenzen sind auch deutlich zu erkennen (Abb. 28).

Tab. 24: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Kalkpulver, CaO/m² Boden bei der Befeuchtung mit Wasser (Trockensubstanzgehalt des Bodens: ca. 100 % vor der Befeuchtung)

Probeentnahme	0 Tag (30 min)			1 Tag		
TS-Gehalt	90,9 %*	66,7 %	58,9 %	90,9 %	66,7 %	58,9 %
pH-Wert	13,0	13,0	12,9	12,9	12,9	12,8
Kontrolle**	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+08	4,6E+07	9,2E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+08	1,1E+08	3,8E+07
Versuch	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+04	n. n.	6,4E+04
	n. d.	n. d.	n. d.	4,6E+04	4,6E+02	9,3E+04
	n. d.	n. d.	n. d.	9,3E+04	4,6E+02	4,6E+05
	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+05	9,3E+02	1,1E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	2,1E+05	1,1E+04	1,1E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	2,4E+05	2,4E+04	1,1E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	4,6E+05	7,5E+04	1,1E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+08	2,1E+05	1,1E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+08	2,4E+05	1,1E+06
	n. d.	n. d.	n. d.	1,1E+08	4,6E+05	4,6E+06
Median	n.d.	n. d.	n.d.	2,2E+05	1,7E+04	1,1E+06
Probeentnahme	3 Tag			7 Tag		
TS-Gehalt	90,9 %	66,7 %	58,9 %	90,9 %	66,7 %	58,9 %
pH-Wert	12,7	12,7	12,6	13,0	12,9	12,9
Kontrolle**	2,4E+07	2,4E+07	4,6E+0 ⁷	4,3E+07	2,3E+07	4,3E+07
	2,4E+07	2,4E+08	2,4E+0 ⁸	4,6E+07	4,3E+07	4,3E+07
Versuch	7,4E+00	3,0E+00	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
	1,5E+01	3,0E+00	n. n.	3,0E+00	n. n.	n. n.
	4,3E+02	3,6E+00	n. n.	6,2E+00	n. n.	n. n.
	9,3E+02	3,6E+00	n. n.	7,4E+00	n. n.	n. n.
	9,3E+02	7,4E+00	n. n.	9,3E+01	n. n.	n. n.
	9,3E+02	9,2E+00	3,6E+00	9,3E+01	3,0E+00	n. n.
	9,3E+03	4,3E+01	3,6E+00	9,3E+02	1,1E+01	n. n.
	7,5E+04	9,3E+01	9,2E+00	2,4E+03	2,1E+01	n. n.
	9,3E+04	1,5E+04	2,4E+01	1,4E+04	4,3E+01	n. n.
	9,3E+04	1,1E+06	4,3E+01	2,4E+04	2,4E+02	n. n.
Median	9,3E+03	8,3E+00	1,8E+00	9,3E+01	1,5E+00	n. n.

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden n. n.: nicht nachgewiesen n. d.: nicht durchgeführt *TS-Gehalt des Bodens nach der Befeuchtung mit Erregersuspension ist niedriger als 100 % ** Boden ohne Kalk

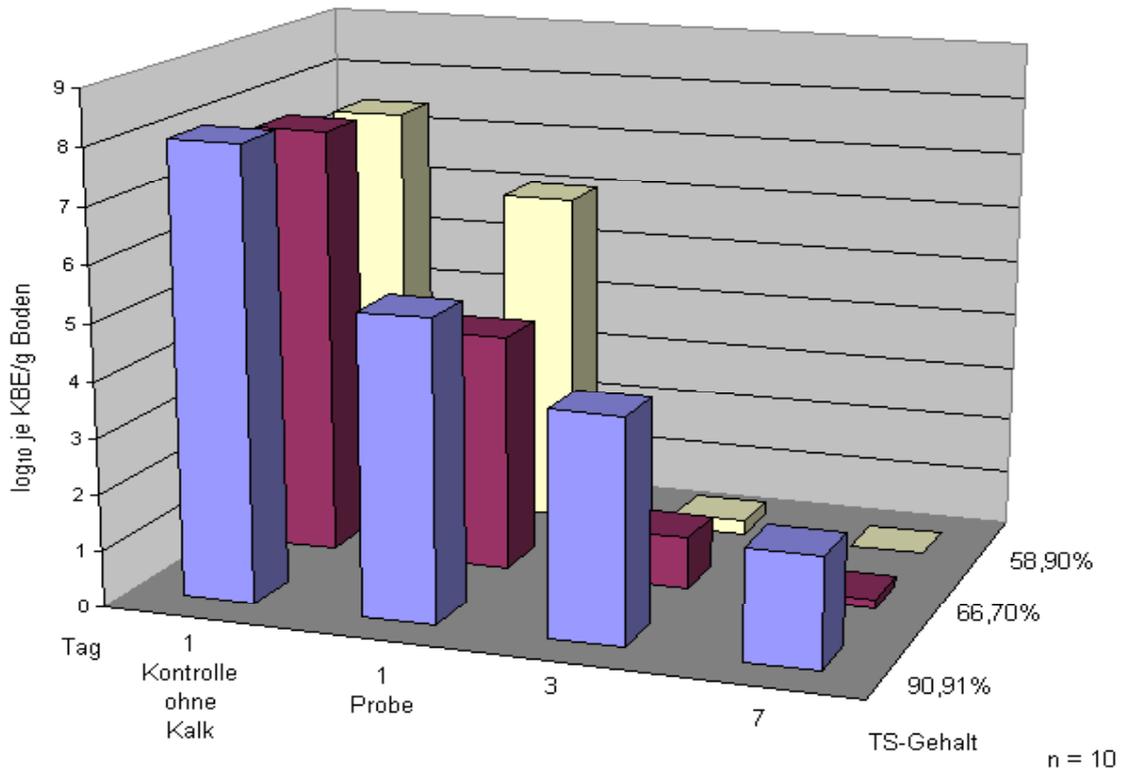


Abb. 28: Darstellung der Medianwerte der überlebenden *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO)/m² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten. Trockensubstanzgehalt des Bodens vor der Befeuchtung: ca. 100 % (Tab. 24)

Der Trockensubstanzgehalt des Bodens betrug vor dem Versuch beinahe 100 % bei einem pH-Wert von 7,8. Nach der Aufkalkung liegt der pH-Wert zwischen 12,6 und 13,0 und schwankt nur unbedeutend über die gesamte Versuchsdauer. Eine direkte Beziehung zwischen dem pH-Wert und der Inaktivierung der Salmonellen lässt sich nicht ablesen.

Tab. 25: Ergebnisse der pH-Werte und Trockensubstanzgehalte des Bodens bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO)/m², (Trockensubstanzgehalt des Bodens ca. 100 % vor der Befeuchtung)

Probe-entnahme	TS-Gehalt des Bodens in % nach H ₂ O-Zugabe		
	90,9 %	66,7 %	58,9 %
	pH Werte		
0 Tag	13,0	13,0	12,9
	13,0	13,0	12,9
1 Tag	12,9	12,9	12,8
	12,9	12,9	12,8
	13,0	12,9	12,8
	13,0	12,9	12,9
	13,0	12,9	12,9
3 Tag	12,6	12,6	12,6
	12,6	12,7	12,6
	12,7	12,7	12,6
	12,7	12,7	12,6
	12,7	13,0	12,7
7 Tag	12,8	12,1	12,9
	13,0	12,8	12,9
	13,0	12,9	12,9
	13,0	12,9	12,9
	13,0	12,9	13,0

3.2.2.8 Versuche mit frisch gelöschtem Branntkalk bei TS-Gehalten von 30 % und 50 %

Die Ergebnisse der Tenazitätsversuche, die in diesem Fall ebenfalls nur mit *Salmonella* Typhimurium durchgeführt wurden, sind in der Tabelle 26 im Einzelnen sowie in der Abbildung 29 zusammenfassend dargestellt.

Es zeigt sich, dass schon 24 h nach Versuchsbeginn die Anzahl *Salmonella* Typhimurium in acht von zehn untersuchten Proben beim 30 %-igen Trockensubstanzgehalt des Bodens und bei pH-Werten von 12,8 bis 12,9 bis unter die Nachweisgrenze reduziert wurde. In weiteren zwei Proben wurde die Anzahl der Salmonellen im Vergleich zu den Ausgangsproben von 10⁸ auf 3,0x10⁰ KBE/g Boden, also um sieben Zehnerpotenzen reduziert (Tab. 26).

Bei einem TS-Gehalt des Bodens von 50 % und pH-Werten zwischen 12,7 bis 12,9 wurde die Anzahl Salmonellen 24 h nach Versuchsbeginn in fünf von zehn untersuchten Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. In fünf weiteren Proben wurde eine Konzentration bis zu 10³ KBE/g Boden festgestellt (Tab. 26).

Am dritten Untersuchungstag war in allen zehn untersuchten Bodenproben bei einem TS-Gehalt des Bodens von 30 % und pH-Werten zwischen 12,7 und 12,8 die Zahl der Salmonellen bis unter die Nachweisgrenze abgesunken (Tab. 26).

Bei einem TS-Gehalt des Bodens von 50 % und einem pH-Wert von 12,7 wurde die Anzahl von *Salmonella* Typhimurium nach drei Tagen in sieben von zehn untersuchten Proben bis unter die Nachweisgrenze reduziert. In drei weiteren Proben wurden Konzentrationen zwischen 10^0 und 10^1 KBE/g Boden festgestellt, somit fand hier im Vergleich zur Ausgangskonzentration eine Reduktion um sieben Zehnerpotenzen statt. Erst am siebten Untersuchungstag waren in allen zehn untersuchten Bodenproben bei einem TS-Gehalt des Bodens von 50 % und einem pH-Wert von 12,7 keine Salmonellen mehr nachzuweisen (Tab. 26).

Tab. 26: Konzentrationen überlebender *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosal oral“ in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO) pro m² Boden mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (30 % und 50 % TS) nach unterschiedlichen Kontrollzeiten (in Tagen)

Probenahme	Bodenproben	TS	Probe-Nr.										Median	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0. Tag	Proben ohne kalk	30 %	1,1E+08	1,5E+08	n. d.	1,3E+08								
		50 %	1,1E+08	1,1E+08	n. d.	1,1E+08								
	pH		7,3	n. d.										
	Proben mit kalk	30 %	2,0E+03	1,1E+05	1,5E+05	4,6E+05	4,6E+05	n. d.	1,5E+05					
		50 %	2,4E+04	2,4E+04	1,1E+05	4,6E+05	1,1E+06	n. d.	1,5E+05					
pH	30 %	12,93	12,95	n. d.										
	50 %	12,92	12,95	n. d.										
1. Tag	Proben ohne kalk	30 %	1,1E+08	1,6E+08	n. d.	1,3E+08								
		50 %	4,6E+08	1,1E+09	n. d.	7,8E+08								
	Proben mit kalk	30 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	3,0E+00	3,0E+00	0	
		50 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	9,2E+00	1,1E+01	4,6E+02	1,1E+03	9,3E+03	4,6E+02	
	pH	30 %	12,8	12,8	12,8	12,9	12,9	n. d.						
		50 %	12,7	12,8	12,8	12,9	12,9	n. d.						
3. Tag	Proben ohne kalk	30 %	1,5E+08	1,6E+08	n. d.	1,5E+08								
		50 %	1,1E+08	1,5E+08	n. d.	1,3E+08								
	Proben mit kalk	30 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0
		50 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	3,0E+00	3,0E+00	1,1E+01	3,0E+00	
	pH	30 %	12,7	12,7	12,7	12,8	12,8	n. d.						
		50 %	12,7	12,7	12,7	12,7	12,7	n. d.						
7. Tag	Proben ohne kalk	30 %	1,5E+08	1,6E+08	n. d.	1,5E+08								
		50 %	1,1E+08	2,4E+08	n. d.	1,3E+09								
	Proben mit kalk	30 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0
		50 %	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0
	pH	30 %	12,7	12,7	12,7	12,7	12,7	n. d.						
		50 %	12,7	12,7	12,7	12,7	12,7	n. d.						

KBE: Koloniebildende Einheiten/g Boden
n.d.: nicht durchgeführt

n. n.: nicht nachgewiesen

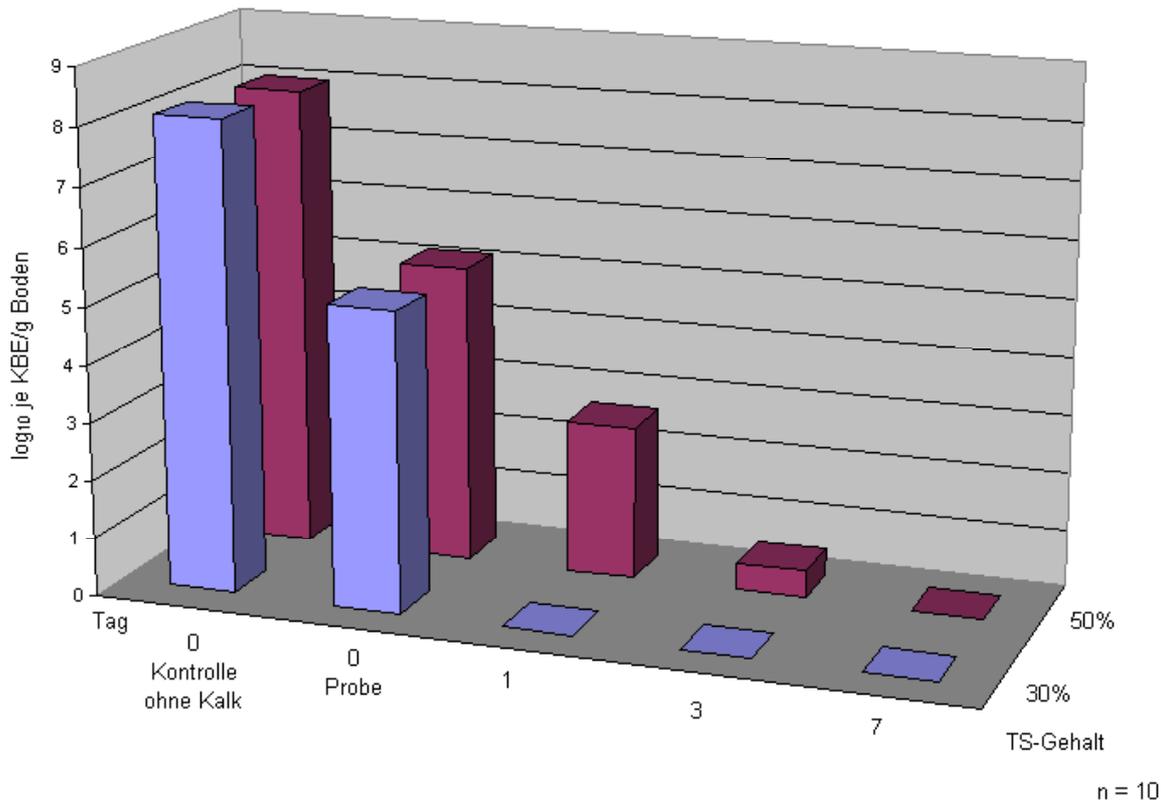


Abb. 29: Darstellung der Medianwerte der überlebenden *Salmonella Typhimurium* Typ „Zoosal oral“ in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO) pro m² Boden mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (30 % und 50 % TS) nach unterschiedlichen Kontrollzeiten (in Tagen) (Tab. 26)

3.2.3 Ergebnisse der Feldversuche

3.2.3.1 Ergebnisse der Versuche mit einem Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem mit Injektorbrenner

Die Ergebnisse der vier Feldversuche mit jeweils etwas anderen Versuchsbedingungen sind nachfolgend entsprechend der zeitlichen Reihenfolge der Durchführung, getrennt dargestellt.

3.2.3.1.1 1. Versuch

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 27 dargestellt und die dazugehörigen Messwerte für die erreichten Temperaturen befinden sich in der Tabelle 28.

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

Die in der Tabelle 27 dargestellten Keimzahlen von *Enterococcus faecalis* in KBE/ml Abschüttelflüssigkeit bewegen sich bei den Kontrollproben zwischen 10^8 und 10^9 KBE/ml (Mittelwert 10^9 KBE/ml). In sechs von insgesamt acht Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCl-Lösung verbracht wurden, war die Zahl von *Enterococcus faecalis* bis unter die Nachweisgrenze reduziert. In Relation zu den Kontrollproben hat eine Inaktivierung von 8 bis 9 Zehnerpotenzen stattgefunden. Von zwei Keimträgern, die sofort nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCl-Lösung verbracht wurden, konnten noch zwischen 10^2 und 10^3 KBE/ml *Enterococcus faecalis* nachgewiesen werden, was Reduktionsrate zwischen 6 und 7 Zehnerpotenzen entspricht.

Auf den sechs Keimträgern, die erst 24 h nach der Hitzeeinwirkung in das Erhaltungsmedium gelangten um zu prüfen, ob auch eine Aufarbeitung der Proben im Labor zu einem späteren Zeitpunkt möglich wäre, falls eine Einbringung in Trypton- NaCl- Lösung vor Ort nicht machbar ist, konnte auf vier Keimträgern kein Wachstum mehr nachgewiesen werden und von zwei Keimträgern waren jeweils noch $1,8 \times 10^2$ KBE/ml zurückzugewinnen (Tab. 27). Von den statistisch nicht absicherbaren Ergebnissen lässt sich eine Tendenz zur Feststellung höherer Inaktivierungsraten bei späterer Verarbeitung ablesen, weshalb eine sofortige Einbringung in die Abschüttelflüssigkeit, wenn immer möglich, in den weiteren Versuchen angestrebt wurde.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in dem 1. Versuch der als Probelauf zu betrachten ist, bei Temperaturen bis zu 90 °C (Tab. 28) eine Inaktivierung von mindestens sechs Zehnerpotenzen *Enterococcus faecalis* auf den Keimträgern bei einer Versuchsdauer von 40 min festzustellen ist.

Die Bodentemperatur betrug vor dem Versuch in 12 cm 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 28 zu entnehmen. Ergänzend ist noch festzuhalten, dass der Trockensubstanzgehalt: vor der Hitzebehandlung: 89 % betrug (Wassergehalt: 11 %) und nach der Hitzebehandlung bei 97 % (Wassergehalt: 3 %) lag.

Tab. 27: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* in KBE/ml Suspension im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem BVS-System

Probenart	Von Keimträgern zurückgewonnene <i>Enterococcus faecalis</i> (KBE/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrollproben (vor Erhitzung)	4,6E+08	8,6E+08	1,8E+0 ⁹	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Mittelwert	1,0E+09			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	2,6E+02	4,6E+03
Mittelwert							6,1E+02	

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension n. d.: nicht durchgeführt
n. n.: nicht nachweisbar

Tab. 28: 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 Hitze		
	1 min	15 min	40 min
Oberfläche	80	80	50
	82	80	n. d.
	93	80	n. d.
	94	n. d.	n. d.
Mittelwerte	87,2	80	50
2 cm	73	n. d.	n. d.
	78	n. d.	n. d.
	90	n. d.	n. d.
	90	n. d.	n. d.
Mittelwerte	82,75	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.
Mittelwerte	82	n. d.	60

n. d.: nicht durchgeführt

3.2.3.1.2 2. Versuch

Die Ergebnisse der bakteriologischen und virologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 31 und der Abbildung 30 dargestellt. Die dazugehörigen Trockensubstanzgehalte des Bodens befinden sich in Tabelle 29 und die Messwerte für die erreichten Temperaturen sind in der Tabelle 30 aufgelistet.

Bei 20 von insgesamt 24 mit *E. coli* kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, wurde die Anzahl der KBE bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Bei den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^5 und 10^6 KBE/ml, weshalb sich eine Reduktion der Anzahl von Prüfbakterien von 5 bis 6 Zehnerpotenzen ableiten lässt.

Bei 20 von insgesamt 24 mit Salmonellen kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der KBE bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen, lediglich bei einer Probe der „geschlossenen“ Keimträger war noch eine Anzahl von 10^1 KBE an *Salmonella* Typhimurium pro ml Schüttelflüssigkeit nachweisbar (Tab. 31). Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^3 und 10^4 KBE/ml, weshalb sich eine Reduktion der Anzahl von Prüfbakterien von 3 bis 4 Zehnerpotenzen ableiten lässt.

Bei 20 von insgesamt 24 mit *Enterococcus faecalis* kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der KBE bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^6 und 10^7 KBE/ml, wodurch sich eine Reduktion der Anzahl von Prüfbakterien von 6 bis 7 Zehnerpotenzen ableiten lässt. In Bodenproben aus der Bodenfläche, die mit den 3 Prüforganismen (*Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis*) kontaminiert wurden, war nach der Hitzebehandlung des Bodens keines dieser Mikroorganismen mehr nachweisbar (Tab. 31). Die Konzentration der Mikroorganismen im Boden (nach Einmischung) betrug: bei *E. coli*: $2,3 \times 10^4$ KBE/g Boden, bei Salmonellen: $2,3 \times 10^8$ KBE/g Boden und bei Enterokokken: $2,3 \times 10^7$ KBE/g Boden, somit ist hier von Reduktionsraten zwischen 4 und 8 Zehnerpotenzen auszugehen.

Bei 8 von insgesamt 12 mit *Bovinem Parvovirus* beaufschlagten Keimträgern, war deren Anzahl bis unter die Nachweisgrenze reduziert (Tab. 31, Abb. 30). Vier Keimträger wurden nicht mehr gefunden. Der Virusgehalt auf den Kontrollkeimträgern in der Rückgewinnungsflüssigkeit bewegte sich zwischen $10^{5,25}$ und $10^{4,5}$ KID₅₀ pro 100 µl, somit ist von einer entsprechenden Reduktion des Virusgehaltes auf den exponierten Keimträgern auszugehen.

Tab. 29: Darstellung der Trockensubstanzgehalte des Bodens vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner

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

TS: Trockensubstanzgehalt

Tab. 30: 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 Hitzeeinwirkung				
	5 sek	1 min	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
Mittelwert	84,4	88,3	85,9	63,2	47,7
Median	84,4	88,3	86,5	63,1	47,9
5 cm	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,6
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,7
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,8
	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,9
	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
Mittelwert	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	47,2
Median	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	46,9

n. d.: nicht durchgeführt

Die TS-Gehalte des Bodens vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner schwanken zwischen 81 % und 89 % (Tab. 29). In den oberen 2 cm des behandelten Bodens waren unmittelbar nach der Erhitzung Temperaturen zwischen 89,3 °C und 79,6 °C (Mittelwert: 84,4 °C) festzustellen. Innerhalb von 25 min sanken sie auf 62,4 °C bis 64,4 °C (Mittelwert: 63,2 °C) ab. Am Ende des Versuches nach 90 min lagen sie noch zwischen 47,1 °C und 48,3 °C (Mittelwert: 47,7 °C). Wegen fehlender Messwerte im Tiefenbereich von 5 cm kann hier keine Aussage zum Temperaturverlauf gemacht werden.

Tab. 31: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium in KBE/ml und *Bovinem Parvovirus* in KID₅₀ (in 100 µl) im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem BVS-System

Prüforganismus	Kontrollproben	Rückgewinnung von den Keimträgern qualitativ / quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		Offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	4,6E+05 8,6E+06	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.
		n. n.	n. n.	n. d.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4,6E+03 3,0E+04	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.
		n. n.	7,2E+01	n. d.
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	4,3E+06 4,6E+07	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.
		n. n.	n. n.	n. d.
<i>Bovines Parvovirus</i>	E+04,5 E+05,25	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 KBE: Koloniebildende Einheiten/1 ml Suspension

KID: Kultur Infektiöse Dosis/100 µl Suspension n. d.: nicht durchgeführt

Abbildung 30 zeigt das Verhalten von *E. coli*, *Salmonella* Senftenberg, *Enterococcus faecalis* und *Bovinen Parvoviren* auf Keimträgern im Boden vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner.

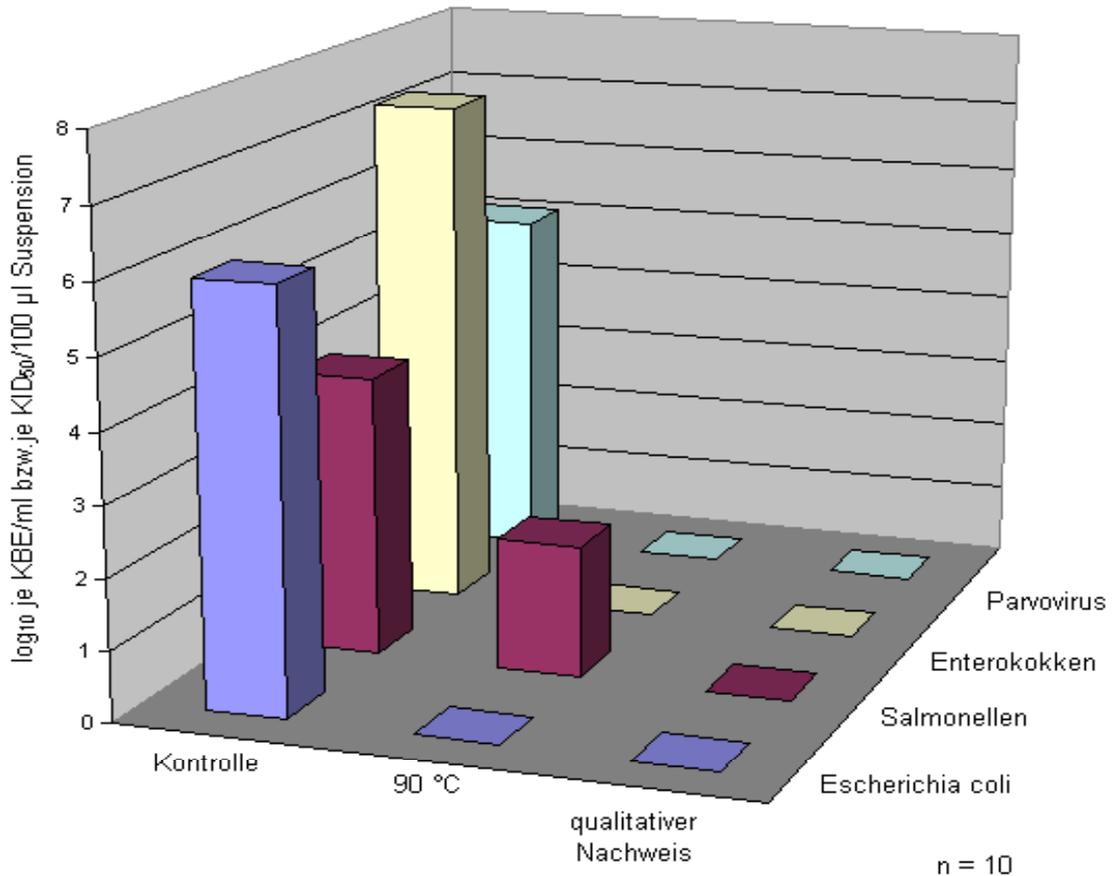


Abb. 30: Darstellung der Mittelwerte der überlebenden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium in KBE/ml Suspension und *Bovinen Parvovirus* (in KID₅₀ in 100 µl Suspension) im Boden vor und nach 90 min der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Tab. 31)

3.2.3.1.3 3. Versuch

Die Ergebnisse der bakteriologischen und virologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 33 dargestellt. Die dazugehörigen Messwerte für die erreichten Temperaturen sind in der Tabelle 32 aufgelistet.

Bei 16 von insgesamt 24 mit *E. coli* kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCl-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der KBE bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^5 und <3 KBE/ml.

Bei 16 von insgesamt 24 mit Salmonellen kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der KBE bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^3 und 10^6 KBE/ml.

Bei 16 von insgesamt 24 mit *Enterococcus faecalis* kontaminierten Keimträgern die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der KBE bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^4 und 10^5 KBE/ml. In Bodenproben aus der Bodenfläche, die mit den 3 Prüforganismen (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis*) kontaminiert wurden, war *Salmonella Typhimurium* nach der Hitzebehandlung des Bodens weder quantitativ noch qualitativ nachzuweisen. *Enterococcus faecalis* wurde dagegen qualitativ in einer von fünf untersuchten Proben nachgewiesen. *E. coli* wurde dagegen qualitativ in fünf von elf untersuchten Proben nachgewiesen. Die quantitative Untersuchung der fünf Bodenproben mit *E. coli* wies eine Größe von 10^0 KBE/g Boden auf. Bei neun von insgesamt zwölf mit *Bovinem Parvovirus*, beaufschlagten Keimträgern, war deren Anzahl auf $10^{1,0}$ bis $10^{2,0}$ KID₅₀ pro 100 µl reduziert (Tab. 33). Drei Keimträger wurden nicht mehr gefunden. Der Virusgehalt auf den Kontrollkeimträgern in der Rückgewinnungsflüssigkeit bewegte sich zwischen $10^{5,25}$ und $10^{4,5}$ KID₅₀ pro 100 µl.

In den oberen 2-5 cm des behandelten Bodens waren unmittelbar nach der Erhitzung Temperaturen zwischen 80 °C und 92 °C (Mittelwert: 87,8 °C) festzustellen. Innerhalb von 60 min sanken sie auf 64 °C ab (Tab. 32).

Tab. 32: Temperaturwerte in unterschiedlichen Bodentiefen bei 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.	72,2	n. d.	68	n. d.
	90	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	92	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Mittelwert	87,8	80	76,5	71,3	71,4	67,3	64

n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 33: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* in KBE/ml und *Bovinem Parvovirus* in KID₅₀ (in 100 µl) im Boden nach der Hitzeinwirkung mit dem BVS-System

Prüforganismus	Kontrollproben	Rückgewinnung von den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	8,6E+03 <E+02	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.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	3,2E+06 8,6E+03	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.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,6E+05 1,9E+04	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>Bovines Parvovirus</i>	E+05,25 ¹ E+05,7 ¹ E+04,5 ² E+05,25 ²	n. d.	E+01	n. d.
		n. d.	E+01,75	n. d.
		n. d.	E+00	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.
		n. d.	E+02	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt KBE: Koloniebildende Einheiten/1 ml Suspension

n.n.: nicht nachgewiesen KID: Kultur Infektiöse Dosis/100 µl Suspension

¹ kühl gelagert, im Labor belassen ² nicht kühl gelagert

+: qualitativer Nachweis möglich +*: Konz. 10⁰ KBE/g Boden

3.2.3.1.4 4. Versuch

Die Ergebnisse der bakteriologischen und virologischen Untersuchungen sind in der Tabelle 35 und der Abbildung 31 dargestellt. Die dazugehörigen Messwerte für die erreichten Temperaturen sind in der Tabelle 34 aufgelistet.

Bei 16 von insgesamt 24 mit *E. coli* kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten bei „offenen“ und „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen 10^4 und 10^5 KBE/ml, somit ist von einer Reduktionsrate von 4 bis 5 Zehnerpotenzen auszugehen.

Bei 16 von insgesamt 24 mit Salmonellen kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten bei 7 „offenen“ und 4 „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Von einem „offenen“ Keimträger waren noch $1,8 \times 10^4$ KBE/ml zurückzugewinnen, bei den restlichen „geschlossenen“ Keimträgern waren es noch zwischen $8,6 \times 10^2$ und $4,6 \times 10^4$ KBE/ml (Mittelwert: $2,3 \times 10^4$ KBE/ml). Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen $4,6 \times 10^7$ und $1,8 \times 10^8$ KBE/ml (Mittelwert: $1,1 \times 10^8$ KBE/ml).

Bei 16 von insgesamt 24 mit *Enterococcus faecalis* kontaminierten Keimträgern, die direkt nach der Hitzeeinwirkung in Trypton-NaCL-Lösung verbracht wurden, war die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten bei offenen „offenen“ und einem „geschlossenen“ Keimträgern bis unter die Nachweisgrenze gefallen. Von einem „offenen“ Keimträger waren noch $1,8 \times 10^4$ KBE/ml zurückzugewinnen, bei den restlichen „geschlossenen“ Keimträgern waren es noch zwischen $4,6 \times 10^2$ und $1,8 \times 10^4$ KBE/ml (Mittelwert: $3,4 \times 10^3$ KBE/ml). Auf den Kontrollkeimträgern lagen die Keimzahlen zwischen $8,6 \times 10^7$ und $8,6 \times 10^8$ KBE/ml (Mittelwert: $4,7 \times 10^8$ KBE/ml). In Bodenproben aus der Bodenfläche, die mit den drei Prüforganismen (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis*) kontaminiert wurden, war nach der Hitzebehandlung des Bodens *Escherichia coli* nicht mehr quantitativ nachzuweisen, aus einer von vier Proben gelang noch der qualitative Nachweis. Bei *Salmonella Typhimurium* waren bei negativem quantitativen Ergebnissen in allen vier Proben qualitative Nachweise möglich. Auch bei *Enterococcus faecalis* wurde eine quantitative Aussage hinsichtlich der in allen vier Proben qualitativ nachweisbaren Prüfbakterien nicht möglich. Bei sechs von insgesamt zwölf mit *Bovinem Parvovirus* beaufschlagten Keimträgern, war deren Anzahl auf $10^{0,75}$ bis $10^{1,5}$ KID₅₀ pro 100 µl reduziert (Tab. 36, Abb. 31). Sechs Keimträger wurden nicht mehr gefunden. Der Virusgehalt auf den Kontrollkeimträgern in der Rückgewinnungsflüssigkeit lag bei $10^{4,5}$ KID₅₀ pro 100 µl, somit kann von einer Reduktionsrate von mindestens 3 Zehnerpotenzen ausgegangen werden.

Der TS-Gehalt des Bodens lag vor der Durchtränkung mit der Bakteriensuspension bei 81 %, unmittelbar vor der Behandlung bei 65 % und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner bei 81 %. In den oberen 5 cm des behandelten Bodens waren unmittelbar nach der Erhitzung Temperaturen zwischen 75 °C und 78 °C (Mittelwert: 76,5 °C) festzustellen, innerhalb von 30 min sanken sie auf 60 °C. Am Ende des Versuches nach 60 min lagen sie noch zwischen 45 °C und 48 °C (Mittelwert : 47 °C). Für den Tiefenbereich von 10 cm sind nur wenige Messwerte vorhanden, hier liegen die Temperaturen unmittelbar nach der Behandlung zwischen 70 °C und 72 °C (Mittelwert 71 °C) und nach 10 min der letzten vorliegenden Messzeit noch zwischen 69 °C und 70 °C (Mittelwert 69,6 °C).

Tab. 34: 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.
Mittelwert	76,5	69	71,6	54	60	47 °C
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.
Mittelwert	71	n. d.	69,6	n. d.	n. d.	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 35: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* in KBE/ml und *Bovinem Parvovirus* in KID₅₀ in 100 µl im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit dem BVS-System

Prüforganismus	Kontrollproben	Rückgewinnung aus den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	4,6E+04 4,6E+05	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.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Salmonella Typhimurium</i>	4,6E+07 1,8E+08	1,8E+04	8,6E+02	+
		n. n.	4,6E+03	+
		n. n.	4,6E+03	+
		n. n.	4,6E+04	+
		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.
		n. d.	n. d.	n. d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,6E+07 8,6E+08	7,2E+01	4,6E+02	+
		n. n.	4,6E+02	+
		n. n.	4,6E+02	+
		n. n.	8,6E+02	+
		n. n.	1,8E+03	n. d.
		n. n.	1,8E+03	n. d.
		n. n.	1,8E+04	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>	E+04,5 E+04,5	n. d.	E+00,75	n. d.
		n. d.	E+00,75	n. d.
		n. d.	E+01	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.
		n. d.	n. d.	n. d.

n. n.: nicht nachgewiesen KID: Kultur Infektiöse Dosis/100 µl Suspension
 -: untere Nachweisgrenze +: Nachweis möglich
 KBE: Koloniebildende Einheiten/1ml Suspension n. d.: nicht durchgeführt

Abb. 31 zeigt das Verhalten von *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* auf Keimträgern im Boden vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner.

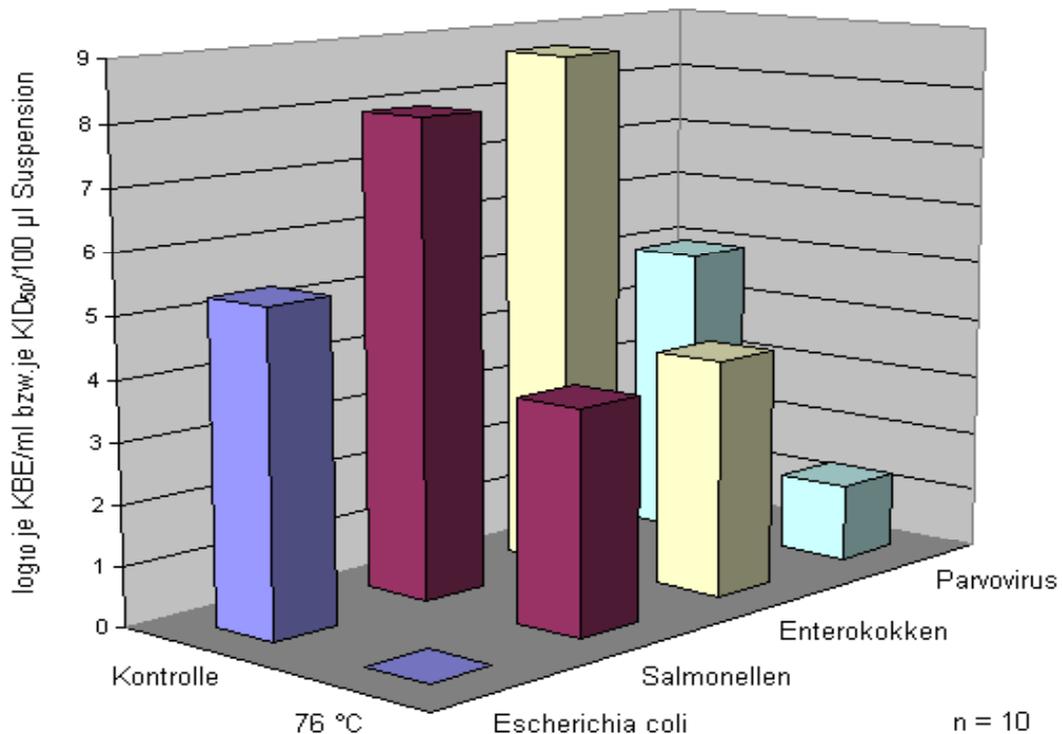


Abb. 31: Darstellung der Mittelwerte der überlebenden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium in KBE/ml Suspension und *Bovinem-Parvovirus* in KID₅₀/100 µl im Boden vor und nach 90 min der Behandlung mit dem Injektorbrenner (Tab. 35)

3.2.3.2 Ergebnisse der Versuche zum Einsatz von Solarfolien

Die Ergebnisse der vier Feldversuche mit jeweils etwas anderen Versuchsbedingungen sind nachfolgend entsprechend der zeitlichen Reihenfolge der Durchführung getrennt dargestellt.

3.3.3.2.1 1. Versuch

Vorauszuschicken ist, dass dies der erste Versuch dieser Art war, der im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführt wurde und in dem zunächst grundsätzliche Fragen geklärt werden sollten. Zunächst sollte in Erfahrung gebracht werden, ob sich durch die Folienabdeckung im Vergleich zu einer nicht folienabgedeckten Versuchsfläche die dort ausgebrachten Mikroorganismen in ihren Überlebenszeiten unterscheiden, und ob es

Unterschiede zwischen einer weißen und einer schwarzen Folienabdeckung hinsichtlich der Temperaturentwicklung und Inaktivierung der Prüfbakterien gibt.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind in den Tabellen 36 und 37 dargestellt. Die unter den Folien und im unbedeckten Boden in verschiedenen Tiefen gemessenen Temperaturen sind im Detail in der Tabelle 38 aufgelistet.

Nach 13 Tagen, dem ersten Probenahmetermin, betrug die Zahl von *Enterococcus faecalis* in der Abschüttelflüssigkeit vom Kontrollkeimträger $4,3 \times 10^6$ KBE/ml. Von dem im unbedeckten Boden und im Boden unter weißer Folie exponierten Keimträgern ließen sich noch zwischen 10^5 und 10^6 KBE/ml zurückgewinnen. Messwerte für die Keimträger unter der schwarzen Folie liegen für diese Einwirkungsdauer nicht vor. Für die beprobten Versuchsanordnungen konnte somit bei Bodentemperaturen zwischen 11 °C und 14 °C keine Reduktion der Anzahl der Prüfbakterien auf den Keimträgern festgestellt werden.

Nach der Einwirkungszeit von 22 Tagen waren von den Keimträgern im unbedeckten Boden noch zwischen $2,3 \times 10^5$ und $9,3 \times 10^5$ KBE/ml und von denen, die unter weißer Folie exponiert waren, waren noch zwischen $2,9 \times 10^5$ und $9,3 \times 10^5$ KBE/ml zu reisolieren. Von den Keimträgern im Boden unter der schwarzen Folie waren es noch zwischen $4,0 \times 10^0$ und $4,3 \times 10^4$ KBE/ml, ein Kontrollkeimträger wurde zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht.

Nach der Einwirkungszeit von 28 Tagen waren von den Keimträgern im unbedeckten Boden in einem Fall keine *Enterococcus faecalis* mehr nachzuweisen, während sich von dem zweiten Keimträger noch $9,3 \times 10^3$ KBE/ml zurückgewinnen ließen. Von den Keimträgern unter der schwarzen Folie waren noch zwischen $7,5 \times 10^3$ und $2,4 \times 10^5$ KBE/ml und beim Kontrollkeimträger $2,3 \times 10^6$ KBE/ml zu isolieren. Die Flächen unter der weißen Folie wurden ab dem 22. Tag nicht weiter beprobt.

Nach der Einwirkungszeit von 35 Tagen waren von den Keimträgern im unbedeckten Boden zwischen $4,3 \times 10^4$ und $1,5 \times 10^5$ KBE/ml zurückzugewinnen. Von beiden Keimträgern unter der schwarzen Folie waren noch $4,3 \times 10^2$ KBE/ml zurückzugewinnen, ein Kontrollkeimträger wurde nicht untersucht.

Nach der Einwirkungszeit von 41 Tagen waren von den Keimträgern im unbedeckten Boden zwischen $2,3 \times 10^2$ und $9,3 \times 10^4$ KBE/ml zurückzugewinnen. Von den Keimträgern unter der schwarzen Folie waren in einem Fall keine *Enterococcus faecalis* mehr nachzuweisen, während sich im zweiten Keimträger noch $9,2 \times 10^2$ KBE/ml zurückgewinnen ließen. Auch hier wurde kein Kontrollkeimträger gezogen.

Bei den mit *Salmonella* Typhimurium beaufschlagten Kontrollkeimträgern sank die Menge rückgewinnbarer Prüfbakterien schon nach 13 Tagen in den Bereich von 10^3 KBE/ml und lag zum letzten Probenahmetermin nach 35 Tagen zwischen $2,3 \times 10^1$ und $4,3 \times 10^1$ KBE/ml. Somit stand für eine Beurteilung einer Inaktivierung durch die Exposition unter der Folie kein

ausreichend großer Spielraum zur Verfügung, da entsprechende Gehalte auch bei den exponierten Keimträgern festzustellen waren (Tab. 37).

Die Temperaturen im Boden mit und ohne Folienbedeckung bewegten sich ohne Differenzierung nach der Versuchsanordnung und Bodentiefe wetterabhängig in Bereichen zwischen 9 °C (Minimum) und 56 °C (Maximum). Die Mittelwerte bewegten sich unmittelbar unter der Folie zwischen 33 °C und 35 °C. Ohne eindeutige Tendenz wurde der höchste Messwert von 56 °C allerdings unter der schwarzen Abdeckung gemessen (Tab. 38).

Tab. 36: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern im Boden mit Folienabdeckung zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* in KBE/ml (Anzahl der Mikroorganismen in der Suspension: 10^9 KBE/ml. TS-Gehalt des Bodens ohne Folienabdeckung: 76,8 %; mit Folie: 80,2 %)

Versuchsdauer in Tagen	Kontrollen	KBE/ml ohne Folie	KBE/ml weiße Folie	KBE/ml schwarze Folie
13	4,3E+06	1,5E+06 2,3E+05	2,3E+05 1,5E+06	n. d.
22	n. d.	2,3E+05 9,3E+05	2,9E+05 9,3E+05	4,0E+00 4,3E+04
28	2,3E+06	n.n. 9,3E+03	n. d.	7,5E+03 2,4E+05
35	n. d.	4,3E+04 1,5E+05	n. d.	4,3E+02 4,3E+02
41	n. d.	2,3E+02 9,3E+04	n. d.	n.n. 9,2E+02

n. n.: nicht nachgewiesen n. d.: nicht durchgeführt
KBE: Koloniebildende Einheiten/1 ml Suspension

Tab. 37: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Salmonella* Typhimurium Typ "Zoosal oral" in KBE/ml im Boden mit Folienabdeckung. (Anzahl der Mikroorganismen in der Suspension: 10^9 KBE/ml; TS-Gehalt des Bodens ohne Folienabdeckung: 76,8 %; mit Folienabdeckung: 80,2%)

Versuchsdauer in Tagen	Kontrollen	<i>Salmonella</i> Typhimurium		
		ohne Folie	weiße Folie	Schwarze Folie
13	<E+03	9,2E+00 9,3E+01	n. n. 4,3E+01	n. d.
22	2,4E+02 4,6E+03	2,1E+01 9,0E+01	n. d.	2,3E+01 4,3E+01
28	n. n. 1,5E+01	n. d.	n. d.	n. n. n. n.
35	2,3E+01 4,3E+01	n. d.	n. d.	n. n. 4,3E+01

n. n.: nicht nachweisbar n. d.: nicht durchgeführt
KBE: Koloniebildende Einheiten/1 ml Suspension

Tab. 38: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Folienversuchen

Mess-Tage	Temperatur in °C											
	ohne Folie				weiße Folie				schwarze Folie			
	Bodenoberfl.	2 cm Tiefe	5 cm Tiefe	10 cm Tiefe	Bodenoberfl.	2 cm Tiefe	5 cm Tiefe	10 cm Tiefe	Bodenoberfl.	2 cm Tiefe	5 cm Tiefe	10 cm Tiefe
0	24,5	17	13	n. d.	18	16	14	n. d.	14	10	9	n. d.
2	22,5	19	12	n. d.	22	16	13	n. d.	14	10	9	n. d.
13	n. d.	11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	13	n. d.	n. d.	14	n. d.	n. d.
20	40	n. d.	n. d.	n. d.	50	n. d.	n. d.	n. d.	56	n. d.	n. d.	n. d.
22	41	n. d.	n. d.	n. d.	42	n. d.	n. d.	n. d.	44	n. d.	n. d.	n. d.
28	n. d.	n. d.	39	37	n. d.	47	33	n. d.	n. d.	n. d.	49	44
35	n. d.	n. d.	37	35	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	40	37
41	n. d.	n. d.	42;46	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	50;50	n. d.
Mittelwerte	n. d.	n. d.	44	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	50	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt Bodenoberfl.: Bodenoberfläche

3.2.3.2.2 2. Versuch mit Solarfolien

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind in den Tabellen 39 bis 43 dargestellt. Die unter der schwarzen Folie, die weiße Folie wurde in diesem Versuchsdurchgang nicht eingesetzt, und im unbedeckten Boden in verschiedenen Tiefen gemessenen Temperaturen sind im Detail in der Tabelle 44 aufgelistet.

Nach sieben Tagen, dem ersten Probennahmetermin, war beim Prüfkeim *Enterococcus faecalis* auf den Keimträgern von beiden Prüfflächen nur eine unbedeutende

Keimzahlreduktion gegenüber den Kontrollkeimträgern festzustellen, mit einer leichten Tendenz zu geringeren Keimzahlen auf den Keimträgern von der unbedeckten Fläche.

Nach 28 Tagen war auf den Kontrollkeimträgern die Anzahl reisolierbarer *Enterococcus faecalis* kaum abgesunken, auch bei den Keimträgern von der Fläche mit der schwarzen Folie war nur ein geringes Absinken der Keimzahl zu beobachten, während die Keimreduktion auf den Keimträgern von der unbedeckten Fläche mit ca. 4 Zehnerpotenzen am höchsten war (Tab. 39).

Nach sieben Tagen, dem ersten Probennahmetermin, war beim Prüfkeim *Salmonella Typhimurium* auf den Keimträgern von der unbedeckten Fläche keine Reduktion gegenüber den Kontrollkeimträgern festzustellen, bei den Keimträgern von den mit schwarzer Folie abgedeckten Flächen war zu diesem Zeitpunkt weder ein quantitativer noch ein qualitativer Nachweis überlebender Salmonellen möglich.

Nach 28 Tagen war auf den Kontrollkeimträgern die Anzahl reisolierbarer Salmonellen auf $7,2 \times 10^1$ bis $1,8 \times 10^2$ KBE/ml Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $1,2 \times 10^2$ KBE/ml) gesunken, von den Keimträgern auf den exponierten Flächen war nur noch ein qualitativer Salmonellennachweis möglich (Tab. 40). Insgesamt wiesen die Ergebnisse zu den verschiedenen dazwischenliegenden Probenahmeterminen große Schwankungen auf.

Nach sieben Tagen, dem ersten Probennahmetermin, war beim Prüfkeim *E. coli* 63 von den Kontrollkeimträgern kein Nachweis mehr möglich, während auf den Keimträgern von der unbedeckten Fläche sowie von den mit schwarzer Folie abgedeckten Flächen noch $4,8 \times 10^2$ KBE/ml zu reisolieren waren. Nach 28 Tagen war von den beiden Versuchsflächen kein Nachweis des Testkeims mehr möglich, bei den Proben vom 14. und vom 21. Versuchstag ist eine geringe Tendenz zu niedrigen Keimzahlen bei den Keimträgern von der nicht abgedeckten Fläche festzustellen (Tab. 41).

Bei den Versuchen mit Bovinem Parvovirus lag der Ausgangsgehalt im Eluat von den Kontrollkeimträgern (Tag 0) zwischen $10^{4,25}$ und $10^{4,5}$ KID₅₀ in 100 µl. Am siebten Tag wurden höhere Werte registriert, während dann am 21. Tag nur ein Titer von $10^{2,25}$ gemessen wurde (Tab. 43). Nach 21 Tagen waren von den Keimträgern, die im Boden der unbedeckten Flächen exponiert waren keine Viren mehr zu reisolieren, während in den Keimträgern die von den mit schwarzer Folie abgedeckten Flächen kamen, noch $10^{1,5}$ und $10^{2,5}$ KID₅₀ in 100 µl nachzuweisen waren. Nach 28 bzw. 35 Tagen waren alle Proben negativ. Es lässt sich eine leichte Tendenz zu höheren Überlebensraten und zu längeren Überlebenszeiten bei den Proben von den mit schwarzer Folie abgedeckten Flächen ablesen (Tab. 42).

Die Temperaturen lagen auf den nicht abgedeckten Flächen zwischen 39 °C und 53 °C mit einem Mittelwert von 46,2 °C. Bei den mit schwarzer Folie abgedeckten Versuchsflächen lag

die Temperatur zwischen 35 °C und 53 °C mit einem Mittelwert von 46,6 °C Der Temperaturverlauf ist der Tabelle 43 zu entnehmen.

Tab. 39: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis* in KBE/ml im Boden unter Solarfolien

Versuchsdauer in Tagen	<i>Enterococcus faecalis</i>		
	Kontrollen	ohne Folie	schwarze Folie
7	3,0E+06 3,0E+06	9,2E+04 6,2E+05	2,2E+06 9,2E+05
14	8,6E+06	<E+03 n. d.	<E+03 n. d.
21	4,6E+07 n. n.	2,3E+04 4,6E+05	8,6E+05 8,6E+05
28	2,3E+05 4,6E+07	0,7E+02 n. d.	1,8E+04 8,6E+05

n. n.: nicht nachgewiesen
n. d.: nicht durchgeführt

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension

Tab. 40: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Salmonella Typhimurium* in KBE/ml im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)

Versuchsdauer in Tagen	<i>Salmonella Typhimurium</i>		
	Kontrollen	ohne Folie	schwarze Folie
7	n. n. 3,0E+03	9,2E+03	n. n.
14	1,8E+03 1,8E+03	n. n.	n. n.
21	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
28	1,8E+02 7,2E+01	+	+

n. n.: nicht nachgewiesen
+: nur qualitativ nachweisbar

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension

Tab. 41: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *E. coli* 63 in KBE/ml im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)

Versuchsdauer in Tagen	<i>E. coli</i> 63		
	Kontrollen	ohne Folie	schwarze Folie
7	n. n. n. n.	n. n.	n. n.
14	n. n.	n. n.	n. n.
21	n. n.	4,8E+02	4,8E+02
28	n. n.	4,3E+01	8,6E+03
35	n. n.	7,2E+03	4,6E+04

n. n.: nicht nachgewiesen

KBE: Koloniebildende Einheiten

Tab. 42: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Bovinem Parvovirus* (BPV in KID₅₀ in 100 µl) im Boden unter Solarfolien (Angaben in KID₅₀/100 µl)

Versuchsdauer in Tagen	Bovines Parvovirus		
	Kontrollen	ohne Folie	schwarze Folie
0	E+04,2; E+04,5	n. d.	n. d.
7	E+04,5	E+02,7	E+04,5
14	E+04,7 ;E+05	E+03	E+03,5
21	E+02,2	n. d.	E+01,5; E+02,5
28	n. d.	n. d.	n. d.
35	n. d.	n. d.	n. d.

n. d.: nicht durchgeführt

KID: Kultur Infektiöse Dosis/100 µl Suspension

Tab. 43: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Folienversuchen

Versuchsdauer in Tagen	Temp. ohne Folie	Temp. schwarze Folie
0	n. d.	n. d.
7	39 °C	35 °C
14	53 °C	40 °C
21	50 °C	53 °C
28	45 °C	53 °C
35	44 °C	52 °C
Mittelwert	46,2 °C	46,6 °C

n. d.: nicht durchgeführt

3.2.3.2.3**3. Versuch**

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen, die nur mit Salmonellen durchgeführt wurden, sind in der Tabelle 45 dargestellt. Die unter der schwarzen Folie, die weiße Folie wurde in diesem Versuchsdurchgang nicht eingesetzt, und im unbedeckten Boden in verschiedenen Tiefen gemessenen Temperaturen, sind im Detail in der Tabelle 45 aufgelistet.

Bei den Versuchen lag der Ausgangsgehalt im Eluat von den Kontrollkeimträgern (Tag 0) zwischen $4,8 \times 10^5$ und $9,2 \times 10^5$ KBE/ml. Letztmals ließen sich von nur noch einem der zwei Kontrollkeimträgern am 28. Tag noch $1,8 \times 10^3$ KBE/ml zurückgewinnen. Die Salmonellen auf den in die Erde eingebrachten Keimträgern überlebten ausnahmslos und in allen Ansätzen in wesentlich höherer Zahl bis zum 35. Versuchstag, dem Ende des Versuchs. Zwischen den beiden Versuchsansätzen lassen sich hinsichtlich einer differenzierten Aussage keine Rückschlüsse ziehen. Die Keimzahlen im Eluat von den Keimträgern beider Versuchsflächen schwanken stark und liegen bis zum Ende des Versuches in vergleichbaren Bereichen (Tab 44).

Die bei den Versuchsflächen festgestellten Temperaturverläufe sind in der Tabelle 45 zu entnehmen, sie lagen bei der unbedeckten Fläche zwischen 43 °C und 53 °C (Mittelwert 48,6 °C) sowie bei den mit der schwarzen Folie abgedeckten Fläche zwischen 51 °C und 57 °C. (Mittelwert 53,2 °C).

Tab. 44: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Salmonella* Typhimurium Typ "Zoosal oral" in KBE/ml im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)

Versuchsdauer in Tagen	<i>Salmonella</i> Typhimurium		
	Kontrolle*	ohne Folie	schwarze Folie
0	4,8E+05 9,2E+05	n. d.	n. d.
7	4,6E+04 1,8E+05	8,6E+04 4,6E+06	4,6E+06 8,6E+05
14	1,8E+03 8,6E+03	8,6E+05 8,6E+04	8,6E+05 4,6E+03
21	4,6E+03 8,6E+03	4,6E+04 4,6E+04	4,6E+02 8,6E+03
28	n. n. 1,8E+03	4,6E+05 4,6E+05	n. d. 8,6E+03
35	n. n. n. n.	1,8E+05 4,6E+05	8,6E+04 1,8E+05

n. n.: nicht nachgewiesen KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension
 * die Kontrollproben wurden im Labor bei einer Temperatur von +25 °C belassen
 n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 45: Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Versuchen mit Solarfolien

Versuchsdauer in Tagen	Temp. ohne Folie	Temp. schwarze Folie
0	44,0 °C	52,0 °C
7	52,0 °C	55,0 °C
14	52,5 °C	57,0 °C
21	50,0 °C	52,0 °C
28	50,0 °C	51,0 °C
35	43,0 °C	52,0 °C
Mittelwert	48,6 °C	53,1 °C

Temp.: Temperatur

3.2.3.3 Ergebnisse der Versuche zum Einsatz eines Gerätes zur Bodendämpfung

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind der Tabelle 47 sowie der Abbildung 32 zu entnehmen. Die in verschiedenen Tiefen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Dämpfung gemessenen Bodentemperaturen sind in der Tabelle 46 aufgelistet.

Die Konzentration der Mikroorganismen in 1 l Suspension je Bakterienart, die auf die Versuchsfläche gebracht wurde, betrug bei *E. coli*: $8,5 \times 10^8$ KBE/ml, bei Salmonellen: $7,6 \times 10^8$ KBE/ml und bei Enterokokken: $4,6 \times 10^8$ KBE/ml.

Die Ausgangskonzentrationen in der Abschüttelflüssigkeit lagen bei *Escherichia coli* zwischen $4,6 \times 10^4$ KBE/ml und $8,6 \times 10^4$ KBE/ml (Mittelwert: $6,6 \times 10^4$ KBE/ml), bei *Salmonella Typhimurium* zwischen $4,6 \times 10^7$ KBE/ml und $1,8 \times 10^8$ KBE/ml (Mittelwert: $1,1 \times 10^8$ KBE/ml) und bei *Enterococcus faecalis* zwischen $8,6 \times 10^7$ KBE/ml und $1,8 \times 10^8$ KBE/ml (Mittelwert: $1,3 \times 10^8$ KBE/ml).

Nach dem Dämpfen ließ sich keiner der bakteriellen Testkeime mehr von den Keimträgern reisolieren und im kontaminierten Boden nachweisen (Tab. 47, Abb. 32).

Beim Bovinen Parvovirus lag die Ausgangskonzentration in der Abschüttelflüssigkeit von den Keimträgern bei $10^{4,5}$ KID₅₀/100 µl. Nach der Dämpfung lag der von den exponierten Keimträgern zwischen $10^{0,50}$ und $10^{1,50}$ KID₅₀/100 µl (Mittelwert: 10^1 KID₅₀/100 µl).

Die Temperatur lag im Boden unmittelbar nach der Dämpfung bis zu einer Tiefe von 15 cm nicht unter 90 °C und 45 min nach der Behandlung waren im Boden noch Temperaturen von 60 °C und darüber zu ermitteln (Tab. 47). Der Trockensubstanzgehalt des Ackerbodens vor dem Versuch lag bei 93 %, nach dem Ausbringen der Keimsuspension unmittelbar vor dem Dämpfen bei 82 % und nach der Behandlung bei 88 %.

Tab. 46: Temperaturverlauf bei der Bodendämpfung nach 20 minütigem Dämpfen

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.
Mittelwert	97	90,6	83,6	76,2
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.
Mittelwert	95,5	90,6	83,6	76,2
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.
Mittelwert	94,9	82,9	78,6	71,6

n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 47: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium in KBE/ml und *Bovinem-Parvovirus* in KID₅₀ (in 100 µl) im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit einem Dampfgerät

Prüforganismus	Kontrollen („offene“ Keimträger)	Rückgewinnung von den Keimträgern qualitativ/quantitativ		Qualitativer Nachweis aus Bodenproben
		offene	geschlossene	
<i>E. coli</i>	4,6E+04 4,6E+04 8,6E+04	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.
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4,6E+07 1,8E+08 1,8E+08	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.
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,6E+07 8,6E+07 1,8E+08	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.
<i>Bovines Parvovirus</i>	E+04,5 E+04,5	n. d.	E+00,5	n. d.
		n. d.	E+00,5	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,25	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.
		n. d.	E+01,5	n. d.
n. d.	*	n. d.		

* nicht auswertbar

n. n.: nicht nachgewiesen

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension

n. d.: nicht durchgeführt

KID: Kultur Infektiöse Dosis/100µl Suspension

+: qualitativ nachgewiesen

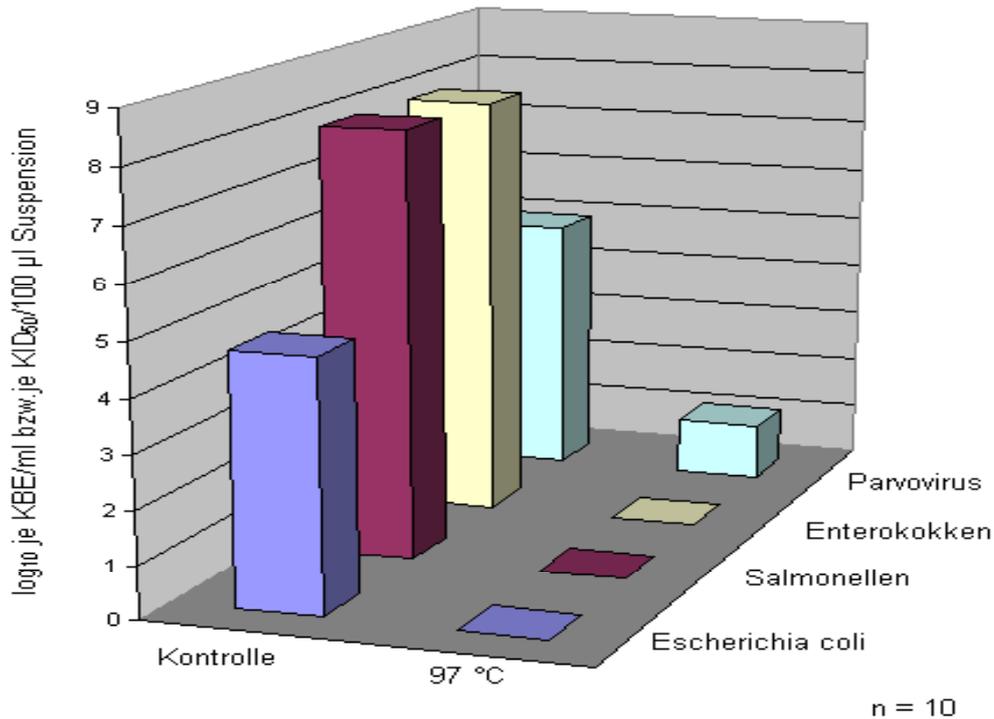


Abb. 32: Darstellung der Mittelwerte der überlebenden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium in KBE/ml und Bovinem Parvovirus in KID₅₀ (in 100 µl Suspension) im Boden vor und nach der Hitzeeinwirkung mit einem Dämpfgerät (Tab. 47)

3.2.3.4 Ergebnisse der Versuche zur Anwendung von Branntkalk

3.2.3.4.1 Ergebnisse des 1. Versuchs zur Branntkalkanwendung

Die Ergebnisse des ersten von drei Praxisversuchen zur Reduktion von Prüforganismen im gekalkten Boden sind in den Tabellen 48, 49 und 50 dargestellt.

Wie aus Tabelle 48 ersichtlich ist, konnte *E. coli* bei einer Anwendungsmenge von 0,8 kg CaO/m² am ersten Versuchstag von keinem der exponierten Keimträger zurückgewonnen werden, am 4. Versuchstag ließen sich von zwei der fünf exponierten Keimträger noch Restmengen von $3,6 \times 10^0$ KBE/ml zurückgewinnen. Bei einer Dosierung von 1,6 kg CaO/m² ließen sich von einem der fünf Keimträger noch Restmengen von $9,3 \times 10^1$ KBE/ml *E. coli* zurückgewinnen. Durch den Vergleich mit den Kontrollen ist somit nach 1-4 Tagen lediglich mit einer Keimreduktion in der Größenordnung einer Zehnerpotenz zu rechnen (Tab. 48).

Von den Keimträgern mit dem Prüfkeim *Salmonella* Typhimurium ließ sich in allen Versuchsansätzen vom ersten Tag kein quantitativer Nachweis führen, da die Verdünnungsreihen zur Keimzahlermittlung nach der Verdünnungsstufe 10^{-3} nicht weitergeführt wurden. Von den am vierten Versuchstag bei einer Anwendungsmenge von 0,8 kg CaO/m² im Boden exponierten Keimträgern ließen sich zwischen $3,6 \times 10^0$ KBE/ml und $2,4 \times 10^1$ KBE/ml (Mittelwert: $7,3 \times 10^0$ KBE/ml) in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen.

Bei einer Dosierung von $1,6 \text{ kg CaO/m}^2$ lagen am 4. Versuchstag die entsprechenden Werte zwischen $3,6 \times 10^0 \text{ KBE/ml}$ und $9,3 \times 10^1 \text{ KBE/ml}$ (Mittelwert: $3,7 \times 10^1 \text{ KBE/ml}$) in der Abschüttelflüssigkeit (Tab. 49). Auch hier ist im Vergleich mit den Kontrollkeimträgern lediglich von einer Keimreduktion im Bereich von einer Zehnerpotenz auszugehen.

Von den mit *Enterococcus faecalis* kontaminierten Keimträgern ließen sich bei einer Anwendungsmenge von $0,8 \text{ kg CaO/m}^2$ am ersten Versuchstag zwischen $3,6 \times 10^2 \text{ KBE/ml}$ und $3,6 \times 10^5 \text{ KBE/ml}$ (Mittelwert: $8,2 \times 10^4 \text{ KBE/ml}$) in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen. Nach einer Einwirkungszeit von vier Tagen lagen die entsprechenden Werte zwischen $4,3 \times 10^1 \text{ KBE/ml}$ und $9,3 \times 10^3 \text{ KBE/ml}$ in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $2,5 \times 10^3 \text{ KBE/ml}$). Bei einer Dosierung von $1,6 \text{ kg CaO/m}^2$ ließen sich von den exponierten Keimträgern am 4. Tag zwischen $3,6 \times 10^0 \text{ KBE/ml}$ und $2,3 \times 10^2 \text{ KBE/ml}$ in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $8,1 \times 10^1 \text{ KBE/ml}$) zurückgewinnen. Die Ergebnisse vom ersten Versuchstag waren aus den weiter oben für Salmonellen bereits genannten Gründen nicht auswertbar (Tab. 48). Bei der niedrigen Dosierung konnten am vierten Tag Reduktionsraten bis zu einer Zehnerpotenz gemessen werden. Die Schwankungen in den Reduktionsraten zwischen den einzelnen Werten lagen am vierten Tag im Bereich von einer Zehnerpotenz im Vergleich zu den Kontrollproben, entsprechendes gilt für die höhere Dosierung.

Ein qualitativer Nachweis aus dem künstlich kontaminierten Boden war für alle Prüfkeime in allen Ansätzen möglich. Dabei lagen die am ersten Tag gemessenen pH-Werte auf den Flächen mit der geringeren Kalkmenge bei 11,3 und auf der höher gekalkten Fläche bei 11,9. Nach vier Tagen fielen sie bei den niedrig beaufschlagten Flächen auf Werte zwischen 8,0 und 8,3 und auf den stärker gekalkten Flächen auf Werte zwischen 8,4 und 8,5 (Tab. 49).

Der TS-Gehalt des Bodens betrug zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns 86 %, bei einem pH-Wert von 7,5.

Tab. 48: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 0,8 kg und 1,6 kg CaO/m²; quantitativer Nachweis der Prüforganismen in der Abschüttelflüssigkeit der Keimträger; die Werte der Kontrollproben sind aus Tabelle 51 ersichtlich (Angaben in KBE/ml)

Ver- suchs- tage	Untersuchte Prüforganismen					
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>
	0,8 kg CaO/m ²			1,6 kg CaO/m ²		
1	n. n.	<E+03	3,6E+02	n. n.	<E+03	<E+03
	n. n.	<E+03	3,6E+02	n. n.	<E+03	<E+03
	n. n.	<E+03	3,6E+03	n. n.	<E+03	<E+03
	n. n.	<E+03	4,3E+04	n. n.	<E+03	<E+03
	n. n.	<E+03	3,6E+05	9,3E+01	<E+03	<E+03
Mittelwert	n. n.	<E+03	8,2E+04	1,8E+01	<E+03	<E+03
STABW	n. d.	n. d.	1,5E+05	4,1E+01	n. d.	n. d.
4	n. n.	n. n.	4,3E+01	n. n.	n. n.	3,6E+00
	n. n.	n. n.	9,3E+01	n. n.	n. n.	3,6E+01
	n. n.	3,6E+00	7,5E+02	n. n.	3,6E+00	4,3E+01
	3,6E+00	9,2E+00	2,4E+03	3,6E+00	9,3E+01	9,3E+01
	3,6E+00	2,4E+01	9,3E+03	3,6E+00	9,3E+01	2,3E+02
Mittelwert	1,4E+00	7,3E+00	2,5E+03	1,4E+00	3,7E+01	8,1E+01
STABW	1,9E+00	1,0E+01	3,9E+03	1,9E+00	5,0E+01	8,9E+01

E. coli: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella* Typhimurium; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
 KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension
 n. n.: nicht nachgewiesen STABW: Standardabweichung n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 49: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 0,8 kg und 1,6 kg CaO/m², qualitativer Nachweis der Prüforganismen aus dem Boden

Ver- suchs- tage	0,8 kg CaO/m ²			1,6 kg CaO/m ²			0,8 kg CaO /m ²	1,6 kg CaO /m ²
	Im Suspensionsversuch untersuchte Prüforganismen						pH	
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh .</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh .</i>	<i>Ent. f.</i>		
1	+	+	+	+	+	+	11,3	11,9
	+	+	+	+	+	+		
	+	+	+	+	+	+		
	+	+	+	+	+	+		
	+	+	+	+	+	+		
4	+	+	+	+	+	+	8,0	8,4
	+	+	+	+	+	+	8,0	8,4
	+	+	+	+	+	+	8,1	8,4
	+	+	+	+	+	+	8,2	8,5
	+	+	+	+	+	+	8,3	8,5

E. coli: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella* Typhimurium;

Ent. f.: *Enterococcus faecalis*

+: qualitativer Nachweis möglich bei Salmonellen in 50 g Boden; bei *Enterococcus faecalis* und *E. coli* in 20 g Boden

Tab. 50: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* im Boden ohne Anwendung von Kalk (Kontrollproben); qualitativer und quantitativer Nachweis der Prüforganismen auf den Keimträgern und in den Bodenproben

Versuchstag	Angaben in KBE/g Boden			Angaben in KBE/ml Abschüttelflüssigkeit vom Keimträger			Qualitativer Nachweis in den Bodenproben		
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>
0	n. d.	n. d.	n. d.	2,1E+02 2,3E+02	3,6E+02 9,3E+02	3,6E+04 9,2E+04	+	+	+
Mittelwert	n. d.	n. d.	n. d.	2,2E+02	6,4E+02	6,4E+04	+	+	+
1	<E+04 <E+04	<E+04 <E+04	9,3E+04 2,3E+04	2,3E+01 3,6E+02	9,2E+01 3,6E+02	2,3E+04 2,3E+04	+	+	+
Mittelwert	<E+04	<E+04	1,2E+06	1,9E+02	2,2E+02	2,3E+04	+	+	+
4	n. d.	n. d.	n. d.	4,3E+02 9,3E+02	3,6E+01 9,2E+01	2,3E+04 4,3E+04	+	+	+
Mittelwert	n. d.	n. d.	n. d.	6,8E+02	6,4E+01	3,3E+04	+	+	+

E. coli: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella* Typhimurium;
Ent. f.: *Enterococcus faecalis*

KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension n. d.: nicht durchgeführt

+: qualitativer Nachweis möglich bei Salmonellen in 50 g Boden; bei *Ent. f.* und *E. coli* in 20 g Boden

3.2.3.4.2 Ergebnisse des 2. Versuchs zur Branntkalkanwendung

Die Ergebnisse des zweiten Praxisversuches sind in den Tabellen 51, 52 und 53 dargestellt.

Wie aus Tabelle 51 ersichtlich ist, konnte *E. coli* bei einer Anwendungsmenge von 0,8 kg CaO/m² am ersten und am vierten Versuchstag von keinem der exponierten Keimträger zurückgewonnen werden. Bei der Dosierung von 1,6 kg CaO/m² ließen sich ebenfalls von keinem der exponierten Keimträger *E. coli* zurückgewinnen. Somit ist gegenüber dem frisch kontaminierten Keimträger (Tab. 53) eine Reduktion von mindestens 5 Zehnerpotenzen erfolgt, es sind aber in diesem Versuchsdurchgang keine Aussagen im Vergleich zu den 1, 2 und sechs Tage aufbewahrten Kontrollkeimträgern möglich.

Von den mit dem Prüfkeim *Salmonella* Typhimurium kontaminierten Keimträgern ließen sich bei einer Anwendungsmenge von 0,8 kg CaO/m² am ersten Versuchstag zwischen 7,7 x 10² KBE/ml und 8,6 x 10⁵ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: 1,7 x 10⁵ KBE/ml) zurückgewinnen. Nach der maximalen geprüften Einwirkungszeit von sechs Tagen ließ sich nur noch von einem Keimträger die Menge von 8,6 x 10² KBE/ml zurückgewinnen. Bei einer

Dosierung von 1,6 kg CaO/m² lagen am ersten Versuchstag die entsprechenden Werte zwischen $4,3 \times 10^2$ KBE/ml und $8,6 \times 10^3$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $2,4 \times 10^3$ KBE/ml). Am 6. Versuchstag waren alle Abschüttelflüssigkeiten negativ. Somit ist gegenüber dem frisch kontaminierten Keimträger (Tab. 54) eine Reduktion von mindestens 4 Zehnerpotenzen erfolgt, es sind aber in diesem Versuchsdurchgang keine Aussagen im Vergleich zu den 1, 2 und 6 Tage aufbewahrten Kontrollkeimträgern möglich.

Von den mit *Enterococcus faecalis* kontaminierten Keimträgern ließen sich bei einer Anwendungsmenge von 0,8 kg CaO/m² am ersten Versuchstag zwischen $4,6 \times 10^5$ KBE/ml und $4,6 \times 10^6$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen (Mittelwert: $2,6 \times 10^6$ KBE/ml). Nach einer Einwirkungszeit von sechs Tagen lagen die entsprechenden Werte zwischen $1,8 \times 10^4$ KBE/ml und $8,6 \times 10^6$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $1,7 \times 10^6$ KBE/ml). Bei einer Dosierung von 1,6 kg CaO/m² ließen sich von den exponierten Keimträgern am ersten Versuchstag zwischen $7,2 \times 10^2$ KBE/ml und $4,6 \times 10^5$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen (Mittelwert: $1,8 \times 10^5$ KBE/ml). Am 6. Tag lagen die entsprechenden Werte zwischen $4,6 \times 10^2$ KBE/ml und $8,6 \times 10^3$ KBE/ml (Mittelwert: $1,9 \times 10^3$ KBE/ml) in der Abschüttelflüssigkeit. Bei der höheren Dosierung konnten am ersten Tag gegenüber dem frisch kontaminierten Keimträger (Tab. 53) Reduktionsraten bis zu sechs Zehnerpotenzen gemessen werden. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Werten sind aber sehr hoch. Am sechsten Tag lagen hier die festgestellten Reduktionsraten im Bereich von fünf Zehnerpotenzen. Bei der niedrigeren Dosierung sind die Reduktionsraten ähnlich, es sind aber in diesem Versuchsdurchgang keine Aussagen im Vergleich zu den 1, 2 und 6 Tage aufbewahrten Kontrollkeimträgern möglich.

Ein qualitativer Nachweis aus dem künstlich kontaminierten Boden war bei *E. coli* bei beiden Dosierungen nicht möglich (Tab. 52). Bei der niedrigen Dosierung ließen sich *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* über die Gesamtdauer von 13 Tagen nachweisen. Bei der höheren Dosierung war der qualitative Nachweis von *Salmonella* Typhimurium bis zum 6. Tag und bei *Enterococcus faecalis* bis zum Versuchsende möglich. Dabei lagen die am ersten Tag gemessenen pH-Wert auf den Flächen mit der geringeren Kalkmenge bei 11,3 und auf der höher gekalkten Fläche bei 11,9. Nach sechs Tagen fielen sie bei den niedrig mit Kalk beaufschlagten Flächen auf Werte zwischen 8,0 und 8,1 und auf den stärker gekalkten Flächen auf Werte zwischen 9,3 und 11,4 (Tab. 53). Nach 13 Tagen betrug der pH-Werte 7,3 bei den niedrig beaufschlagten Flächen und 8,5 auf den stärker gekalkten Flächen.

Der TS-Gehalt des Bodens betrug zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns 86 %, bei einem pH-Wert von 7,2.

Tab. 51: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Branntkalk (0,8 kg und 1,6 kg CaO/m²). Jeweils fünf Keimträger pro Mikroorganismenart und Beprobungstag. Keimträgerversuch (Angaben in KBE/ml)

Versuchstage	0,8 kg CaO/m ²			1,6 kg CaO/m ²			0,8 kg CaO /m ² **	1,6 kg CaO /m ² **
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f</i>		
0	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	11,4	11,7
1	n. n.	n. n.	*	n. n.	*	*	11,3	11,9
	n. n.	n. n.	*	n. n.	n. n.	n. n.		
	n. n.	7,7E+02	4,6E+05	n. n.	4,3E+02	7,2E+02		
	n. n.	7,7E+02	3,0E+06	n. n.	7,7E+02	8,6E+04		
	n. n.	8,6E+05	4,6E+06	n. n.	8,6E+03	4,6E+05		
Mittelwert	n. n.	1,7E+05	2,6E+06	n. n.	2,4E+03	1,8E+05	11,3	11,9
STABW	0	3,8E+05	2,0E+06	0	4,1E+03	2,4E+05	n. d.	n. d.
2	n. n.	n. n.	*	n. n.	n. n.	*	9,88	11,4
	n. n.	n. n.	*	n. n.	n. n.	*		
	n. n.	n. n.	4,6E+04	n. n.	n. n.	4,6E+03		
	n. n.	n. n.	4,6E+04	n. n.	n. n.	8,6E+03		
	n. n.	8,6E+02	1,8E+05	n. n.	8,6E+02	3,0E+06		
Mittelwert	n. n.	8,6E+02	9,0E+04	n. n.	1,7E+02	1,0E+06	n. d.	n. d.
STABW	0	1,7E+02	7,7E+04	0	3,8E+02	1,7E+05	n. d.	n. d.
6	n. n.	n. n.	1,8E+04	n. n.	n. n.	n. n.	8,1	9,3
	n. n.	n. n.	4,6E+04	n. n.	n. n.	n. n.	8,1	10,1
	n. n.	n. n.	4,6E+04	n. n.	n. n.	4,6E+02	8,0	10,8
	n. n.	n. n.	1,4E+05	n. n.	n. n.	4,6E+02	8,0	11,4
	n. n.	8,6E+02	8,6E+06	n. n.	n. n.	8,6E+03	8,0	9,5
Mittelwert	n. n.	1,7E+02	1,7E+06	n. n.	n. n.	1,9E+03	8,0	10,2
STABW	0	3,8E+02	3,8E+02	n. d.	n. d.	3,7E+03	0,05	0,8

E. coli: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella Typhimurium*; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
 KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension n. n.: nicht nachgewiesen
 n. d. nicht durchgeführt STABW: Standardabweichung * Keimträger nicht auffindbar
 ** pH-Wertmessung

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

Tab. 52: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 0,8 kg und 1,6 kg CaO/m², qualitative Untersuchung. Suspensionsversuch

Versuchstage	Keimsuspension						0,8 kg CaO /m ² *	1,6 kg CaO/ m ² *
	<i>E. coli</i>	S. Typh.	<i>E. f.</i>	<i>E. coli</i>	S. Typh.	<i>Ent. f.</i>		
	0,8 kg CaO/m ²			1,6 kg CaO/m ²				
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
	n. n.	+	+	n. n.	+	+	8,0	11,4
13	n. n.	+	+	n. n.	n. n.	+	7,3	8,5
	n. n.	+	+	n. n.	n. n.	+		
	n. n.	+	+	n. n.	n. n.	+		

E. coli.: *Escherichia coli*; S. Typh.: *Salmonella* Typhimurium; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
n. n.: nicht nachgewiesen +: qualitativer Nachweis möglich bei Salmonellen in 50 g Boden; bei *Enterococcus faecalis* und *E. coli* in 20 g Boden * pH-Wertmessung

Tab. 53: Kontrollkeimträger kontaminiert mit *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* ohne Anwendung von Kalk. Quantitativer Nachweis der Prüforganismen Angaben in KBE/ml)

Versuchstage	<i>E. coli</i>	S. Typh	<i>Ent. f.</i>
0	4,6E+05	4,6E+04	8,6E+07
	4,6E+05	8,6E+06	4,6E+08
Mittelwert	4,6E+05	4,6E+05	2,6E+08

E. coli.: *Escherichia coli*; S. Typh.: *Salmonella* Typhimurium; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension

3.2.3.4.3 Ergebnisse des 3. Versuchs zur Branntkalkanwendung

Die Ergebnisse des dritten Praxisversuches der allerdings mit 1,6 kg CaO/m² bzw. mit 3,2 kg CaO/m² durchgeführt wurde, sind in den Tabellen 54, 55 und 56 sowie in der Abbildung 33 dargestellt.

Wie aus Tabelle 54 ersichtlich ist, konnte *E. coli* bei beiden Anwendungsmengen an keinem der Versuchstage von den exponierten Keimträgern zurückgewonnen werden. Somit ist gegenüber den Kontrollkeimträgern mit Reduktionsraten im Bereich zwischen zwei und vier Zehnerpotenzen zu rechnen (Tab. 56). Lediglich die Kontrollproben wiesen eine Größe von $3,6 \times 10^0$ KBE/ml bei der niedrigen Kalkdosierung auf.

Von den mit dem Prüfkeim *Salmonella* Typhimurium kontaminierten Keimträgern ließen sich bei einer Anwendungsmenge von 1,6 kg CaO/m² am ersten Versuchstag noch zwischen $9,3 \times 10^1$ KBE/ml und $4,3 \times 10^3$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen (Mittelwert: $1,4 \times 10^3$ KBE/ml), an allen weiteren Tagen war kein Nachweis mehr möglich. Bei einer Dosierung von 3,2 kg CaO/m² lagen am ersten Versuchstag die entsprechenden Werte zwischen $3,6 \times 10^0$ KBE/ml und $4,3 \times 10^2$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $1,4 \times 10^2$ KBE/ml). An allen weiteren Tagen war auch hier der quantitative Nachweis negativ. Somit ist gegenüber den Kontrollkeimträgern mit Reduktionsraten im Bereich zwischen drei und vier Zehnerpotenzen zu rechnen (Tab. 54).

Von den mit *Enterococcus faecalis* kontaminierten Keimträgern ließen sich bei einer Anwendungsmenge von 1,6 kg CaO/m² am ersten Versuchstag zwischen $2,3 \times 10^2$ KBE/ml und $2,3 \times 10^5$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen (Mittelwert: $5,5 \times 10^4$ KBE/ml). Nach einer Einwirkungszeit von sechs Tagen lagen die entsprechenden Werte zwischen $9,2 \times 10^0$ KBE/ml und $9,3 \times 10^2$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $2,5 \times 10^2$ KBE/ml). Bei einer Dosierung von 3,2 kg CaO/m² ließen sich von den exponierten Keimträgern am ersten Versuchstag zwischen $4,3 \times 10^1$ KBE/ml und $9,3 \times 10^5$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit zurückgewinnen (Mittelwert: $2,1 \times 10^5$ KBE/ml). Am 6. Tag lagen die entsprechenden Werte zwischen $3,0 \times 10^0$ KBE/ml und $7,4 \times 10^0$ KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit (Mittelwert: $4,5 \times 10^0$ KBE/ml). Bei der niedrigen Dosierung können am ersten Tag gegenüber den entsprechenden Kontrollen Reduktionsraten in einer Größenordnung von bis zu drei Zehnerpotenzen gemessen werden, am sechsten Tag lagen die Reduktionsraten im Bereich von drei bis fünf Zehnerpotenzen. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Werten sind sehr hoch. Bei der hohen Dosierung weisen die Ergebnisse geringere Schwankungen auf. Am sechsten Tag liegen hier die festgestellten Reduktionsraten nach der maximalen Einwirkungszeit konstant in einer Größenordnung von fünf Zehnerpotenzen.

Ein qualitativer Nachweis aus dem künstlich kontaminierten Boden war fast ausnahmslos bei allen Prüfkeimen bei beiden Dosierungen über den gesamten Zeitraum möglich. Dabei lagen die am ersten Tag gemessenen pH-Werte auf beiden Versuchsflächen zwischen 12,7 und 12,9. Nach sechs Tagen fielen sie bei den niedrig beaufschlagten Flächen auf Werte zwischen 9,4 und 9,8 und auf den stärker gekalkten Flächen auf Werte zwischen 11,5 und 11,8 (Tab. 55).

Tab. 54: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m², quantitativer Nachweis der Prüforganismen (Angaben in KBE/ml)

Versuchstage	Untersuchte Prüforganismen						pH	
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	1,6 kg Kalk/m ²	3,2 kg Kalk/m ²
	1,6 kg CaO/m ²			3,2 kg CaO/m ²				
0	n. n.	*	2,3E+02	n. n.	*	4,3E+01	12,7	12,8
	n. n.	*	2,3E+03	n. n.	*	9,3E+03	12,7	12,8
	3,6E+00	n. n.	2,3E+04	n. n.	n. n.	2,3E+04	12,7	12,8
	3,6E+00	9,3E+01	2,3E+04	n. n.	3,6E+00	9,3E+04	12,8	12,8
	3,6E+00	4,3E+03	2,3E+05	n. n.	4,3E+02	9,3E+05	12,8	12,9
Mittelwert	2,1E+00	1,4E+03	5,5E+04	n. d.	1,4E+02	2,1E+05	12,7	12,8
STABW	1,9E+00	2,4E+03	9,8E+04	0	2,4E+02	4,0E+05	0,05	0,04
3	n. n.	n. n.	4,3E+01	n. n.	n. n.	n. n.		
	n. n.	n. n.	2,3E+02	n. n.	n. n.	7,4E+00		
	n. n.	n. n.	4,3E+03	n. n.	n. n.	2,3E+01	n. d.	n. d.
	n. n.	n. n.	9,3E+03	n. n.	n. n.	2,3E+01		
	n. n.	n. n.	4,3E+04	n. n.	n. n.	1,5E+03		
Mittelwert	n. n.	n. n.	1,1E+04	n. n.	n. n.	3,1E+02	n. d.	n. d.
STABW	0	0	1,8E+04	0	0	6,6E+02	n. d.	n. d.
6	*	n. n.	*	*	*	*	9,4	11,5
	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	3,0E+00	9,5	11,7
	n. n.	n. n.	9,2E+00	n. n.	n. n.	3,6E+00	9,6	11,7
	n. n.	n. n.	9,3E+01	n. n.	n. n.	3,6E+00	9,6	11,7
	n. n.	n. n.	9,3E+02	n. n.	n. n.	7,4E+00	9,8	11,8
Mittelwert	n. n.	n. n.	2,5E+02	n. n.	n. n.	4,4E+00	9,5	11,7
STABW	0	0	4,5E+02	0	0	2,0E+00	0,1	0,1

* Keimträger nicht auffindbar bzw. auswertbar

E. coli.: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella* Typhimurium; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension n. d.: nicht durchgeführt

n. n.: nicht nachgewiesen STABW: Standardabweichung

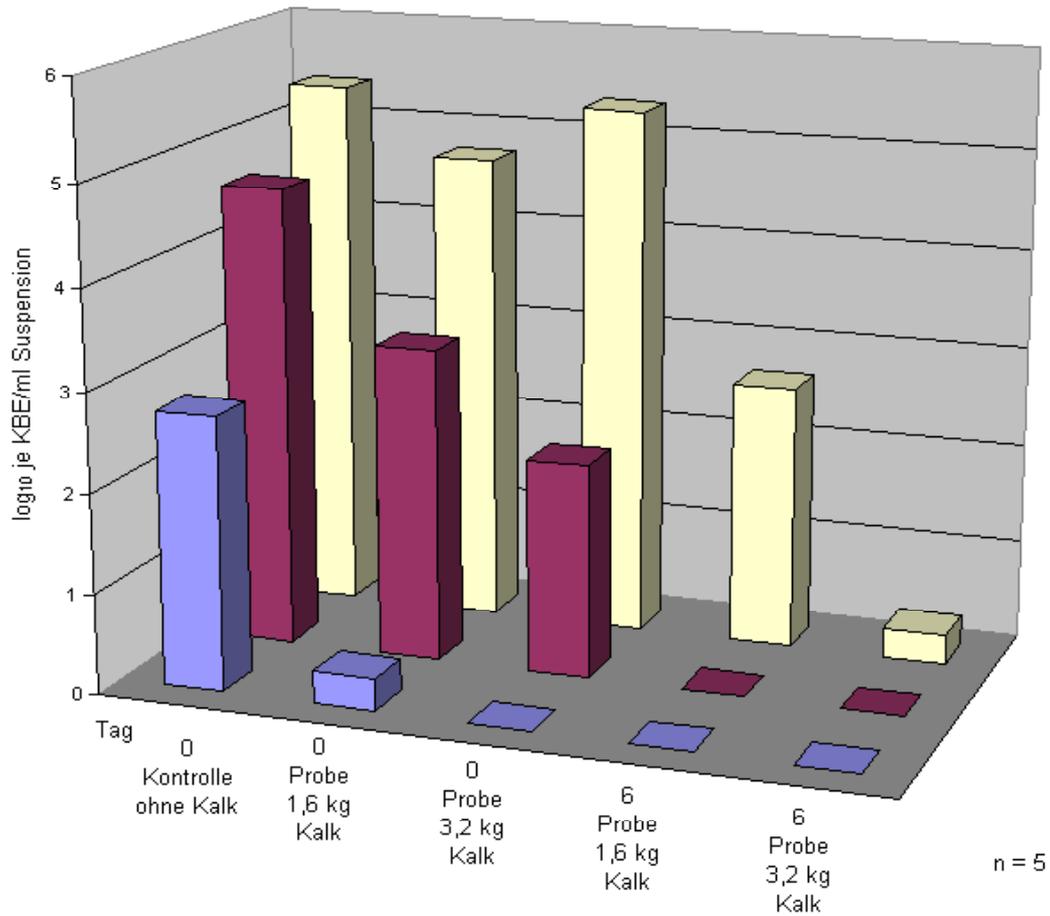


Abb. 33: Darstellung der Mittelwerte der überlebenden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* in KBE/ml Suspension im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m² (Tab. 54)

Tab. 55: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m², qualitativer Nachweis der Prüforganismen

Ver- suchs- tage	Untersuchte Mikroorganismen, Keimsuspension						pH	
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	1,6 kg CaO/ m ²	3,2 kg CaO /m ²
	1,6 kg CaO/m ²			3,2 kg CaO/m ²				
0	+	n. n.	+	n. n.	+	+	12,7	12,8
	+	+	+	+	+	+	12,7	12,8
	+	+	+	+	+	+	12,7	12,8
	+	+	+	+	+	+	12,8	12,8
	+	+	+	+	+	+	12,8	12,9
3	+	+	+	+	+	+	11,0	11,6
	+	+	+	+	+	+	11,7	11,9
	+	+	+	+	+	+	12,0	11,9
	+	+	+	+	+	+	12,1	12,1
	+	+	+	+	+	+	12,2	12,1
6	n. n.	+	+	+	+	+	9,4	11,5
	+	+	+	+	+	+	9,5	11,7
	+	+	+	+	+	+	9,6	11,7
	+	+	+	+	+	+	9,6	11,7
	+	+	+	+	+	+	9,8	11,8

E. coli: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella* Typhimurium; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
n. n.: nicht nachgewiesen +: qualitativer Nachweis möglich bei Salmonellen in 50 g Boden; bei *Enterococcus faecalis* und *E. coli* in 20 g Boden

Aus der Tabelle 56 werden die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen bei der Rückgewinnung der Prüforganismen von nicht gekalkten Bodenproben ersichtlich.

Tab. 56: Ergebnisse zur Inaktivierung von *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Enterococcus faecalis* in Kontrollproben im Boden ohne Anwendung von Kalk, quantitativer und qualitativer Nachweis der Prüforganismen (Angaben in KBE/ml)

Versuchs- Tage	KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit vom Keimträger			Qualitativer Nachweis in den Bodenproben		
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent. f.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typh.</i>	<i>Ent.f.</i>
0	3,6E+02	4,3E+04	2,4E+05	+	+	+
	7,4E+02	4,3E+04	2,4E+05	+	+	+
Mittelwert	5,5E+02	4,3E+04	2,4E+05	+	+	+
3	3,6E+03	3,6E+03	2,3E+05	+	+	+
	4,3E+04	9,3E+04	4,1E+05	+	+	+
Mittelwert	2,3E+04	4,8E+04	3,2E+05	+	+	+
6	3,6E+02	2,3E+03	4,3E+05	+	+	+
	4,3E+03	1,5E+04	9,3E+05	+	+	+
Mittelwert	2,3E+03	8,6E+03	6,8E+05	+	+	+

E. coli: *Escherichia coli*; *S. Typh.*: *Salmonella* Typhimurium; *Ent. f.*: *Enterococcus faecalis*
KBE: Koloniebildende Einheiten/ml Suspension n. d.: nicht durchgeführt

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, die Inaktivierung verschiedener Bakterien und Viren (*Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* und Parvoviren) im Boden durch die Anwendung von Wärme bzw. Hitze und Alkalität (Kalkbehandlung) in möglichst praxisnahen Ansätzen zu erreichen. Es wurde mit umweltfreundlichen Methoden gearbeitet. Durch umweltfreundlichen Methoden versteht man die Maßnahmen (Bodendesinfektion), die Umwelt (Boden) positiv beeinflussen und eine völlige Erholung/Regeneration nach der Durchführung dieser Maßnahmen ermöglichen.

Die Untersuchungen waren dreistufig aufgebaut, wobei im Labormaßstab und in halbtechnischen Versuchen bestimmte Einflussparameter auf die Inaktivierung der verwendeten Prüfororganismen und Viren unter weitgehend definierten Bedingungen untersucht wurden, bevor die eigentlichen Praxisversuche durchgeführt wurden.

Neben der Berücksichtigung des Trockensubstanzgehaltes im Boden bei deren Erhitzung in Laborversuchen im Wasserbad und in Freilandversuchen bezüglich des Einflusses auf die Inaktivierung der ausgewählten Prüfororganismen, erfolgten halbtechnische Versuche zur Desinfektion von Boden mit unterschiedlichen Mengen an Branntkalk (CaO), Kalkhydrat (Ca(OH)₂) und Kalkmilch in verschiedenen Konzentrationen.

Für diese Untersuchungen wurde sowohl die Keimträgertechnik, ähnlich wie sie aus der Desinfektionsmittelprüfung bekannt ist, als auch die direkte Kontamination des zu desinfizierenden Bodens mit den Prüfororganismen in Suspension angewandt.

In Praxisversuchen wurde die Wirkung eines sog. Injektorbrenners (Boden-Verbesserungs- und Sanierungssystems), von Solarfolien, eines Dampfgerätes zur Bodendämpfung und die Kalkanwendung (CaO, Ca(OH)₂) in der Praxis auf gartenbaulich genutzten Böden auf die Reduktion der ausgewählter Mikroorganismen untersucht. Die ermittelten Ergebnisse werden in der angegebenen Reihenfolge diskutiert.

4.1 Ergebnisse der Laborversuche

Diese Untersuchungen erheben nicht den Anspruch der Ermittlung statistisch abgesicherter Ergebnisse, das hätte den zeitlichen und finanziellen Rahmen in dem die Untersuchungen standen, gesprengt. Die Aufgabe dieser Laborversuche war es einmal den Einfluss der Verwendung einer nicht sterilisierten Matrix in Bezug auf eine sterilisierte Matrix grundsätzlich zu klären, da die Verwendung einer sterilisierten Matrix die Erfassung der mikrobiologischen Parameter vereinfacht hätte. Zum anderen war in Vorversuchen abzuschätzen, wie groß der Einfluss der Schwankungen einiger Parameter, die in den Praxisversuchen nicht auf einen bestimmten Bereich einzustellen waren, insbesondere der

Trockensubstanzgehalt allein oder in Bezug auf die verwendete Keimträgertechnik, auf die ermittelten Ergebnisse ist.

Hinsichtlich der Notwendigkeit der Verwendung von Keimträgern in den Praxisversuchen wird an dieser Stelle auf einige damit verbundene grundsätzliche Problemfelder weiter unten hingewiesen.

4.1.1 Tenazität im autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden

Es zeigt sich, dass bei 65 °C (Tab. 4) die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten von *Enterococcus faecalis* in autoklaviertem Boden einer schnelleren Reduktion unterliegen, als im nicht autoklavierten Boden. Das lässt den Schluss zu, für die weiteren Tenazitätsversuche, wenn immer möglich, gewachsenen Boden zu verwenden, was auch im weiteren Verlauf der Versuche geschehen ist. Dies war auch aus den verschiedenen im Institut vorliegenden Erfahrungen (BREITENFELD, 2000) bei ähnlichen Versuchsanstellungen zu erwarten. Die ermittelten quantitativen Ergebnisse wurden nicht einer Signifikanzbetrachtung unter statistischen Gesichtspunkten unterzogen, weil die Tendenz in allen Versuchswiederholungen durchgängig gleich war und die Unterschiede bereits nach zwanzig Minuten Einwirkungszeit im Bereich von 3 Zehnerpotenzen lagen.

CEUSTERMANS et al. (2007) stellten fest, dass der mikrobielle Antagonismus einen sekundären Einfluss auf die Mikroorganismenreduktion hat. Wichtiger sind die Temperatur und der Wassergehalt des Mediums.

Antagonismus der Mikroorganismen betrifft die gegenseitige Wirkung von Konkurrenzflora in einer längeren Zeitperiode, in welcher die Mikroorganismen sich vermehren oder langsam reduzieren können. In den eigenen Untersuchungen wurde der Boden unmittelbar nach der Beimpfung mit Enterokokken einer Wärmebehandlung in einem Wasserbad unterzogen. Die kurze Zeit der Temperaturwirkung auf *Enterococcus faecalis* im autoklavierten und nicht autoklavierten Boden in den eigenen Untersuchungen im Sinne eines mikrobiellen Antagonismus sollte keinen Einfluss auf die Bakterienreduktion haben.

4.1.2 Tenazität bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten des Bodens

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 mobilen Trägers gebunden. Dieser Träger ist in der Regel das Wasser (SCHEFFER et al., 2000). Aus vielen Bereichen der thermischen Behandlung unterschiedlicher Substrate zur Keimreduzierung ist bekannt, dass die Wasseraktivität die Inaktivierungskinetik beeinflusst (KESSLER, 1996), dementsprechend war auch hier zu

erwarten, dass bei einem höheren Trockensubstanzgehalt eine langsamere Inaktivierung erfolgt. Dies deutet sich zunächst auch in den Ergebnissen (Tab. 10) bei einer Erhitzung auf 70 °C an, allerdings lässt sich aus den Ergebnissen bei der Erhitzung auf 65 °C (Tab. 5) dies nicht eindeutig ablesen, auch fehlt eine statistische Absicherung dieser Tendenz, aber insgesamt stellt sich die Thermoresistenz des verwendeten Prüfstammes ähnlich dar wie von anderen Untersuchern festgestellt (HOFERER, 2001; MOCE LLIVINA, 2003).

Nach MOĆE-LLIVINA (2003) wurde *Enterococcus faecalis* bei einer Temperatur von 80 °C im Schlamm innerhalb von 30 min um über 1,4 Zehnerpotenzen reduziert. Zum Vergleich wurde bei einer Temperatur von 60 °C in Abwässern die Zahl von *Enterococcus faecalis* nach 30 min um über 3,4 Zehnerpotenzen reduziert. Allerdings waren hier die Unterschiede in den Trockensubstanzgehalten erheblich größer.

Die Untersuchungen von BREITENFELD (2000) belegen, dass *Enterococcus faecalis* im feuchtem Substrat länger überlebt, was im Widerspruch zu Feststellungen anderer Wissenschaftler steht. Das lässt den Rückschluss zu, dass *Enterococcus faecalis* im Vergleich zu *E. coli* und Salmonellen in feuchter Matrix weniger stark reduziert wird.

Untersuchungen von BREITENFELD (2000) belegen, dass nach einer Reisolierung der Testmikroorganismen aus der Suspension und aus Erdproben mit 30 % und 50 % Wassergehalt die Reduktionen von *E. coli* von fünf Zehnerpotenzen bei 50 % Wassergehalt und einer Zehnerpotenz bei einem Wassergehalt von 30 % erzielt wurden. Bei der *Salmonella* Senftenberg wurden Reduktionen um 2 Zehnerpotenzen bei einem 50 %-igen Wassergehalt und um eine Zehnerpotenz bei einem Wassergehalt von 30 % erzielt. Bei Fäkalstreptokokken bei einem Wassergehalt des Bodens von 30 % sowie 50 % wurden Reduktionen um eine Zehnerpotenz erzielt. Die Literaturbeispiele deuten darauf hin, dass ein größerer Wassergehalt sich positiv auf die Mikroorganismenreduktion auswirkt. Allerdings, reagiert *Enterococcus faecalis* auf die Wärme in einem Substrat mit größerem Wassergehalt mit kleineren Reduktionsraten als *E. coli* und Salmonellen. Die in den eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse waren in etwa so zu erwarten, zumal die Unterschiede in der Trockensubstanzgehalten gering waren.

Die Unterschiede im Trockensubstanzgehalt wurden zu gering gewählt, um einen entsprechenden Effekt deutlich erfassen zu können.

4.1.3 Tenazität von Bakterien auf im Boden exponierten Keimträgern bei verschiedenen Trockensubstanzgehalten

Grundsätzlich wäre auch hier zu erwarten gewesen, dass bei dem Boden mit dem höheren TS-Gehalt die Inaktivierung langsamer erfolgen würde als in einer Matrix mit einem höheren Wassergehalt. Auch hier war im Bereich der untersuchten Trockensubstanzgehalte (88 % TS

bis 76 % TS) die Tendenz nicht immer bei allen Prüfkeimen und in allen Prüfsituationen gleich deutlich zu erkennen. Bei den gramnegativen Salmonellen und *E. coli* dokumentieren sich die Unterschiede am deutlichsten bei den tieferen Temperaturen (50 °C), bei den geprüften höheren Temperaturen tritt die Reduktion der Bakterienzahl schneller ein, damit verwischen sich aber wegen des steileren Verlaufs der Inaktivierungskurve auch die Unterschiede, hier hätte mit einer wesentlich höheren Anzahl von Wiederholungen eine statistische Absicherung der zu erwartenden Tendenz erfolgen müssen. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die Unterschiede im TS-Gehalt, die im Hinblick auf die in der Praxis zu erwartenden Verhältnisse gewählt worden waren, im Bereich von 70% bis 90 % TS mit zwischen 11% und 13 % relativ gering sind und sich bei einem schnellen Inaktivierungsgeschehen höchstwahrscheinlich nicht so eindeutig erfassen lassen. Entsprechendes gilt, wenn auch auf etwas höherem Temperaturniveau, für den grampositiven Prüfkeim *Enterococcus faecalis*. Nach HOFERER (2001) kam es in Rindergülle (TS-Gehalt: ca. 10 %) innerhalb von 20 min bei 55 °C zu einer Reduktion von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) um ca. fünf Zehnerpotenzen. In einer Schweinegülle (TS-Gehalt: ca. 3 %) waren bereits nach 15 min in drei von vier Proben keine EHEC mehr nachweisbar. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich, dass die Thermoresistenz der Prüfbakterien mit ähnlichen Eigenschaften (*E. coli* und *Salmonella* Typhimurium) in der Matrix Boden mit einem TS-Gehalt von über 70 % deutlich höher ist. Wenn auch auf einem, was den Trockensubstanzgehalt angeht, wesentlich niedrigerem Niveau, lässt sich aus den Untersuchungen von MOĆE-LLIVINA (2003) und HOFERER (2001) ablesen, dass in einer Matrix mit niedrigerem TS-Gehalt eine schnellere Inaktivierung der untersuchten Bakterien stattfindet als in einer Matrix mit einem höheren TS-Gehalt. Dies gilt sicher für das grundsätzliche Verhalten der Prüforganismen und es war deshalb zu erwarten, dass bei relativ hohen TS-Gehalten wie im Boden insgesamt, eine wesentlich langsamere Inaktivierung zu erwarten ist, was sich in den Untersuchungen auch bestätigte.

4.2 Ergebnisse der halbtechnischen Versuche zur Kalkanwendung

Die durchgeführten halbtechnischen Versuche hatten mehr den Zweck, Hinweise für die Feldversuche zu erarbeiten, welche Kalkzubereitungen und -mengen dort eingesetzt werden sollten, als ein statistisch abgesichertes Ergebnisgebäude zu erarbeiten. Der Zweck dieser Untersuchungen war erreicht, indem von den gewählten grundsätzlich möglichen Varianten diese ausgeschieden werden konnten, die unter den gewählten Bedingungen eindeutig nicht effektiv waren. Auch ließ sich an den Ergebnissen bereits ablesen, dass für die Kalkwirkung der Wassergehalt des Bodens ein wichtiger Einflussfaktor ist. Als weiterer Einflussfaktor

stellte sich die absolute Flüssigkeitsmenge, die sich auf die Eindringtiefe in den Boden auswirkt, dar.

Bei der Auswahl der Prüforganismen für die Kalkversuche waren verschiedene Gesichtspunkte zu berücksichtigen. WESTPHAL und CHRISTENSEN (1983) propagieren die Verwendung von Enterokokken als Indikatormikroorganismen, da diese gegenüber pH- und Temperaturerhöhungen wesentlich widerstandsfähiger als Fäkalkoliforme, oder *Salmonella* sp. sein sollen. Andere Autoren (GELDREICH et al., 1962; IBIEBELE et al., 1985) wiederum weisen den Coliformen eindeutige Indikatorcharakteristika bezüglich fäkalen Verunreinigungen zu.

Die Resistenz der Enterokokken im alkalischen Milieu (sie wachsen in alkalischem Milieu bei einem pH-Wert von 9,6 in 9,6 %-igem NaCl (MORENO et al., 2005). Bei BURTON und TURNER (2003) ist zu finden, dass zum Zweck der Validierung von Verfahren zur Inaktivierung von Krankheitserregern in Flüssigmist *Salmonella* Senftenberg 775 W der am besten geeignetste Prüforganismus zur Erfassung der Wirkung von chemischen Einflüssen ist, weil, Enterokokken wegen ihrer bekannt hohen Chemoresistenz die Ansprüche im Hinblick auf die Inaktivierung von Krankheitserregern zu hochschrauben würde. Die Salmonellen, die bei Mensch und Tier die wichtigsten fäkal ausgeschiedenen bakteriellen Krankheitserreger sind, wurden deshalb als Prüforganismen neben Enterokokken ausgewählt, um ihre Verhaltensweise im alkalischen Boden zu erforschen. Hierbei war auch zu berücksichtigen, dass es zwar in der Regel ab pH-Werten zwischen 8-9 zur Wachstumsbeeinträchtigung von Salmonellen kommt, aber im Waschwasser zur Eierreinigung, das einen pH von 9 und eine Temperatur von 32-37°C hatte, sich *Salmonella* Enteritidis durchaus noch vermehren konnte. Erst ab einem pH Wert von 11 kommt es temperaturabhängig zu einer schnellen Abtötung (CATALLANO et al., 1994).

Der erste Laborversuch wurde durchgeführt um herauszufinden, ob Kalk in der trockenen Form für eine Bodendesinfektion geeignet oder ungeeignet ist. Als Desinfektionsmittel wurde Branntkalk (CaO) und Kalkhydrat (Ca(OH)₂) verwendet (Tab. 13). Verschiedene Autoren (u.a. HERBST et al., 2000; JIMENEZ et al., 2000, MIGNOTTE-CADIERGUES et al., 2001; STRAUCH und BÖHM, 2002; SCHIRM, 2005) berichten über die Kalkung von Substraten, deren TS-Gehalt 30 % nicht überschreitet. STRAUCH und BÖHM (2002) verwendeten 40 %-ige Kalkmilch zur Jauchedesinfektion. Jauche hat im Vergleich zum Boden einen niedrigen TS-Gehalt.

Die an Wasser reiche Kalkmilch, die in eigenen Versuchen zur Bodendesinfektion angewandt wurde, versorgte den wasserarmen Boden mit einer großen Menge Wasser so, dass der TS-Gehalt des Bodens von 80 % auf 60 bis 70 % sank (Tab. 14). Der mit Wasser angereicherte Boden enthielt zwar weniger Wasser als Jauche, aber diese Wassermenge im Boden ermöglichte trotzdem den Ablauf chemischer Reaktionen und den Zugang der

Kalkmilch zu allen Bodenpartikeln. In den eigenen Versuchen (Tab. 12 und 13) war grundsätzlich eine Keimreduktion bei der Anwendung einer 33,33 %-igen Kalkmilch möglich. Da in 33,33 %-iger Kalkmilch genügend Wasser war, um diese Reduktion zu erzielen.

Nach MIGNOTTE-CADIERGUES et al. (2001) bestimmen bei der Klärschlamm-Desinfektion drei Faktoren die Effektivität der Eliminierung der pathogenen Organismen: der pH-Wert, die Zeit der Kalkeinwirkung und der TS-Gehalt des Schlammes. Die eigenen Versuchsergebnisse belegen, dass es insgesamt fünf Faktoren gibt; zusätzlich zu den genannten auch die Menge des Kalkes ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) in kg/m^2 Boden und die Konzentration der Lösskalklösung. In der Tab. 21 sind die pH-Werte dargestellt, die bei der Anwendung von 2,5 kg Kalkhydrat und 5 kg Kalkhydrat pro m^2 Boden gemessen wurden. Diese pH-Werte unterscheiden sich nicht voneinander. Die Versuche zeigen, dass die Reduktion der Prüfbakterien bei den verschiedenen Kalkmilchvarianten (2,5 und 5 kg Kalkhydrat/ m^2 Boden) unterschiedlich ist (Tab 20). Das bedeutet, dass bei einem beinahe gleichen pH-Wert über 13 eine stärkere Reduktion der Prüforanismen erreicht wurde wenn 5 kg Kalk/ m^2 Boden angewendet wurden, als bei der Anwendung von 2,5 Kalk/ m^2 Boden (Tab. 13). Damit ist auch ein weiterer Effekt verbunden, der sich auf die Desinfektionswirkung auswirkt, weil das Erreichen der höheren Kalkkonzentration im Boden auch mit der Ausbringung einer größeren Wassermenge verbunden ist, in diesem Fall der doppelten. Möglicherweise wären diese 2,5 kg Kalk effektiver in ihrer Wirkung, wenn man mehr Wasser zufügen würde, aber die Konzentration des Kalkes von 14,2 % würde dann herabgesetzt und, wie die Ergebnisse belegen (Tab. 13), ist die weniger konzentrierte Kalkmilchlösung (unter 14,2 %) weniger effektiv bei der Bodendesinfektion und die absolute Ausbringungsmenge lässt sich ohne einen Verdünnungseffekt im Boden nicht erhöhen. Die geringere Reduktion der Mikroorganismen war festzustellen bei der Kalkvariante mit der Kalkmilchkonzentration von 12,5 % trotzdem, dass der TS-Gehalt des Bodens an den ersten zwei Tagen niedriger war (Tab. 14) und pH-Wert im Vergleich zur Variante mit 14,2 %-iger Kalkmilch insgesamt höher war* (Tab. 13).

STRAUCH und BÖHM (2002) empfehlen für die Desinfektion von Flüssigmist und Jauche 40-60 kg einer 40 %-igen Kalkmilch pro m^3 Substrat bei 4 Tagen Einwirkzeit.

Bei der Anwendung von Lösskalk in vergleichbaren Mengen pro m^3 Boden war in den eigenen Untersuchungen eine Bodendesinfektion möglich, weil der Boden in einer

*Ein gemessener pH-Wert ergibt sich vom gekalkten Boden, der in der Flasche mit Wasser (0,9 % NaCl-Lösung in Aqua dest.) gelöst ist. Dieser pH-Wert wäre im gekalkten Boden unterschiedlich hoch, wenn man mit einem pH-Meter den pH-Wert unmittelbar im Boden messen würde

Plastikkiste im Wasser stand, so dass keine Abflussmöglichkeit zu den tieferen Bodenschichten vorhanden war. In der Kiste befanden sich 8 kg Boden und 2 kg Wasser. Der TS-Gehalt des Bodens betrug 81 % vor und max. 74 % nach der Behandlung mit Kalkmilch (Tab. 12). Dieser Überschuss an Wasser erniedrigte den TS-Gehalt, was sich auf die Reduktion der Anzahl der Prüfbakterien verstärkt auswirkte. Der endgültige TS-Gehalt des Bodens lag hier bei 73 %. Der pH-Wert des gekalkten Bodens betrug dabei über 12,5 in allen Kalkansätzen. Nur bei der Anwendung von Kalkmilch wurde die Anzahl der Prüfbakterien soweit reduziert, dass deren qualitativer Nachweis am 6. Tag des Versuches nicht mehr möglich war. Bei allen übrigen Ansätzen, bei der Anwendung von Kalk ohne Wasserzusatz, aber mit ähnlichem pH-Wert von über 12,5, konnten die Prüforganismen am 6. Versuchstag noch nachgewiesen werden (Tab. 12). Dieser Ergebnis war zu erwarten und ist logisch.

STRAUCH und BÖHM (2002) desinfizierten Gülle mit TS-Gehalten von max. 10 % innerhalb von 4 Tagen. In den eigenen Untersuchungen war eine Zeitspanne von 6 Tagen nötig, um einen Reduktionseffekt zu erzielen, da der TS-Gehalt des Bodens bei etwa 70 % lag. Bei einem höheren TS-Gehalt des Bodens reichten 6 Tage für eine Keimreduktion nicht aus. So ist es verständlich, dass bei der Ausbringung von Kalkmilch und der damit ausgebrachten Wassermenge eine zentrale Bedeutung zukommt.

Hinsichtlich der einzusetzenden Kalkkonzentrationen berichtet SCHIRM (2005) in mehreren Beispielen von einer Reduktion der Mikroorganismen innerhalb von 24 Stunden. *Salmonella* Senftenberg reduzierten sich im Gärrückstand bei einem TS-Gehalt des Substrates von 25 %, bei einem pH-Wert von über 12,5 und bei max. Temperatur von 32 °C, während der ersten Stunden und von 25 °C nach zwei Stunden der Kalkung um 7 Zehnerpotenzen in einer Zeit von 10 Stunden. Die Enterokokken wurden unter gleichen Bedingungen um 5 Zehnerpotenzen nach 48 h reduziert. Dabei hat SCHIRM (2005) eine CaO-Menge von 200 g/kg TS Substrat, umgerechnet 45 g CaO/kg Substrat, angewandt. Auch ANDREAKIS (2000) und BANAS et al. (2002) (in: SCHIRM, 2005) empfehlen solche Kalkmengen zur Klärschlammbehandlung. Für die Abtötung von Salmonellen im Klärschlamm geben OSTERTAG und STRAUCH (1986 in: SCHIRM, 2005) eine Dosierungsempfehlung von 40-60 g CaO/kg Klärschlamm. BUJOCZEK et al. (2001) dagegen erreichten eine ausreichende Reduktion von Salmonellen innerhalb eines Tages mit einer Kalkdosierung von 20 g/kg TS-Gehalt. PFUDERER (1985; in: SCHIRM, 2005) hat für die Entseuchung von Klärschlamm mit einer Kalkmenge von 0,12 kg CaO/kg TS erzielt und FRITSCHE (2001; in: SCHIRM, 2005) konnte ähnliche Ergebnisse bei Verwendung von 0,1 kg/kg TS Klärschlamm mit 60 % TS Gehalt erzielen.

In den eigenen Untersuchungen wurden vergleichbare Mengen an Kalk (CaO und Ca(OH)_2) von 38 g in Pulverform pro 1 kg Boden angewandt und ein vergleichbarer pH-Wert von über 12,5 erzielt, doch trotz der langen Einwirkungszeit eines stark alkalischen Milieus für eine Dauer von sechs Tagen konnten die Salmonellen am Ende der Einwirkungszeit noch qualitativ nachgewiesen werden (Tab. 12). Es ist nach den vorliegenden Erfahrungen davon auszugehen, dass der mit über 80 % relativ hohe Trockensubstanzgehalt die Ursache für den qualitativen Nachweis der Salmonellen gewesen ist. Deswegen sind die Mengen an Kalk, die von PFUDERER (1985; in: SCHIRM, 2005) und FRITSCH (2001; in: SCHIRM, 2005) zur Desinfektion eines Substrates mit einem TS-Gehalt von 60 % genommen wurden, nicht ausreichend, um einen trockenen Boden zu desinfizieren.

Es muss auch im Hinblick auf die Beeinflussung der mikrobiziden Wirkung von Kalk im Boden berücksichtigt werden, dass bei hohen TS-Gehalten von über 73 % sich relativ schnell CaCO_3 (Karbonatisierung) bilden kann (PESCHEN 1985, OSTERTAG und SRAUCH 1986), der das Versickern von Wasser in den Boden behindert. Ein weiterer Effekt der berücksichtigt werden muss ist, dass sich bei der Einmischung von Branntkalk in den Boden auch der TS-Gehalt des Bodens erhöht und somit noch weniger Wasser verfügbar ist (MIGNOTTE-CADIERGUES et al., 2001).

In den eigenen Versuchen mit der 11,1 %-, 14,2 %-, 20 %- und 33,33 %-igen Kalkmilch wurden im Boden bei einem TS-Gehalt von 80 % die entsprechenden pH-Werte von 13,1 bzw. 13,2 am Tag der Kalkung gemessen. Die pH-Wert-Unterschiede waren gering und sie veränderten sich während des gesamten Untersuchungszeitraumes auch nicht. Die Prüforganismen wurden bei der Anwendung einer 14,2 %-igen Kalkmilch schon 24 h nach der Behandlung mit der Kalkmilch bei einem TS-Gehalt des Bodens von 66 % bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Die kleinste Reduktionsrate der Mikroorganismen wurde im Boden bei einem TS-Gehalt von 75 % bei der Anwendung der 33,33 %-igen Kalkmilch festgestellt. Hierbei war die dem Boden zugegebene Wassermenge am geringsten (Tab. 13). DONG-HO (2006) hatte Branntkalk als Lösung mit einer Konzentration von 0,01 % bis 0,20 % für die Eliminierung von *Salmonella* Typhimurium in Lebensmitteln benutzt. Die Reduktion der Salmonellen wurde 10 min bis 24 Stunden nach dem Kalkzusatz ermittelt. Dabei wurde der größte bakterizide Effekt nach 24 Stunden beobachtet.

In den eigenen Untersuchungen wurde eine höhere Kalkmenge zur Bodendesinfektion benutzt und die Zeitdauer der Kalkeinwirkung betrug mehrere Tage. Wie aus Tabelle 25 und Tabelle 27 ersichtlich wird, waren die Reduktionen der Prüforganismen vom TS-Gehalt des Bodens direkt abhängig. Selbstverständlich wäre es möglich, bei einem geringeren TS-Gehalt des Bodens die Menge an Kalk zu erhöhen, um Boden zu desinfizieren.

Diese Tatsache scheint durch die Aussage von SCHIRM (2005) bestätigt zu werden, dass beim Einsatz von Kalkmilch mit niedrigem TS-Gehalt (<20 %) die Kalkmenge erhöht werden

muss, um denselben Effekt wie bei Substraten mit einem höheren TS-Gehalt bezüglich der Inaktivierung der Erreger zu erzielen. Auch JIMENEZ et al. (2000) bestätigten diese Aussage. Sie stellen fest, dass bei einem niedrigen TS-Gehalt die Kalkdosis erhöht werden muss, um denselben Effekt wie bei einem höheren TS-Gehalt zu erreichen.

SCHIRM (2005), STRAUCH und BÖHM (2002) und JEMENEZ et al. (2000) streben neben einer Alkalisierung auch eine Erhöhung der Temperatur zur Inaktivierung der Krankheitserreger aufgrund der Löschreaktion des CaO in den Substraten an.

Beim Zusatz von Branntkalk in den Boden in den eigenen Untersuchungen kam es nur zu kurzzeitigen und geringen Temperaturerhöhungen, deshalb kann dieser Faktor in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden. Im Gegenteil, je mehr Wasser dem Boden zugefügt wurde, desto geringer erwärmte sich der Boden, aber die Prüforganismen wurden in ihrer Anzahl stärker reduziert, wenn dem Boden mehr Wasser zugesetzt wurde.

Ein besonderer Effekt konnte in den eigenen Untersuchungen mit in den Boden eingemischtem hochkonzentriertem Branntkalk ($3,2 \text{ kg/m}^2$) ohne Wasserzusatz festgestellt werden. Trotz eines pH-Wertes von über 12,8, der über mehrere Tage anhielt und bei einer viel höheren Kalkkonzentration als im Versuch von DONG-HO (2006), wurden keine signifikanten Reduktionen der Prüforganismen erreicht. Am Tag der Bodenkalkung wurde zunächst die Anzahl der Salmonellen und Fäkalkstreptokokken reduziert, aber schon in den nächsten Tagen nahm die Anzahl der Prüforganismen wieder zu und steigerte sich in den darauffolgenden Tagen (Tab. 22, Abb. 27). Eine Erklärung dieses Geschehens ist nicht ohne weiteres möglich. Einerseits war die Wasserverfügbarkeit im Substrat für ein bakterielles Wachstum zu niedrig, andererseits ließen sich mit der gleichen Methode die Prüforganismen problemlos quantitativ erfassen, eine Nachhemmung in den verwendeten Nährmedien ist also auszuschließen. Möglicherweise haben sich in der Matrix kurzzeitig physikalisch-chemische Vorgänge abgespielt, die zur Bildung hydrophober, keimumschließender Partikel geführt haben, die eine Anzüchtung der Bakterien unmöglich machten. Ab dem zweiten Tag der Untersuchung stieg der TS-Gehalt des Bodens (Tab. 16) und am dritten Tag stieg die Mikroorganismenzahl (Abb. 24). Es kam zu einer Steigerung (nicht Vermehrung) der Mikroorganismenkonzentration in einem Bodenvolumen, möglicherweise als eine Folge der Bodenaustrocknung. Im Endeffekt konnten höhere Zahlen der Mikroorganismen pro g Boden nachgewiesen werden. Eine völlige Klärung der beobachteten Erscheinung konnte aber im Rahmen dieser Untersuchungen nicht erfolgen.

Vieles deutet darauf hin, dass die Zusammenhänge, wie sie zwischen pH-Wert (von über 12) und desinfizierender Wirkung des Kalks im Klärschlamm und in der Gülle erkannt worden sind, für den Boden nicht zutreffen. In den eigenen Versuchen musste ein pH-Wert von 13 im künstlich befeuchteten Boden erreicht werden, um die Prüforganismen reduzieren zu können (siehe Tab. 13). Dabei verlangsamte zusätzlich der hohe TS-Gehalt im Boden die Reduktion

der Prüforganismen. SCHIRM (2005) berichtet, dass bei der Kalkung eines Substrates mit höherem TS-Gehalt der optimale pH-Wert $>12,5$ sein soll. Die Ergebnisse der eigenen Versuche zeigten, dass bei der Anwendung von Branntkalk (CaO) sowie auch von Kalkhydrat Ca(OH)_2 in Pulverform und als Kalkmilch, die im Boden entstandenen pH-Werte fast identisch waren (Tab. 12). Die kleinen pH-Unterschiede im gekalkten Boden entscheiden offensichtlich nicht über die Effektivität bei der Mikroorganismenreduktion, sondern die Anwesenheit von größeren Mengen an Wasser, damit die Kalkpartikel besser in den Bodenteilchen verteilt werden können. D.h. unter der Wirkung des hohen pH-Wertes von 12,8 wurden die Mikroorganismen nur unter der Wirkung von Kalkmilch vollständig reduziert (Tab. 12). Zur Beurteilung der desinfizierenden Wirkung von Kalk im Boden gibt es wenige Ansätze in Laborversuchen. Einen, wenn auch in sehr viel kleinerem Maßstab durchgeführten Versuch beschreibt NA-NGAM (2004). Bei einer Prüfung der Wirkung von Branntkalk gegen *Burkholderia pseudomallei* in vitro stellte er fest, dass Branntkalk in einer Konzentration von 10 % und mehr seine bakteriziden Eigenschaften in einer Zeitspanne von 35 Tagen zeigte. Der Boden wurde dazu mit *Burkholderia pseudomallei* vermischt. Im 1. Experiment wurde Branntkalk mit Boden vermischt. Im 2. Experiment wurde Branntkalk über der Bodenoberfläche ausgebracht. Im 3. Versuch wurde eine Kalklösung auf die Bodenoberfläche gegossen. Der höchste pH-Wert von über 12 für die 10%-ige Kalkmilch wurde im 1. Experiment nachgewiesen und zwar in einem viel höheren pH-Wert als in den übrigen Versuchen, wo pH-Werte von 7,3 bis 7,6 gemessen wurden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen überein. Nur Branntkalk in einer Konzentration von 10 % und mehr, der in den Boden eingemischt wurde, war als Inhibitor zum Wachstum von *Bacillus pseudomallei* in einer Zeit von sechs Wochen effektiv.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Kalk mit ähnlicher Konzentration (14,2 %) erfolgreich getestet. Auch die Form der Kalkanwendung (das Vermischen des Kalks mit Boden) wurde mit Erfolg angewandt.

Nach MIGNOTTE-CADIERGUES et al. (2001) wurden Salmonellen im Schlamm mit 2-3 % TS-Gehalt bei einem pH-Wert von 10,7 in 24 h eliminiert und im Schlamm mit 23 % TS-Gehalt bei einem pH-Wert von 10,0 innerhalb von 24 h. Auch JIMENEZ et al. (2000) berichten über eine Stabilisierung des entwässerten (TS-Gehalt von 11,5 bis 29 %) Schlammes mit 15-40 %-iger Kalkmilch .

Bei einem TS-Gehalt im Boden von 30 % (eigene Versuche; siehe Tab. 26) und im Schlamm mit 23 bis 40 % TS-Gehalt (MIGNOTTE-CADIERGUES et al., 2001) reduzierten sich die Prüforganismen relativ schnell.

In den eigenen Untersuchungen mit Branntkalk war der pH-Wert des mit Kalk behandelten Bodens höher als 12,5, hat sich aber auf die zahlenmäßige Reduktion der Prüforganismen kaum ausgewirkt, wenn der TS-Gehalt des Bodens 90 % betrug (Tab. 24).

Bei einer Behandlung mit 15 %, 30 %- und 45 % Branntkalk resultierte ein pH-Wert von 10, 11,5 bzw. 12 (MIGNOTTE-CADIERGUES et al., 2001). Die pH-Werterhöhung war von der Art des Schlammes abhängig. Die Effektivität der Kalkung ist mit dem erreichten pH-Wert verbunden und nicht mit der prozentualen Konzentration des zugegebenen Kalkes (MIGNOTTE-CADIERGUES et al., 2001). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen nur bedingt bestätigt werden, und nur bei einem künstlich erhöhten Wassergehalt im Boden.

In den eigenen Versuchen wurden umgerechnet 25 bis 50 kg Löschkalk mit 1 m³ Boden vermischt (Tab. 20). Nach 24 Stunden wurden die Salmonellen und die anderen Prüforganismen um vier bis sieben Zehnerpotenzen reduziert. In den eigenen Versuchen wurden die Prüforganismen somit, trotz den viel höheren angewandten Kalkmengen, langsamer reduziert, als bei BUJOCZEK et al. (2001, in: SCHIRM, 2005) konnten einen pH-Wert von über 12 in Klärschlamm schon durch den Zusatz von 0,06 kg Branntkalk pro kg TS über zwei Tage und bei der Anwendung von 0,12 kg Branntkalk pro kg TS über 6 Monate nachweisen.

Bei der Anwendung von 1,25 kg Calciumhydroxid/m² Boden in den eigenen Versuchen war der pH-Wert von 12,5 auf 12,1 am 4. Untersuchungstag gesunken (Tab. 15). Erst bei der Anwendung von 2,5 kg und 5 kg Calciumhydroxid/m², blieb der pH-Wert während der sieben Untersuchungstage konstant.

4.3 Ergebnisse der Feldversuche

Wie fast jeder Feldversuch waren auch die hier durchgeführten Untersuchungen von äußeren nicht standardisierbaren Einflüssen abhängig, so sind in den wenigsten Fällen bei Versuchswiederholungen die Rahmenbedingungen identisch, weshalb stets von einer hohen Schwankungsbreite der Ergebnisse ausgegangen werden muss. Auch sind bei Tenazitätsstudien mit gewachsenem Boden oder ähnlich voluminösen oder vergleichbar strukturierten Substraten die Möglichkeiten der Nutzung endogener mikrobiologischer Prüforganismen begrenzt und die gleichmäßige Kontamination größerer Partien mit definierten Prüforganismen aus der Kultur ist außerordentlich schwer zu bewerkstelligen und in den meisten Fällen unmöglich. Deshalb müssen verschiedene, der Situation und dem Substrat angepasste alternative Techniken, verwendet werden. In der Regel werden künstlich kontaminierte Prüfkörper eingesetzt, die von speziellen, mit semipermeablen Membranen abgeschlossenen, mit Prüfkeimsuspensionen befüllten Prüfkörpern bis zu Keimträgern aus Holz oder Metall reichen, je nach Matrix und Anwendungszweck.

4.3.1 Grundsätzliche Bemerkungen zur Verwendung der Keimträgertechnik bei den Untersuchungen zur thermischen Desinfektion

In Vorversuchen wurden Keimträger aus Holz und Aluminium getestet. Dabei hat sich herausgestellt, dass Aluminiumkeimträger für die Feldversuche sich als besser geeignet darstellten.

Die verwendeten Keimträger entsprachen aufgrund ihrer Bauart verschiedenen praxisnahen Anforderungen (HOFERER, 2001, SCHWARZ, 2003). Alle Keimträger, unabhängig von der Bauart, haben eine Gemeinsamkeit, nämlich dass eine definierte Mikroorganismenkonzentration auf ihre Oberfläche zu bringen ist. Die in den Großversuchen benutzten Keimträger aus Aluminium waren 5 cm lang, 1 cm breit und 1 mm dick.

Die Keimträgertechnik sollte die Nachteile, die beim Einmischen einer bakteriellen Suspension in den Boden entstehen, vermeiden. Bei dieser Technik ist eine definierte Konzentration von Prüforganismen 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 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 Keimrückgewinnung mittels der „Abschüttelungstechnik“ eine Modifikation erforderte. Diese Modifikationen betrafen die Reagenzröhrchen, in welchen sich die Glasperlen zur mechanischen Ablösung der Prüfkeime befinden. Durch Vortexen wurden schließlich die Mikroorganismen von der Keimträgern mechanisch entfernt. In jedes Reagenzglas kam nur ein Keimträger. Der Abschüttelvorgang erforderte äußerste Vorsicht. Beim Durchführen bestand die Gefahr des Platzens der Reagenzgläser und die Probe war damit nicht mehr auswertbar wodurch Lücken in den Versuchsergebnissen entstanden sind.

Die Untersuchungen mit Keimträgern zeigten, dass auf den „porösen“ Keimträgern die Prüforganismen schwerer zu inaktivieren waren als auf Keimträgern mit einer glatten Oberfläche. Allerdings ist die Feuchtigkeit der Umgebung und die Antrocknungszeit der Prüforganismen auf den Keimträgern für die Rückgewinnungsrate der Prüforganismen mitentscheidend (KRZYWICKA et al., 1990).

In den hier durchgeführten Untersuchungen war davon auszugehen, dass die Aluminiumkeimträger bessere Wärmeleiter sind als der Boden, was die Reduktionsrate in einem nicht genau zu quantifizierbarem Maße beeinflusste, jedoch war die Anwendung der Aluminiumkeimträger notwendig um die Keimträger, die der offenen Flamme ausgesetzt waren, vor Verbrennung zu schützen. Trotzdem musste auch die kontaminierte Oberfläche

vor der direkten Einwirkung der Flamme geschützt werden, deshalb wurden auch die Aluminiumkeimträger zusätzlich mit Aluminiumfolie umwickelt.

Da damit wieder eine zeitlich verzögerte Wärmeeinwirkung auf den Keimträger zu erwarten war, müssen die Ergebnisse mit den Aluminiumkeimträgern kritisch betrachtet werden.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Bereitstellung von unbehandelten Kontrollen zur Ermittlung der Reduktionsraten, weil zwischen der Präparation der Keimträger und der Aufarbeitung im Laboratorium bei Außenversuchen oft eine erhebliche Zeitspanne vergeht. Abgesehen von den Unterschieden im Antrocknungsverhalten von grampositiven und gramnegativen Bakterien, ließen sich die meisten Prüforganismen von Holz, Aluminium und Kunststoffmembranen nach 24 h Antrocknungszeit quantitativ auswertbar zurückgewinnen, allerdings war der Spielraum, insbesondere bei den Aluminiumkeimträgern, zur Ermittlung einer ausreichend hohen Reduktionsrate (im Bereich von 5 log) sehr eingengt. Obwohl z.B. bei *E. coli* in der Regel kleinere Reduktionsraten auf dem Holz als auf dem Aluminium festzustellen waren, mussten aus verschiedenen Gründen trotzdem Aluminiumträger in den eigenen Versuchen eingesetzt werden. Neben der Brennbarkeit spielte auch die Wiederfindbarkeit eine Rolle. So waren Aluminiumkeimträger im gekalkten Ackerboden leichter zu finden als die Holzstückchen.

Die Keimträgertechnik kann die physikalischen Gegebenheiten im Boden auch nur begrenzt abbilden, weil der Boden Einschlüsse von Luft und Wasser enthält, je größer die Porosität des zu desinfizierenden Bodens, desto besser können die Mikroorganismen bei thermischer und chemischer Behandlung überleben. Zum Beispiel zeigte die qualitative Untersuchung des direkt kontaminierten Bodens auf Enterokokken im 2. Versuch zur Branntkalkanwendung, dass alle Prüforganismen in allen Bodenproben bis zum 6. Tag der Versuchsdauer nachweisbar waren (Tab. 53). Auf dem Aluminiumkeimträger konnten dagegen unter gleichen Bedingungen in vielen Fällen keine Prüforganismen mehr nachgewiesen werden (Tab. 52). Auch im 1. und 3. Versuch zur Branntkalkanwendung ließen sich für die anderen Prüfkeime *E. coli*, und Salmonellen entsprechende Effekte nachweisen (Tab. 48 und 54).

Nach SPICHER und PETERS (1997) muss die Testoberfläche der Keimträger den Verhältnissen entsprechen, wie sie in der Anwendungspraxis gegeben sind. Stahlplättchen haben zwar den Vorteil, dass sie eine definierte Oberflächenstruktur besitzen, was wegen besserer Standardisierbarkeit und der leichteren Rückgewinnung der Prüfbakterien vom Trägermaterial von Vorteil ist (VAN KLINGEREN, 1995). Für die Prüfung der Desinfektion von Bodenpartikeln ist Metall jedoch kein repräsentatives Trägermaterial aber es gab andere weiter oben dargestellte versuchstechnische Notwendigkeiten für ihren Einsatz. Somit ist die Verwendung dieser Keimträger ein notwendiger Kompromiss, bei dem die natürlichen Gegebenheiten nur begrenzt wiedergespiegelt werden.

4.3.2 Ergebnisse beim Einsatz des Bodenverbesserungs- und Sanierungssystems mit Injektorbrenner

Der 1. Versuch hatte neben der Tenazitätsprüfung die Aufgabe die Wiedererfindungsrate der Keimträgerplättchen zu ermitteln. 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. Da von 20 Keimträgern, die im 1. Versuch in den Boden eingebracht wurden, nach der Hitzebehandlung mit dem „BVS-System“ noch 14 wieder gefunden werden konnten wurde diese Technik beibehalten. In den darauffolgenden Versuchen wurden die eingesetzten 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 Ergebnisse aller vier Versuchsdurchgänge zeigen, dass in den Temperaturbereichen, die hier erreicht wurden, nur die als besonders thermoresistent geltenden Prüfkeime in geringer Zahl überlebten, die Ergebnisse sind so zu erwarten gewesen und in sich logisch.

Die Reduktionsrate von *Enterococcus faecalis* auf den Keimträgern betrug in den meisten Versuchsdurchgängen bis zu 6 Zehnerpotenzen.

Insbesondere im 4. Versuchsdurchgang waren aber in einigen Proben auch niedrigere Reduktionsraten festzustellen. Bei den Versuchsdurchgängen 1-3 lagen die gemessenen Temperaturen in der Mehrzahl deutlich über 70 °C, während im vierten Durchgang alle gemessenen Temperaturen zwischen 70 °C und 78 °C lagen. Die Erklärung dafür könnte sein, dass beim 4. Versuchsdurchgang die Rahmenbedingungen durch die hohe Feuchtigkeit des Bodens so ungünstig waren, dass während der Versuchsdurchführung keine ausreichende Erhitzung des Bodens erzielt werden konnte. Die hohe Wärmekapazität des Wassers verbraucht viel Energie zur Bodenkörpererwärmung (HARTGE et al. 1999), die Energiemenge des Injektorbrenners waren jedoch bei allen vier Versuchen gleich. 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. Hinsichtlich der thermischen Inaktivierung des Prüfkeimes *Enterococcus faecalis* in einer komplexen Matrix führte ADE-KAPPELMANN (2009) Versuche zur Pasteurisierung von Bioabfällen vor der anaeroben Faulung durch. Dabei wurden die Temperaturbereiche zwischen 70-90 °C hinsichtlich der Überlebenszeiten ausgewählter seuchenhygienisch relevanter Mikroorganismen und Prüfkeime untersucht.

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. In einer großtechnischen Anlage wurden Salmonellen nach den Ergebnissen von ADE-KAPPELMANN (2009) in einer Stunde bei einer Temperatur von 70 °C in Gülle inaktiviert. 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 (2009). 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 (2009), die Untersuchungen zur Erhitzung von Bioabfällen zusammen mit Gülle durchführte, sind somit 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 bei höheren Wassergehalten 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 und damit möglichen Vorteil 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 war eine Reduktion der Anzahl von *Enterococcus faecalis* im Bereich von 6 Zehnerpotenzen im Vergleich zu den Nullproben.

Nachdem der 1. Versuch erfolgreich verlief, wurde im 2. Versuch das Spektrum der mikrobiologischen Parameter erweitert. Neben *Enterococcus faecalis* wurden *Escherichia coli* 155, *Salmonella* Typhimurium Typ „Zoosaloral“ und *Bovines Parvovirus* (BPV) verwendet.

Bei diesem Versuch erfolgte die Probeentnahme zur Ermittlung der Überlebensfähigkeit der angewandten Prüforganismen 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 (Tab. 30).

In allen Versuchsdurchgängen wurde *E. coli* bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Ein qualitativer Nachweis war noch in einigen Fällen möglich. Die exakte Ermittlung der Reduktionsrate in den Versuchen ist aber leider nicht möglich, weil der Prüfkeim auch auf den Kontrollkeimträgern relativ schnell abstarb und in den meisten Fällen keine 5 Zehnerpotenzen zur Beurteilung zur Verfügung standen.

Salmonellen auf den offen exponierten Keimträgern wurden innerhalb einer Stunde bei Temperaturwerten zwischen 48 bis 89 °C bis unter die Nachweisgrenze reduziert (Tab. 31). Im 2. und 4. Versuch konnten jeweils noch von einigen „geschlossenen“ Keimträgern *S. Typhimurium* in einer Konzentration von $7,2 \times 10^1$ KBE/ml Abschüttelflüssigkeit nachgewiesen werden (Tab. 31 + 35). Das ist mit der verzögerten Erwärmung des durch Aluminiumfolie vor der direkten Flammeneinwirkung geschützten Keimträgers zu erklären. Ob dieser methodische Ansatz die wirklichen Verhältnisse im Boden widerspiegelt, ist fraglich. Jedoch war eine vergleichende Untersuchung mit den bakteriellen Prüfkeimen an dieser Stelle notwendig, weil es nur möglich war, die auf den Trägern befindlichen thermostabilen Parvoviren durch Aluminiumfolie geschützt einzusetzen. Somit geben die mit den Salmonellen ermittelten Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass im Boden direkt exponierte Viren wahrscheinlich schneller inaktiviert werden als hier festgestellt. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der Ergebnisse des 3. Versuches (Tab. 33) zu erwarten, weil es sich zeigte, dass die Versuche mit den direkt exponierten Keimträgern gut mit den Ergebnissen zum qualitativen Nachweis aus dem direkt kontaminierten Boden korrelieren.

Hinsichtlich der thermischen Inaktivierung in einer komplexen Matrix beobachtete GIEß (1992), dass Salmonellen bei der Kompostierung nach 24 Tagen trotz Maximaltemperaturen von 70°C noch nachgewiesen werden konnten. Nach YAMAMORI und YURA (1982), GOFF et al. (1992); MACKEY und DERRICK (1990); SQUIRES et al. (1991); GAGE und NEIDHARDT (1993), PERUSKI und NEIDHARDT (1994), FAREWELL und NEIDHARDT (1998) soll die Inkubation zum Zwecke der Vermehrung von Mikroorganismen oberhalb ihrer optimalen Wachstumstemperatur zu einer erworbenen Thermoresistenz führen. Nach MACKEY und DERRICK (1986,1990) ist eine Bildung von sogenannten hitzeresistenten Hitzeschockproteinen als mögliche Erklärung für diese Thermoresistenz verantwortlich. Bei der Kompostierung könnte das eine Rolle spielen, bei der Pasteurisierung und der hier untersuchten direkten Flammeneinwirkung ist das eher unwahrscheinlich.

Bovines Parvovirus war außer im zweiten Durchgang fast immer quantitativ von den Keimträgern zu reisolieren. Auf die methodisch bedingte Einschränkung der Aussagekraft dieser Ergebnisse wurde weiter oben hingewiesen. Die schlechte Reduktion der Parvoviren im 4. Versuch war wahrscheinlich ebenfalls durch die hohe Feuchtigkeit und damit verbunden einer relativ niedrigen Temperatur des Bodens bedingt. Die Virusinaktivierung geht nach BITTON et al., (1984) im warmen und trockenen Boden schneller als in einem warmen und feuchten. Im 2. Versuch wurde das Bovines Parvovirus innerhalb von 90 Minuten bis unter die Nachweisgrenze reduziert (Tab. 31). Das hängt möglicherweise mit der längeren Einwirkzeit der Hitze zusammen.

Zum 4. Versuch ist generell anzumerken, dass es während der Erhitzung des Bodens zu einer technischen Störung am „BVS-System“ im Bereich des Übergangs der Bodenfläche, die

mit *Enterococcus faecalis* bzw. Bovinem Parvovirus kontaminiert worden war, kam. In diesem Bereich waren die Temperaturwerte dann möglicherweise zu gering um die relativ thermoresistenten *Enterococcus faecalis* im Boden sowie das Bovine Parvovirus auf den Keimträgern vollständig zu inaktivieren.

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 festgestellt, dass *E. coli* bei Temperaturen von 80°C nach 30 min um mehr als 3,6 Zehnerpotenzen im Schlamm reduziert wird. Im Vergleich dazu wurden *E. coli* bei einer Temperatur von 60 °C und 30 min um 6 Zehnerpotenzen im Abwasser reduziert. 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.

In den Bodenproben konnten außerdem jeweils in den 5 Parallelproben Salmonellen als auch *Enterococcus faecalis* nachgewiesen werden.

Die Überlebenszeiten der Prüfmikroorganismen in den Vorversuchen wurden in Relation zu denen der Prüfmikroorganismen 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 einem TS-Gehalt des Bodens von 86 % (Tab. 10). Bei einem TS-Gehalt des Bodens von 75 %, 70°C und 10 min Einwirkzeit haben nur $2,3 \times 10^0$ KBE/g überlebt (Tab. 10). 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 Unterschiede zwischen Labor- und Praxisversuchen.

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. Großversuch wurden zur Bodendesinfektion mit dem Injektorbrenner die Prüforganismen jedoch weniger im feuchten Boden reduziert als in den vorhergehenden Versuchen mit höherem TS-Gehalt des Bodens.

4.3.3 Ergebnisse der Versuche mit Solarfolien

Ausgehend von bereits technisch realisierten Ansätzen zur Nutzung von Sonnenenergie waren die Ergebnisse in dieser Form nicht zu erwarten. Eigentlich war davon auszugehen, dass unter der schwarzen Folie höhere Temperaturen entstehen würden als unter der weißen Folie und im unbedeckten Boden und abgesehen von den Einflussfaktoren Feuchtigkeit und Bodenstruktur ist zu erwarten, dass die Inaktivierungsrate von pathogenen Mikroorganismen mit zunehmender Temperatur steigt (SOLDIERER und STRAUCH, 1991; MA et al., 2007, OSAILI et al., 2007). Auch sind die zu verschiedenen Zeitpunkten unter verschiedenen Wetterbedingungen durchgeführten unterschiedlichen Versuchsansätze in ihren Ergebnissen schwer miteinander zu vergleichen. Es bleibt die Frage offen, welche Faktoren für die teilweise gegenläufigen Tendenzen verantwortlich sind. Die Temperaturen waren zumindest im ersten Versuchsdurchgang nicht so unterschiedlich, dass sie zu unterschiedlichen Resultaten hätten führen müssen. Im zweiten Versuchsdurchgang wo nur die schwarze Folie mit dem unbedeckten Boden verglichen wurde, verhielten sich die Temperaturen ähnlich, lediglich im dritten Versuchsdurchgang zeigten die Temperaturen unter der schwarzen Folie eine höhere Tendenz, denn der Mittelwert im Boden ohne Folie lag hier bei 48,6 °C während unter der schwarzen Folie im Mittel 53,1 °C gemessen wurden. Diese Unterschiede schlugen sich aber nicht in den mikrobiologischen Ergebnissen in Form einer signifikant höheren Reduktion der Prüfkeime nieder.

Neben dem grundsätzlichen Hinweis von MITSCHERLICH und MARTH (1984), dass durch kleine Temperatur- und Feuchtigkeitsunterschiede die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen im Schatten oder in ungeschützten Stellen weder gehemmt noch gefördert wird, könnten eine Reihe von weiteren Einflussfaktoren, die zum Teil wenig logischen Verläufe hinsichtlich der Keimreduktion bedingt haben. Einmal ist nicht völlig auszuschließen, dass bei der relativ hohen Feuchtigkeit unter der Folie sich *Salmonella* Typhimurium bei einem minimalen Nährstoffangebot in Temperaturbereich zwischen 7°C und 49°C vermehrt haben könnte, wodurch die Inaktivierungskinetik durch sich überlagernde Absterbe- und Vermehrungsvorgänge bestimmt sein könnte. Auch kann die Wirkung der UV-

Strahlung auf die Prüfkeime im unbedeckten Boden allerdings nur im oberflächlichen Bereich eine zusätzliche Wirkung entfaltet haben. Zwar lässt sich mittels der Folien Wärme erzeugen, aber sie blockierten die UV-Einstrahlung auf die Versuchsflächen und damit möglicherweise auf die oberflächlich exponierten Prüforganismen. Möglicherweise hat sich bei entsprechenden Temperaturverläufen unter der schwarzen Folie auch ein weiteres, in der Literatur wird für Salmonellen und andere Bakterien ein Phänomen beschrieben, nämlich das der Erlangung einer erhöhten Hitzeresistenz durch Adaptation eingestellt (HUMPHREY, 1990; KATSUI et al., 1982, zit. in: KNOP, 1997; KIM et al., 1989 zit. in: KNOP, 1997). Insbesondere, wenn es zur Vermehrung im feuchtwarmen Milieu unter der Folie gekommen sein sollte, könnte das, wie bei der Anzüchtung von Mikroorganismen oberhalb ihres Wachstumsoptimums, zu einer erworbenen Thermoresistenz geführt haben (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 bzw. 59 °C nach 30 min Vorerwärmung bei 48 °C um das 2 bis 7-fache verlängerte. Solche Adaptationsvorgänge werden auf die Bildung von „heat shock proteins“ zurückgeführt, insbesondere wenn Bakterienzellen innerhalb ihres Wachstumsbereiches in niederen auf höhere Temperaturbereiche erwärmt werden (LEMAUX et al., 1978; PETRUSKI und NEIDHARDT, 1994; KOCH et al., 1998).

Im übrigen ist die Schwankungsbreite der unter verschiedenen Bedingungen gemessenen Überlebenszeiten der hier verwendeten Prüfbakterien und Viren erheblich. STRAUCH et al. (1981) geben ein Beispiel der Abhängigkeit der Tenazität von *S. Senftenberg* im Boden von der Jahreszeit. 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. In den vorliegenden Versuchen wurden die Vermehrungsperioden auch beobachtet (Tab. 44). Die Versuche von STRAUCH et al. (1981) sind allerdings mit den Solarfolienversuchen nur bedingt vergleichbar. Bei Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung benutzte GIEß (1992) *S. Schleißheim* und *S. Senftenberg*_{775W} als Prüforganismen und konnte nach 24 Tagen, trotz Maximaltemperaturen von 70 °C, noch Salmonellen nachweisen. In den eigenen Versuchen herrschten im Boden niedrigere Temperaturen (max. 57 °C). Diese reichten nicht aus, um Salmonellen zu eliminieren. Nach GUO et al. (2002) überlebten Salmonellen (*S. Montevideo*, *S. Poona* und *S. Michigan*) auf Tomaten in Verbindung mit feuchtem Boden 45 Tage bei 20 °C. Dabei stieg die Anzahl der Salmonellen um zwei Zehnerpotenzen. *S. Newport* und *E. coli* überlebten nach KENNEY et al. (2005) in höherer Zahl in höherer Feuchtigkeit als in niedriger Feuchtigkeit. In den eigenen Versuchen förderte eine hohe Feuchtigkeit unter der Folie das Salmonellenwachstum.

Bei MITSCHERLICH und MARTH (1984) ist zu finden, dass *Enterococcus faecalis* zwischen den Monaten Juni bis August doppelt so lange an schattigen Stellen überlebten als an vom Sonnenlicht ungeschützten Stellen. Die Überlebenszeiten betragen in den Monaten September – Oktober 70 Tage im Schatten und nur halb so lange an ungeschützten Standorten. In den eigenen Versuchen wurde der Boden durch Folien von der Sonne abgeschirmt, was nur einen Erwärmungseffekt auslöste und keine UV-Strahlung den Boden erreicht hat. Die Salmonellen konnten im feuchten, warmen Boden unter den abgestorbenen, nassen Pflanzen nicht nur überleben, sondern sich sogar vermehren. Nicht zu erwarten war, dass die Temperatur von 57 °C mehrere Stunden am Tag, die Salmonellen nicht inaktivierte. Eine plausible Erklärung dafür basiert auf oben erwähnten Umständen.

RÜPRICH (1994) hat *E. coli* im mit Gülle gedüngtem Boden nach 225 Tagen wiedergefunden. Im mit Jauche gedüngtem Boden überlebten *E. coli* in 5 cm Bodentiefe längere Zeit und konnte nach einigen Monaten noch in einer Konzentration von 10^4 KBE/g nachgewiesen werden. Nach GAGLIARDI und KARNS (2002) überleben *E. coli* länger im Boden mit einem größeren organischen Anteil (Roggenwurzeln), als im Boden mit weniger organischen Bestandteilen. Die Autoren beobachteten, dass im gefrorenen Boden die *E. coli* 500 Tage überlebten. LANG et al. (2007) stellten fest, dass mit Erhöhung der Bodentemperatur und mit abnehmender Feuchtigkeit sich die *E. coli* reduzierten. In den eigenen Versuchen schufen die verfaulten Pflanzen eine Nahrungsquelle für die untersuchten Bakterien. Ein Anstieg der Temperatur bis 50 °C unter der schwarzen Folie reduzierte die *E. coli* um eine Zehnerpotenz mehr, als im Boden ohne Folie, wo die Temperatur um 40 °C lag. Die Befunde sind logisch und auch mit den Ergebnissen von GAGLIARDI und KARNS (2002) sowie LANG et al. (2007) und RÜPRICH (1994) vergleichbar.

Bei den in den Versuchen eingesetzten Bovinen Parvoviren wurde der Virustiter nach 3 Wochen unter der schwarzen Folie bei einer Temperatur von 35 bis 53 °C von $10^{4,5}$ auf $10^{1,5}$ und $10^{2,5}$ reduziert (Tab. 42). HOFERER (2001) hat festgestellt, dass das Bovine Parvovirus um eine Zehnerpotenz in Schweinegülle bei einer Temperatur von 30 °C in 13 Tagen und bei einer Temperaturen von 50 °C in 30 Stunden um eine Zehnerpotenz reduziert wird. Bovines Parvovirus wurde in Jauche um 5 Zehnerpotenzen bei einer Temperatur unter 20 °C in fünf Wochen reduziert (PESARO et al., 1995).

In den eigenen Versuchen, ähnlich, wie in den Versuchen von HOFERER (2001), herrschte eine Temperatur über 50 °C. Die Anzahl der Viren wurde um 2 Zehnerpotenzen in etwa sieben Tagen reduziert. Trotz der verschiedenen Medien (Boden in den vorliegenden Versuchen bzw. Gülle bzw. Jauche (HOFERER, 2001 und PESARO et al., 1995) in welchen die Versuche durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse der beiden Versuche in etwa vergleichbar.

Zu den Versuchen mit Parvoviren im Boden wurden keine vergleichbaren Versuche in der Literatur beschrieben. Die hier aufgeführten Ergebnisse mit den weitaus weniger thermoresistenten Enteroviren können nur bedingt zum Vergleich herangezogen werden. 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. 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 (TIERNEY et al., 1979).

Insgesamt ist in diesem Zusammenhang festzuhalten, dass keine wirklich vergleichbaren Ergebnisse aus entsprechenden Versuchsanstellungen bisher vorliegen, die eine stichhaltige Erklärung der beobachteten Inaktivierungsverläufe ermöglichen würden. Festzuhalten ist jedoch, dass die Folienabdeckung als Verfahren zur Bodendesinfektion nicht geeignet ist.

4.3.4 Ergebnisse der Bodendämpfung

Anders als in den vorangegangenen Versuchen zur Erwärmung des Bodens mittels Solarfolien wurden hier wesentlich höhere Temperaturen und grundsätzlich feuchte Hitze angewandt, dementsprechend war hier auch eine bessere Wirkung auf die Prüfkeime zu erwarten, was sich in den Untersuchungen auch bestätigte.

Wie bereits weiter oben grundsätzlich festgestellt wurde, werden die Ergebnisse durch die angewendeten Expositionsmethoden für die Prüforganismen beeinflusst, was unvermeidbar war. Ein Einfluss äußerer Faktoren wie des Trockengehaltes des Bodens, ließ sich unter den hier vorgefundenen Bedingungen nicht feststellen. Da die Versuche nur bei sommerlichem Wetter durchgeführt werden konnten, bleibt die Frage des Wettereinflusses auf die Inaktivierung der Prüfkeime offen.

Die Temperatur des dampferhitzten Bodens erreichte Werte über 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 bis unter die Nachweisgrenze reduziert bzw. inaktiviert. Bei den mit der Bakteriensuspension direkt kontaminierten Bodenproben wurde lediglich bei einer von vier untersuchten Proben *Enterococcus faecalis* qualitativ an der Nachweisgrenze festgestellt (Tab. 47).

Möglicherweise hängt dieses solitäre Ergebnis mit Beobachtungen von SPICHER et al. (2002) zusammen, die nachgewiesen haben, dass *Enterococcus faecium* bei einer

Temperatur von 68 °C gegen überhitzten Dampf mehr resistent ist als gegenüber gesättigtem Dampf. Im eigenen Versuch wurde überhitzter Dampf angewandt, der möglicherweise eine etwas schwächere bakterizide Wirkung im Vergleich zum gesättigten Dampf unter den Versuchsbedingungen ausübt. Abweichend von SPICHER et al. (2002) wurde jedoch im Boden eine Temperatur von etwa 90 °C gemessen, also etwa 20 °C höher als in den beschriebenen Versuchen. Deswegen erscheint es plausibler, das Überleben von *Enterococcus faecalis* durch die protektive Wirkung des Bodens, der die Prüforganismen umhüllte, zu erklären.

Das als besonders thermoresistent geltende Bovine Parvovirus wurde in seinem Titer von $10^{4,5}$ auf $10^{0,5}$ bzw. $10^{1,5}$ reduziert, also nicht bis unter die Nachweisgrenze (Tab. 47).

Die relativ hohe Überlebensrate des Virus in dem vorliegenden Dämpfungsversuch lässt einerseits auf eine große Thermoresistenz des Virus schließen (HOFERER, 2001; BÖHM, 2006). andererseits ist insbesondere im Grenzbereich der inaktivierenden Wirkung wahrscheinlich, dass der Boden eine protektive Wirkung auf die Parvoviren ausübt, indem das Durchdringen des Dampfes und damit ein gleichmäßiger Zugang zu allen Virusproben behindert wurde. Hinzu kommt, dass versuchsbedingt die Proben mit dem Virusmaterial bei der verwendeten Expositionstechnik besser geschützt waren als die der Testbakterien. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der inaktivierende Effekt eher unterbewertet als überbewertet wird. 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). Nach ROBERTS et al. (2000) liegt die Inaktivierung des Bovinen Parvovirus bei konzentriertem Gerinnungsfaktor VIII in trockener Hitze und 80 °C bei 72 Stunden. 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. ROBERTS et al. (2000) gehen davon aus, dass eine Resistenz des Bovinen Parvovirus vom Virustyp und vom Medium abhängig ist. Die Untersuchungen von HOFERER (2001) belegen, dass die Inaktivierung von ECBO-Virus auf Polycarbonat-Membranen schneller erfolgt, als in Sandwich-Keimträgern, weil Polycarbonat-Membranen eine bessere Permeabilität zeigten, was zu einem besseren thermischen Einfluss und Inaktivierungseffekt führt.

Somit ist zu vermuten, dass bei dem vorliegenden Dämpfungsversuch die Zeit der Temperatureinwirkung insgesamt zu kurz war um alle Viren abzutöten und dass die methodisch bedingte Fixierung an die Zetapormembran auch die Thermostabilität positiv beeinflusst.

4.3.5 Ergebnisse der Feldversuche zur Kalkung

In den Feldversuchen wurde dem Boden kein Wasser zugegeben. Der Ausgangs-TS-Gehalt des Bodens betrug 86 %. Der TS-Gehalt des Bodens variierte zwischen 60-70% abhängig von den Witterungsbedingungen. Dies führte erwartungsgemäß zu erschwerten Bedingungen hinsichtlich der Wirkung des Branntkalkes der für den Löschvorgang Wasser benötigt. Beim Einsatz von 0,8 kg CaO/m² Boden und 1,6 kg CaO/m² Boden wurde auch keine Desinfektion der gekalkten Flächen erreicht.

Erst bei der Anwendung von 3,2 kg CaO/m² Boden wurde die Anzahl der Fäkalstreptokokken in den hier durchgeführten Versuchen auf den Keimträgern um 5 Zehnerpotenzen von 10⁵ auf 10⁰ KBE/ml bei einem pH-Wert von 12 am 6. Untersuchungstag reduziert (Tab. 54). Die Zeit der Kalkwirkung von 6 Tagen in den eigenen Untersuchungen war wegen des höheren TS-Gehalts im Boden in den eigenen Versuchen länger veranschlagt worden als von STRAUCH und BÖHM (2002) angegeben. Gemäß den Richtlinien des BMELV (ANONYM, 1997) erfolgt in der Teichwirtschaft die Desinfektion der Teichanlagen mit etwa 1000 bis 3000 g Branntkalk pro m² Teichfläche bzw. pro m³ Wasser. Allerdings ist dabei davon auszugehen, dass der Boden praktisch wassergesättigt ist, was hier nicht der Fall war.

Es ist davon auszugehen, dass die Prüfkeime, bzw. die im Boden enthaltenen Krankheitserreger durch die Bodenstruktur geschützt und so für Kalk schwer zugänglich sind. In den Feldversuchen konnte der Boden nicht so vollständig und gleichmäßig zerkleinert werden, auch das ist ein Grund dafür, dass die Zeit der Kalkeinwirkung länger sein musste, als in den Laborversuchen.

Grundsätzlich ist aber auch die Desinfektion strukturierter und bedingt wasserhaltiger Substrate wie Festmist möglich, allerdings wird bei einer Festmistdesinfektion das Festmist-Branntkalk-Gemisch mit einem Wasserstrahl befeuchtet (STRAUCH und BÖHM, 2002). Bei der Bodendesinfektion mit Kalk ist eine derartige Bodenbefeuchtung theoretisch denkbar, jedoch die Zuverlässigkeit und Durchführung einer solche Methode im gewachsenen Boden unter Praxisverhältnissen schwierig. Deshalb wurde in diesem Zusammenhang auch die Anwendung einer fertiggestellten Kalkmilch untersucht bei der davon auszugehen ist, dass sie das zum Eindringen in den Boden notwendige Wasser enthält. Die Desinfektion des Bodens mit einer 16,7 %-igen Kalkmilch ist nach den vorliegenden Ergebnissen eine Alternative.

Insgesamt zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass je fester das Substrat ist, desto mehr Branntkalk muss in den nicht künstlich befeuchteten Boden eingebracht werden. In den eigenen Versuchen waren es 3,2 kg CaO/m². So ein Vorgehen wäre nicht ratsam, denn die Zeit zur Neutralisation des Bodens durch das CO₂ wäre sehr lang und

zwischenzeitlich wäre der Boden nicht nutzbar. Die Ausbringung von Kalkmilch scheint die praxisgerechtere Alternative zu sein, zumindest bei den hier untersuchten relativ schweren Böden, möglicherweise verhält sich das auf leichten Böden anders, was hier aber nicht untersucht wurde.

Die Kalkung der Ackerfläche zur Bodendesinfektion in den vorliegenden Versuchen erfolgte im Herbst. Im nächsten Jahr im April wurde auf dieser Ackerfläche Ackerbohnen gesät und im August erfolgreich geerntet.

Die Bodenkalkung mit einer Kalkmenge von 4 t pro Hektar Boden bewirkte Säurepufferung des Bodens und kalkungsbedingte Verstärkung der mikrobieller Aktivität (ARMBRUSTER et al., 2000).

Das bedeutet ab sofort einen Pflanzenwachstum.

Weil zur Bodendesinfektion in eigenen Versuchen wurde 3.2 kg Kalk pro m² Boden angewandt, etwa sechs Mal mehr als normalerweise zur Säurepufferung des Bodens angewandt wurde, ist fraglich, nach welcher Zeit nach der Desinfektion, die Wachstum der Pflanzen möglich wäre. Erst nach etwa sieben Monaten nach der Kalkung fingen die Pflanzen zu wachsen und diese Zeit von sieben Monaten ist ein Beweis für eine Mindestzeitspanne zwischen der Bodendesinfektion mit Kalk und Pflanzenwachstum auf früher gekalkten Flächen.

5 Schlussfolgerung

5.1 Halbtechnische Versuche mit Kalk

In den Versuchen (Kptl. 3.1.5) wurde der Einfluss des Trockensubstanzgehaltes im Boden, des pH-Wertes und der angewandten Kalkmenge auf die Reduktion von *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Typhimurium* Typ „*Zoosal oral*“ untersucht.

Die Prüforanismen: *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Typhimurium* Typ „*Zoosal oral*“ wurden mit oder ohne Wasserzusatz manuell in den Boden in Plastikcontainer eingemischt und in die Plastikcontainer gefüllt (Kptl. 3.1.5). Danach erfolgte die Kalkung mit verschiedenen Mengen des Kalks. Die, zu unterschiedlichen Zeiten entnommenen Proben wurden quantitativ oder qualitativ untersucht.

Zur Bodendesinfektion wurden Branntkalk (CaO-Pulver) bzw. Weissfeinkalk und CaO-gekörnt, Kalkhydrat (Ca(OH)₂-pulverförmig und in wässriger Form als sog. Kalkmilch angewandt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können zu den Großversuchen mit Kalk Schlussfolgerungen bezüglich Mikroorganismenreduktion bei verschiedenen Wassergehalten im Boden gezogen werden.

Die Halbversuche zeigten, dass im gekalkten Boden mit einem niedrigen TS-Gehalt die

Reduktionen der Mikroorganismen größer sind als im Boden mit einem hohen TS-Gehalt. Die großen Mengen an Wasser, dass in Halbversuchen verwendet wurde, machen die Durchführung der Versauchen im Großtechnischen Maßstab unmöglich.

5.2 Feldversuche

5.2.1 Bodensverbesserungs- und Sanierungssystem mit Injektorbrenner

Es wurde die Tenazität der Prüforganismen: *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium Typ „*Zoosal oral*“ und Parvoviren im Boden unter der Einwirkung der Hitze untersucht. Die Prüforganismen wurden sowohl als Suspension zur direkten Kontamination des Bodens als auch auf Keimträgern mit und ohne Umhüllung mit Aluminiumfolie eingesetzt. Mit dem Gerät zur Bodendesinfektion (Kptl. 3.1.6.1) wurde der mit Prüforganismen kontaminierte Boden gelockert, auf ein Transportband geschleudert, in eine Thermokammer geworfen und mit Propangas erhitzt. Nach dem Verlassen der Thermokammer fiel der erhitzte Boden auf das Feld. Die entnommenen Proben wurden quantitativ und qualitativ untersucht.

Bei Sommerwetter kann eine gute Reduktionsleistung der untersuchten Prüforganismen auf den Keimträgern im Boden erzielt werden. Um jedoch eine einwandfreie Funktion des BVS-Systems zu gewährleisten, müssen bestimmte bodenphysikalische Eigenschaften als unbedingte Voraussetzungen gegeben sein:

Der Boden sollte eine feinkrümelige Struktur bei einem TS-Gehalt von 80-90 % haben.

Die Wärmeabstrahlung von der Bodenoberfläche sollte nicht zu schnell erfolgen, dies kann in kalten Jahreszeiten jedoch nicht verhindert werden.

Die Zeit der Hitzeeinwirkung bzw. die Hitzennachwirkung auf die Bodenpartikel bis 10 cm Tiefe sollte mindestens 90 min bei einer Ausgangstemperatur von 80-90 °C betragen.

Der Boden muss vor der Hitzebehandlung feinkrümelig vorbereitet sein. Bei Frost erfordert dies aufwändige Zusatzmaßnahmen, die in der Praxis nicht durchführbar sind (z.B. eine Bodenerwärmung mit anschließendem Zerkleinern der Bodenstruktur durch Fräsen oder Eggen).

Ein Boden, der maschinell nicht bearbeitet werden kann (zu trocken oder zu nass, zu steinhaltig, gefroren), kann nicht mit dem „BVS-System“ behandelt werden.

5.2.2 Bodendämpfung

Bodenfläche von 15 m² wurde mit einem Dampfautomat behandelt (Kptl. 3.1.6.3).

In dem Versuch wurden *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium und *Bovines Parvovirus* (BPV) zur Validierung der Anlage eingesetzt. In den Boden wurden „offene“ und „geschlossene“ mit Prüforganismen kontaminierte Keimträger eingebracht. Zusätzlich erfolgte die Anwendung einer Keimsuspension. Der Versuchsablauf war mit dem Versuch des Injektorbrenners vergleichbar. Die Dämpfung dauerte 20 min. Danach wurden die Proben entnommen und quantitativ sowie qualitativ untersucht.

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 dieses Verfahren gelten im Prinzip dieselben Voraussetzungen wie bei der Wärmebehandlung des Bodens mit dem „BVS-System“.

5.2.3 Kalkung

In Praxisversuchen zur Kalkung des Bodens wurde im Versuch 1 + 2 Branntkalk in einer Menge von 0,8 kg/m² + 1,6 kg/m² und im 3. Versuch 1,6 kg/m² + 3,2 kg/m² Boden ausgebracht (Kptl. 3.1.6.4).

Die bakterizide Wirkung der Kalkbehandlung des Bodens wurde mit Prüforganismen: *E. coli*, *Enterococcus faecalis* sowie *Salmonella* Typhimurium Typ „*Zoosal oral*“ untersucht. Die Prüforganismen wurden sowohl als Suspension zur direkten Kontamination des Bodens als auch auf Keimträgern ohne Umhüllung mit Aluminiumfolie eingesetzt. Keimträger und Suspension wurden in jedem Versuch mit den 3 obengenannten Bakterienarten auf die jeweilige gekalkte Versuchsfläche ausgebracht. Die Proben wurden aus gekalkten Flächen zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und qualitativ sowie quantitativ untersucht.

Die Bodenkalkung ist ein praxisrelevantes, ökonomisches und umweltfreundliches Verfahren zur Bodendesinfektion. Sie kompensiert die Nachteile des BVS-Systems und der Haubendämpfung.

Mit dem Branntkalk, der auf den Boden (Acker, Wiese) gestreut wird, wird eine Verminderung des Keimdruckes erwartet. Bei einem gezielten Wasserzusatz zum Kalk wird es möglich den Boden zu desinfizieren. Besonders auf steinigem Böden hat die Anwendung von Kalkmilch gegenüber dem Einsatz von technischen Geräten einen Vorteil: mit Kalkmilch ist praktisch jede Bodenfläche desinfizierbar.

Bei der Branntkalkanwendung und einem hohen TS-Gehalt des Bodens wurden die Prüforganismen im Vergleich zu den Ergebnissen der Halbversuche insgesamt in geringerem Ausmaß reduziert.

5.2.4 Solarfolien

Enterococcus faecalis, *E. coli*, *S. Typhimurium* auf Keimträgern ohne Umhüllung mit Aluminiumfolie und Bovine Parvovirus wurden in 5 cm Bodentiefe auf einer Wiese gebracht (Kptl.3.1.6.2).

Zur Durchführung der Tenazitätsuntersuchungen wurden drei Versuchsflächen abgesteckt. Eine der drei Versuchsflächen wurde mit schwarzer Folie abgedeckt, die zweite mit weißer Folie, die dritte wurde nicht abgedeckt und diente als Kontrollfläche. Die Proben wurden aus mit Folien bedeckten Flächen zu unterschiedlichen Zeiten gezogen und qualitativ sowie quantitativ untersucht.

Unter Berücksichtigung der Tatsache der zum Teil sehr heterogenen Ergebnisse mit langen Überlebenszeiten der untersuchten Salmonellen auf den folienabgedeckten Versuchsflächen, kann die Methode der Folienabdeckung, besonders auf Wiesenflächen, keine verlässliche und praxisrelevante Maßnahme zur Desinfektion einer Bodenauslaufhaltung sein. Hinzu kommen enorme Kosten für die Folienabdeckung größerer Flächen und deren Entsorgung.

6 Zusammenfassung

Es wurden zunächst Halbversuche zum Absterbeverhalten ausgewählter Prüforganismen im gekalkten Boden mit unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten durchgeführt.

In Halbversuchen wurden die Reduktionen von Salmonellen, *E. coli* und *Enterococcus faecalis* mit 16,7 %-iger Kalkmilch bei der Anwendung von Löschkalk in Mengen von 2,5 kg/m² Boden erzielt. Bei der Anwendung des Branntkalkes in Mengen von 3,2 kg/m² Boden mit einem TS-Gehalt von 50 % wurden ebenfalls sehr gute Ergebnisse erzielt.

Mit den thermischen Verfahren des „BVS-Systems“ (Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem) mit Propangas, mit der Bodendämpfung und mit der Anwendung von Solarfolien wurde das Verhalten bzw. die Reduktionsraten ausgewählter Bakterien (Salmonellen, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*) und Viren (Parvo-Viren) im praktischen Einsatz überprüft. Diese Untersuchungen wurden durch Übersichtsversuche zum Einsatz von Kalk (Löschkalk, Ca(OH)₂ und Branntkalk, CaO) als umweltfreundliches Naturprodukt zu Desinfektionszwecken ergänzt.

Die thermischen Verfahren des „BVS-Systems“ (Spezialbodenfräse mit Injektorbrennern) als auch die Bodendämpfung sind grundsätzlich in der Lage, ausgewählte tier- und menschenpathogene Mikroorganismen, Parasiten und Viren in den oberen Bodenhorizonten (bis ca. 15 cm Bodentiefe) zu inaktivieren. 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.

Mit der sog. „Haubendämpfung“ ist trotz guter Reduktion der Prüforganismen diese Art der Bodendesinfektion mit großem Vorbehalt zu betrachten. Die zum Dämpfen angewandten Geräte sind ein aufwendiges und teures Equipment mit geringer Flächenleistung. Die Geräte sind außerdem nicht zum Dämpfen von steinigem Böden und Wiesen geeignet.

In Großversuchen wurde eine speziell erarbeitete Methodik des Kalkeinsatzes zur Desinfektion von Boden erprobt. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen ist sie in der Lage, eine ausreichende Reduktion der untersuchten Mikroorganismen auf den damit kontaminierten Flächen zu bewerkstelligen ohne nach anschließender Neueinsaat von Grassamen die Keimung und das Wachstum der Pflanzen negativ zu beeinflussen z.B. durch tieferen Einfräsen oder Pflügen.

Es zeichnet sich ab, dass der Einsatz von Kalk zur Bodendesinfektion neben den umweltfreundlichen Eigenschaften und ökonomischen Vorteilen bei der Anwendung dieses Naturstoffes die technisch weniger aufwendige und damit unter den verschiedenartigsten

vorliegenden Gegebenheiten in der landwirtschaftlichen Praxis generell einsetzbare Lösung darstellen könnte.

Nach Untersuchungsergebnissen, die in Versuchen zur Kalkbehandlung des Bodens erzielt wurden, ist die Anwendung von Branntkalk nach genau vorgegebener Verfahrensweise eine Methode, die sich sowohl bei sehr trockenen als auch nassen Böden erfolgreich anwenden lässt.

Mit ca. 3,2 kg $\text{Ca(OH)}_2/\text{m}^2$ Boden lassen sich gute Ergebnisse hinsichtlich der Inaktivierung von Salmonellen, *E. coli* und *Enterococcus faecalis* erzielen.

Es empfiehlt sich für die Praxis, 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 Bodens 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. Allerdings sollte vor der Einsaat der pH-Wert des Bodens überprüft werden.

Bei gefrorenem Boden scheidet jedoch jede der in der Arbeit dargestellten und untersuchten Methode aus. Ein Einsatz von thermischen Geräten wäre bei Frost zwar denkbar und auch durchführbar. Allerdings wäre dabei der Energieaufwand sehr hoch. Der Einsatz von Kalkprodukten ist ein praxisrelevantes Verfahren zur Bodendesinfektion. Der Kalk in Form von Brannt- oder Löschkalk bzw. als Kalkmilch kann maschinell allerdings auch nur dann optimal auf den Boden auf- und eingebracht werden, wenn dieser mit schwerem Gerät befahr- und bearbeitbar ist. Das bedeutet, Regen- und Frostwetterperioden scheiden ebenfalls aus.

Untersuchungen mit Solarfolien 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 Solarfolien zum Zwecke der Erhöhung der Bodentemperatur in den obersten Bodenschichten um damit eine Reduktion bzw. Inaktivierung pathogener Mikroorganismen zu erhalten, stellt aufgrund der erhaltenen Ergebnisse keine Maßnahme für die Praxis dar.

summary

First, lab tests were carried out for the dying behavior of selected test organisms in the lime-washed soil with different dry substance content. In the lab tests, the reductions of *Salmonella*, *E. coli* and *Enterococcus faecalis* were obtained with 16,7 %-lime milk with the use of diluted lime in quantities of 2,5 kg/m² soil. Using the quicklime in quantities of 3,2 kg/m² soil with a dry substance content of 50 %, very good results were also obtained. The behaviour and/or the reduction rates of selected bacteria (Salmonellen, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* and viruses (Parvo viruses) in field usage were examined. With the thermal procedures of the "BVS- system"(special soil milling cutter with low-pressure torch) using propane gas, soil steaming and solar foils. These investigations were supplemented by general tests for the usage of lime, (diluted lime, Ca(OH)₂ and quicklime, CaO) as pollution-free natural products for disinfection purposes.

The thermal procedures with the "BVS Systems" (special soil-milling cutter) and soil steaming are principally capable of inactivating selected animal and human pathogenic microorganisms, parasites and viruses in the upper soil layers down to about 15 cm soil depth. The results showed that in practice, using the "BVS system" under optimal conditions, ploughed land, highly contaminated with epidemic-hygienically relevant microorganisms, can be disinfected by the heat effect of the system to the extent that with great probability there will be no more infection danger from the soil for free-living animals, domestic animals and agriculturally utilizable animals.

The method of soil disinfection with steam-cups is to be regarded with great reservation, despite good reduction of the test organisms. The equipment used for absorption is complex and expensive providing small surface achievement.

In addition, the devices are not suitable for steaming over stony soil and meadows.

In full-scale trials a well-documented version of the lime employment method was tested for the disinfection of the soil. Based on the available results, this method can lead to sufficient reduction of the examined microorganisms on the contaminated surfaces without requiring new sowing of grass and without negatively affecting the growth of the plants, e.g. by deeper milling or plowing afterwards.

Apart from the pollution-free characteristics and economic advantages associated with the application of this natural substance, it appears that the employment of lime could represent the technically less complex and thus, under the most variable of conditions in agricultural practice, the most generally applicable solution to soil disinfection.

After the test results which were obtained in trials of the lime treatment of the soil, a procedure is given for the use of quicklime, which can be used successfully on both very dry and very wet soil.

With approximately 3.2 kg Ca(OH)₂/m² soil, good results can be obtained for the inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Enterococcus faecalis*. In practice it is advisable to leave the soil, which was treated with the lime, for 14 days and to mill at least 15 cm deep with a soil milling cutter. In this way the alkalization of the soil and/or a pH-decrease in the proximity of neutrality can be achieved. After this a sowing of grasses again (e.g. on chicken or pig discharge surfaces) becomes possible without growth problems. However the pH value of the soil should be examined before any sowing is done.

With frozen soil however, every method examined in this work has been discarded. The use of thermal devices would be conceivable and also feasible with frost. However the energy costs would be very high. The use of lime products is a practice relevant procedure for soil disinfection. The lime in the form of CaO or diluted lime and/or as lime milk can be made up and brought in by machine. However, the lime can only be optimally applied to the soil if the soil is workable and heavy equipment can be used. That means rain and frost periods separate the methods as well.

Investigations with solar foils were accomplished in the summer months with relatively favorable conditions outside with regard to the survival of the examined microorganisms. The results obtained in this manner were very non-uniform and altogether unsatisfactory.

The employment of solar foils in order to increase the soil temperature of the upper layer and thereby gain a reduction and/or an inactivation of pathogen micro organisms, is not a relevant method based on the observed results.

7 Literaturverzeichnis

ABINATI, F. R.; WARFIELD, M. S. (1961): Recovery of a hemadsorbing virus (Haden) from the gastrointestinal tract of calves. *Virology*, 14, 288-289

ABU-ORF, M.M., BREWATER, J., OLESZKIEWICZ, R.S., LAGASSE, P., ARMY, B., GLINDEMANN, D. (2004): Production of class A biosolids with anoxic low dose alkaline treatment and odor management. *Water Science and Technology* Vol. 49 No. 10 pp 131-138 IWA Publishing 2004

ADE-KAPPELMANN, K. (2009): Überprüfung der phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus der anaeroben Behandlung der Bioabfälle. *Vet. med. Diss., FU-Berlin*

ANDREAKIS, A.D. (2000): Treatment and disinfection of sludge using quicklime Sludge Treatment and there effect of pathogene, URL.europa.eu.int./int./comm./environment/sludge/workshoppart2.pdf

ANONYM (1988): Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Report of a WHO expert committee, Technical report series 774, World Health Organisation, Geneva

ANONYM (1997) Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion von anzeigepflichtigen Tierseuchen (331/332-3602-19/1, Stand: Februar 1997)

ANONYM (1998): Bundes-Bodenschutzgesetz (BbodSchG) vom 17. März 1998 (BGBl. I 1998 S. 502, 2001 S. 2331)

ANONYM (2002): Persönliche Mitteilung

ANONYM (2004): Tierseuchengesetz -TierSG (2001) vom 22.Juni 2004 (BGBl. IS. 1248)

ANONYM (2006): Persönliche Mitteilung

ANONYM (2007): Masthähnchen sind häufig mit Salmonellen infiziert. BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung)-Presseinformation-Nr.: 01/2007

ANONYM (2008): EuLA (European Lime Association), Version 1, Februar 2008

ARMBRUSTER, M., KÖHLER, H., FEGER, K.H. (2000): Chemische Zusammensetzung zweier quellnaher Waldfläche – Abflussabhängige Variabilität und Einfluss einer Bodenkalkung. Forstwissenschaftliche Centralblatt, 119 (2000), 249-262

BANAS, S., DELOG, M., MAUL, A., SCHWARZBROT, J. (2002): Sludge hygenization: Helminth eggs destruction by lime treatment. Ascaris eggs as model. UMR 7564 CNRS/UHP, Fakultät der Pharmazie, Universität Nancy

BANDICK N., ACKAN M., KOLBE A. (1998): Salmonella in der Einstreu von Jungmasthühnern. 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“. Garmisch-Partenkirchen, Proc. DVG, Gießen, 23.09.1998, 365-370

BAUMGART, J. (1999): Gramnegative Bakterien. In: BAUMGART, J. (1999): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, S. 152-164, Behr's Verlag, 4. Auflage

BEGOS, P. (2008): Le démarrage d'un lot de volailles, Dossier Avicole, Paysan Breton, semaine du 6 au 13 avril 2007, Document consulted on 9 January

BENZ, W. (1986): Untersuchungen zur biologischen Wirkung von Mikrowellen im Hinblick auf deren Einsatzmöglichkeiten zur Bekämpfung von Unkrautsamen, Nematoden und anderen Schadorganismen. PLITS 4 (2), Verlag J. Margraf, Gaimersheim

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):905-909

BLANC, R., NASSER, A. (1996): Effect of effluent quality and temperature on the persistence of viruses in soil. Water Sci. Technol. 33: 237-242

BOCKEMÜHL, J. (1992): Enterobacteriaceae. Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme-Verlag Stuttgart New York, 138-141

BOLLEN, G.J. (1969): Der Einfluss des Dämpfens auf die biologische Eigenschaften des Bodens. Tuinbouw Mededelingen 32 (1969) 7/8, 354-357

BÖHM, R. (1993): Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 100: 275-278

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

BÖHM, R. (2006): Seuchenhygienische Anforderungen an organische Düngemittel-Schwerpunkt Kommunale Klärschlämme. BMU-Fachtagung“ Perspektiven der Klärschlammverwertung-Ziele und Inhalte einer Novelle der Klärschlammverordnung“ am 06./07. Dezember 2006 in Bonn

BRÄUNINGER, S., FISCHER, I., PETERS, J. (1994): Zur Temperaturstabilität des bovinen Parvovirus. Zbl. Hyg. Umweltmed., 196, 270-278

BRÄUNINGER, S., PETERS, J., BORCHERS, U., KAO, M. (2000): Further studies on thermal resistance of bovine parvovirus against moist and dry heat. Int. J. of Hyg. and Environ. Health 203, 71-75 (2000)

BREITENFELDT, P. (2000): Untersuchungen zur Human und Veterinärhygiene der Bioabfallkompostierung. Agrarwiss. Diss., Univ. Hohenheim

BRENNER, F.W., VILLAR, R.G., ANGULO, F.J., TAUXE, R., SWAMINTHAN, B. (2000): Salmonella nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38, 2465-2467

BUJOCZEK, G., REINERS, R.S., OLASZKIEWICZ, J.A. (2001): Abiotic factors affecting inactivation of pathogens in sludge. Water Science and Technology. Vol.44 (10), 79-84

BURKHARDT, F (1992): Mikrobiologische Diagnostik. Thieme Verlag Stuttgart. New York. Herausgegeben von Friedrich BURKHARDT

BURTON, C.H., TURNER, C. (2003): Manure Management-Treatment strategies for sustainable agriculture. 2nd Ed. Silsoe Research Institute, Wrest Park, Silsoe, Bedford, UK

BUTZ, U.C. (1993): Untersuchungen über die Möglichkeit der Abtötung von Krankheitserregern in Klärschlamm durch Mikrowellen unter besonderer Berücksichtigung parasitologischer Aspekte. Vet. med. Diss., Univ. Gießen

CATALANO, C.R., KNABEL, S.J. (1994): Incidence of Salmonella in Pennsylvania. Egg Processing Plants and Destruction by high pH. J Food Protect. 57, 587-591

CHEN, Y., GAMLIEL, A., STAPLETON, J.J., AVIAD, Y. (1991): Chemical, physical and microbial changes related to plant growth in disinfected soil. In: KATAN, J and De VAY, J.E.(eds) Soil solarisation (pp 103-129), CRS Res LONDON

CEUSTERANS, A., DE CLERCQ, D., AERTSEN, A., MICHIELS, C., COOSEMANS, J., RYCKEBOER, J. (2007): Inactivation of *Salmonella* Senftenberg strain W 775 during composting of biowastes and garden wastes. Journal of Applied Microbiology Volume 103 Issue 1 Page 53-64, July 2007

D'AOUST, J-Y. (1997): Salmonella species. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers ed. by DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. ASM Press, Washington D.,C.,129-158

DEDIE, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.J., WEINKE, T. (1993): Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

DONG-HO BAE, JI-HYE YEON, SHIN-YOUNG PARK, DONG-HA LEE, SANG-DO HA (2006): Bactericidal Effects of CaO (Scallop-Shell Powder) on Foodborne Pathogenic Bacteria. Arch. Pharm. Res. Vol. 29, No. 4, 298-301, 2006

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

DURHAM, P.J. und JOHNSON, R.H. (1985): Properties of an Australian isolate of bovine parvovirus type 1. Vet. Microbiol. 1985 Jun, 10(4): 335-45

DÜRKOP, J. (2000): Viren im Boden. In: WALTER, R. (2000): Umweltvirologie. Viren in Wasser und Boden. Springer-Verlag/Wien. ISBN 3-211-83345-5

FAREWELL, A. und NEIDHARDT, F.C. (1998): Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1998 Sept., 180(17): 4704-10

FATTAL, B., KATZENELSON, E., GUTTMAN-NASS, N., SADOWSKI, A. (1984): Studies on relative survival rates of enteric viruses and bacterial indicators in water, soil and air. Monogr. Virol. 15: 184-192

FOLIQUE MORENO, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., De VUYST, L. (2006) : The role and application of enterococci in food and health. Inter. J. of Food Microbiol., 106, 1-24

FRANZ, C.M., HOLZAPFEL, W.H., STILES, M.E. (1999): *Enterococci* at crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. 1999 Mar 1;47 (1-2):1-24

FRIES, R. (2000): Untersuchungen zur Salmonellensituation in Schweinemastbeständen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Univ., 2000. –2039 S. (Forschungsberichte; 79)

FRITSCH, M. (2001): Hygienisierung von Klärschlamm durch solare Trocknung. Diplomarbeit des Inst. für Agrartechnik in den Tropen und Subtropen und des Inst. für Umwelt- und Tierhygiene, Univ. Hohenheim

GAGE, D.J. und NEIDHARDT, F.C. (1993): Modulation of the heat shock response by one-carbon metabolism in *Escherichia coli*. Jour. Bacteriol. 1993 Apr., 175(7): 1961-70

GAGLIARDI, J.K. und KARNS, J.S. (2002): Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. Environ. Microbiol. 2002 Feb;4(2):89-96

GELDREICH, E.E., HUFF, C.B., Bordner, R.H., KABLER, P.W., CLARK, H.F. (1962): The faecal coli-aerogenes flora of soil from various geographical areas. J. Appl. Bact. 25, 87-93

GIEß, S. (1992): Bioabfallkompostierung: Untersuchungen zur Seuchenhygiene. Hrsg. Ministerium für Umwelt Baden-Württemberg, Kernerplatz 9, 7000 Stuttgart 1

GOFF, S.A., CASSON, L.P., GOLDBERG, A.L. (1992): Heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1984 Nov;81 (21):6647-51.

GUBER, et al., SHELTON, D.R., PACHEPSKY, Y.A. (2005) : Effect of manure on *E. coli* attachment in soil. Published in J. Environ Qual 34:2086-2090 (2005)

GUDEHUS, H.K. (2005): Dämpfen im Gartenbau. Osnabrücker Beiträge zum Gartenbau 6/2005 Fachhochschule Osnabrück.

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

HARDIE, J.M., R.A.WHILEY (1997): Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. of Appl. Microbiol. Symposium Supplement, 83, 1S-11S

HARMSSEN, H. (1954): Die Stuttgarter und Wiener Typhusepidemien als Beispiele der Gefahr fäkaler Salat- und Gemüsekopfdüngung durch Verrieselung und Verregnung. 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 Boden und Erden. Hilstrup: Landwirtschaftsverl.

HEIDER, G., MONREAL, G., MÉSZÁROS, J. (1992): Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels: ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis. Gustav Fischer Verlag

HERBST, B. (2000): Sewage sludge treatment with lime. Schriftenr. Ver. Wasser Boden Lufthyg.. 2000;105:337-40

HESS, E., LOTT, G., BREER, C. (1974): Klärschlamm und Freilandbiologie von *Salmonellen*. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B. 158, 446-455

HOESCHLE, I. (1984): Einfluss von Mikrowellen auf höhere Pflanzen und Bodenorganismen im Hinblick auf Ihre Anwendung im Pflanzenschutz. PLITS 2 (2), Verlag Josef Margraf, Stuttgart

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. Vet. Med. Diss., FU-Berlin

HUMPREY, T.J., CHAPMAN, P.A., ROWE, B., GILBERT, D.J. (1990): A comparative study of the heat resistance of *Salmonellas* in homogenized whole egg, egg yolk or albumen. Epidemiol. and Infect. 104, 237-241

HURST, C.J., GEBRA, C.P., LANCE, J.C., RICE, R. (1980): Survival of enteroviruses in rapid infiltration basins during the land application of wastewater. Appl. Environm. Microbiol. 40(2):192-200

IBIEBELE, D.D., INYANG, A.D., LAWRENCE, C.H., COLEMAN, R.L., PEES, N. (1985): Some characteristics of the behaviour of indicator bacteria in sewage-amended soil. Environm. Pollution, Ser. A 39, 175-182

JIMENEZ, B., BARRIOS, J.A., MAYA, C. (2000): Class B biosolids production from wastewater sludge with high content generated in an advanced primary treatment. Water Science and Technology. Vol. 42 (9), 103-110

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

KATSUI, N.T., TUCHIDO T., TAKANO, M., SHIBASAKI, I (1982): Viability of heat stressed cells of microorganisms as influenced by pre-incubation temperatures. J. Appl. Bact. 53(1), 103-108

KENNEY, S. J., ANDERSON, G.L., WILLIAMS, P.L., MILLNER, P.D., BEUCHAT, L.R. (2005): Persistence of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella* Newport and *Salmonella* Poona in the gut of a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. Int. J. Food Microbiol. 25;101(2):227-36

KESSLER, H.G. (1996): Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik- Molkereitechnologie. 4. Auflage. München

KIM, C.J., EMERY, D.A., RINKE, H., NAGARAJA, K.V., HELVESON, D.A. (1989): Effect of time and temperature on growth of *Salmonella enteritidis* in experimentally inoculated eggs. *Avian Diseases* 33, 735-742

van KLINGEREN, B. (1995): Disinfectant testing on surfaces. *J. Hosp. Infect.* 30, 397-408

KNOP, M. (1997): Hygienische Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung unter Verwendung des Testkeims *Salmonella Enteritidis*. *Vet. Med. Diss., Univ., Leipzig*

KOCH, W., WALTER, H., HOESCHLE, I. (1982): Mit Mikrowellen gegen Nematoden. *Deutsche Zuckerrübenzeitung* 18 (3), 10

KOCH, B., KILSTRUP, M., FOGENSEN, F.K., HAMMER, K. (1998): Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180 (15): 3873-81

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*

KONOWALCZUK, J., SPEIRS, J.I., PONTEFRACT, R.D., BERGERON, G. (1974): Concentration of enteric viruses from water with lettuce extract. *Appl. Microbiol.*, 28 (4); 717-719

KRZYWICKA, H., JANOWSKA, J., TADEUSIAK, B. (1990): Überlebensfähigkeiten von Mikroorganismen auf Flächen in Abhängigkeit von Feuchtigkeit und Temperatur und Einfluss der Austrocknung der Mikroorganismen auf die Desinfektionsmittelresistenz. *Z. ges. Hyg.* 36, Heft 2

KUHLMANN, R.H., (1982): Der Einfluss von Mikrowellen im Durchlaufverfahren auf die Inaktivierung von Viren im Flüssigmist. *Agrarwiss. Diss., Univ. Hohenheim*

KUMAR, B., YADURAJU, N.T., AHUJA, K.N., PRASAD, D. (1993): Effect of soil solarization on weeds and nematodes under tropical Indian conditions. *Weed Research*, Volume 33, 5, 423-429

LAMBERT, R.J. (2003): A model for the thermal inactivation of microorganisms. J. Appl. Microbiol., 95 (3):500-507

LANG, A. (1987): Mikrobiologische Untersuchungen über die Eignung verschiedener Indikatormikroorganismen zur seuchenhygienischen Beurteilung von Klärschlamm
Agrarwiss. Diss., Univ. Hohenheim

LECHOWICH, R.V., BEUCHAT, L.R., FOX, K.J., WEBSTER, F.H. (1969): Procedure of evaluation the effects of 2,450 megahertz microwaves upon *Streptococcus faecalis* and *Sacchomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. 17, 106-110

LEISSNER, A., (1988): Schilf-Binsen-Kläranlagen aus hygienischer Sicht. Das Öffentliche Gesundheitswesen 50, 647-650

LE MINOR, L. & M. Y. POPOFF (1987): Request for an opinion: Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov., nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 465-468

LEMAUX, P.G., HERENDEEN, S.L., BLOCK, P.L., NEIDHARDT, FC. (1978): Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. Cell 13 (3): 427-434

LEVINE, M. (1987): *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. infect., Dis. 155 (3), 377-394

LIEBERMANN, H. (1992): Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie. Gustav Fischer Verlag. Jena- Stuttgart

van LOENEN, M., YZANNE, C. A., T., MULLINS, C.E., WILSON, M.J., FEILDEN, N., WENDY, SEEL, E. (2002): Low temperature / short duration steaming as a sustainable method of soil disinfection. Proceeding of the COR Conference, 26-28th March 2002, Aberystwyth, 211-214

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. Bericht des Instituts für Phytomedizin der Universität Hohenheim

MA, L., KORNACKI, J.L., ZHANG, G., LIN, C.M., DOYLE, M.P. (2007): Development of thermal surrogate microorganisms in ground beef for in-plant critical control point validation studies. *J. Food Prot.* 70 (4): 952-7

MACKEY, B., DERRICK, C.M. (1986): Elevation of heat resistance of *Salmonella* Typhimurium in sublethal heat shock. *J. Appl. Bact.* 61(5), 389-393

MACKEY, B., DERRICK, C.M. (1990): Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bact. Sept.* 69(3), 373-383

MAHNEL, H., STETTMUND von BRODOTTI, H. (1981): Thermoinaktivierung von Viren durch Mikrowellen. *Zbl. Med. Vet. Abt. B.* 28, 509-517

MALACK, M., BUKHARI, A., ABUZAIID, N.S. (2007): Fate of pathogens in sludge sand drying beds at Qateef Khobar and Dammar: A case Study. *International Journal of Environmental Research*, Vol. 1, No. 1, 19-27

de MAN, J.C. (1977): MPN tables for more than one test. *J. Appl. Microbiol.*, 4, 307-316

MARTENS, W., FINK, A., PHILIPP, W., WEBER, A., WINTER, D., BÖHM, R. (1999): Seuchenhygienische Bewertung von Anaerobverfahren. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: „Biologische Abfallbehandlung- Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31., März 1999, Univ. Hohenheim. 150-163

MIGNOTTE-CADIERGUES B., MAUL, A., HUYARD, A., CAPIZZI, S., SCHWARTZBROD, L. (2001): The effect of liming on the microbiological quality of urban sludge. *Water Sci. Technol.* 43(12):195-200

MILLER, S.I und PEGUES, D.A. (2000): *Salmonella* species, including *salmonella typhi*. In:Gerald, L. et al. (eds): *Principles and Practice of Infections Diseases (Fifth Edition, Volumen 2)* Charhill Livingstone Verlag

MITSCHERLICH, E., MARTH, E.H. (1984): Microbiological Survival in the Environment: bacteria and rickettsiae important in human and animal health. Springer-Verlag. Berlin

MOATS, W.A., DABBAH, R., EDWARDS, M. (1971): Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heat bacteria. J. Food Sci. 36, 523-526

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, 1452-1456.

MODROW, S., FALKE, D. (1998): Molekulare Virologie. Spektrum Lehrbuch, Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.

MOESCHLE (2002): <http://www.moeschle.de/tie.htm>

MORENO, M.R.F., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, B., DE VUYST, L. (2005): The role and application of enterococci in food and health. Intern. J. of Food Microbiol. 106, 1-24

MOOSMANN, A., BENZ, W., HAUCK, J., SCHÄFER, E., SCHREINER, U. (1986): Mikrowellen im Pflanzen- und Vorratsschutz. Mikrowellenmagazin 12 (2), 112-115

NA-NGAM, N., ANGKITITAKUL, S., NOIMAY, P., THAMLIKITKUL, V. (2004): The effect of quicklime (calcium oxide) as an inhibitor of *Burkholderia pseudomallei*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 98 (6) :337-41

NIEDERWÖHRMEIER, B., KUHLMANN, R.H., BÖHM, R., STRAUCH, D. (1986): Die Abtötung von Krankheitserregern in Flüssigmist durch Mikrowellenbehandlung. Wien. Tierärztl. Mschr. 73, 151-154

OSAILI, T.M., GRIFFIS, C.L., MARTIN, E.M., BEARD, B.L., KEENER, A.E., MARCY, J.A. (2007): Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in breaded pork patties. J. Food Sci. Mar. 72 (2): 56-61

OSTERTAG, S., STRAUCH, D. (1986): Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen bei der Kalkhydratbehandlung von Rohabwasser und Primärschlamm sowie der Nachkonditionierung von Siloschlamm mit Branntkalk. gwf-wasser/abwasser 127 H.6

PERUSKI, L.F. und NEIDHARDT, F.C. (1994): Identification of a conditionally essential sock protein in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 1207 (2): 165-72

PESARO, F., SORG, I., Metzler, A. (1995) In situ Inactivation of animal viruses and coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl. Environm. Microbiol.* 61(1): 92-97

PESCHEN, N., MATTHES, B., SCHUSTER, G., WOLF, P. (1985): Hinweise zur Technik der Nachbehandlung von Klärschlamm mit Feinkalk. *Zeitschrift: Korrespondenz: Abwasser; KA ; Informationsbl. Für d. Abwasserwesen.* 32 (12): 1076-1079

PFUDERER, G. (1985): Desinfektionswirkung von Kalk bei den verschiedenen Verfahren der Klärschlammbehandlung. *Agrar. Wiss. Diss., Univ. Hohohenheim, Stuttgarter Bericht zur Siedlungswasserwirtschaft Band 89*

PIOCH, G., BRÄUNIG, I. (1989): Die Tenazität der Salmonellen in Umweltmedien und ihre Verbreitung mit Abprodukten. *Z. Ges. Hyg.* 35 (11), 645-649

PIETSCH, O. (1981): Salmonella. In: BLOBEL, H., SCHLIESSER, T.H. (Hrsg.): *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.* Bd. III. Fischer, Stuttgart

PILOTTO, F., RODRIGUES, .B., SANTOS, L.R., KLEIN, W.A., COLUSSI, F.M., NASCIMENTO, V.P. (2007): Antibacterial efficacy of commercial disinfectans on dirt floor used in poultry breeder houses. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* Vol. 9 (2) Campinas

PODBIELSKI, A und LÜTTICKEN, R. (2002): Die Familie der Streptococcaceae. In: KÖHLER, W., EGGERS, H.-J., FLEISCHNER, R., MARRE, H., PFISTER, G. und PULVERER, G. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Urban und Fischer, München-Jena, 260-274

POLLMANN, B., (1995): Tomatensamen als Testorganismen bei der Bioabfallkompostierung. *Labor- und Kompostierungsversuche.* Agrarwiss. Diss., Inst. für Pflanzenproduktion und Landwirtschaftsökologie, Univ. Hohenheim

POPOFF, M-Y., BOCKEMÜHL, J., Mc WHORTER-MURLIN, A. (1992): Supplement 1991 (35) to the Kaufmann-White-scheme. *Res. Microbiol.* 143, 807-811

POPOFF, M.Y., BOCKEMÜHL, J, BRENNER, F.W. (2000): Supplement 1998 (Nr. 42) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. 151, 63-65

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. (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Auflage. Enke Verlag. Stuttgart

RÜPRICH; A. (1994): Felduntersuchungen zum Infiltrationsvermögen und zur Lebensfähigkeit von Fäkalkeimen im Boden nach Gülledüngung. Agrarwiss. Diss., Univ. Hohenheim

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. Int. microbiol. 6 (1):5-9. 2003 Mar.

SCHEFFER, F., SCHACHTSCHABEL, P., BLUME, H.P. (2002): Lehrbuch der Bodenkunde. 15 Auflage, Heidelberg- Berlin Verlag

SHELTON, D.R., GRUBER, A.K., SHEIN, E.F., POLYANSKAYA, L.M., DEVIN B.A., PACHEPSKY, Y.A. (2005):Transport and retention of manure-borne *E. coli* in undisturbed soil columns. Geophysical Research Abstract, Vol. 7, 03731

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

SCHIRM, V. (2005): Entwicklung einer sicheren Methode zur Bioabfallhygienisierung mit Kalk. Vet.-med. Diss., Univ. Gießen

SCHOMBURG, I., MÜLLER, H. E. (1987): Vergleichende Untersuchungen zur Kinetik hygienisch relevanter Mikroorganismen im Belebtschlamm. Zbl. für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Serie B 184, 183-194

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

SELBITZ, H.J. (1992): Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Gustav Fischer Verlag, Jena

SELBITZ, H.J., BISPING, W. (1995): Tierseuchen und Zoonosen: Alte und neue Herausforderungen. Gustav Fischer Verlag, Jena

SELBITZ, H.J., SINELL, H.J. SCHIEGOLEIT, A. (1995): Das Salmonellenproblem. Reihe Vet. Spezial. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

SILLI, S., LENK, V. (1990): Erfahrungen bei der Untersuchung eines abwasserbelasteten Vorfluters auf Darmpathogene, Salmonellaphagen und andere Fäkalparameter. Forum Städte-Hygiene 41, 192-196

SLANETZ, L.W. and BARTLEY, C.H. (1964): Detection and sanitary significance of fecal streptococci in water. Am. K. Publ. Health 54, 609-611

SOLDIERER, W. (1991): Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß einer thermischen Desinfektion von Flüssigmist auf die Vermehrungsfähigkeit ausgewählter Mikroorganismen. Vet.-med., Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

SOLDIERER, W. und STRAUCH, D. (1991): Kinetics of the inactivation of Salmonella during thermal disinfection of liquid manure. Zentralbl. Veterinärmed. B. 38 (8):561-74

SPICHER, G., PETERS, J. (1997): Dependence of microbiological results on the test conditions in efficacy testing of surface disinfectants. Hyg. Med. 22 (3): 123-140

SPICHER, G., PETERS, J., NÜRNBERG, M., SCHWEBKE, I. (2002): Microbicidal efficacy of superheated steam. II. Studies involving *E. faecium* and spores of *B. xerothermodurans* and *B. coagulans*. Int. J. Hyg. Environ. Health 204 (5-6), 309-316

SPILLMANN, S.K., TRAUB, F., SCHWYZER, M., WYLER, R. (1987): Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. Applied and Environmental Microbiology 2077-2081

SPYNU K.I., IAROV, P.I., VUTKAREV, V.P., PREIGEL, I.A. (1998): Survival of the poliomyelitis Virus in environmental objects. *Vopr. Virusol.* 33 (3):327-31

SQUIRES, C.L., PEDERSEN, S., ROSS, B.M., SQUIRES, C. (1991): ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bakteriol.* 173 (14): 4254-4262

STELLMACHER, W. und SCHÖLL, W. (1987): Salmonella-Infektionen. In: Beer, J. (Hrsg.): Infektionskrankheiten der Haustiere. 3 Aufl. VEB Fischer Verlag, Jena, Teil II: 515-544

STRAUCH, D., KÖNIG, W., PHILLIP, W., EVERS, F.J. (1981): Survival of salmonellas and ascaris suum during sludge utilisation in forestry. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (B)* 174 (5): 461-70

STRAUCH, D. (1986): Hygienisch-bakteriologische Untersuchungen bei der Kalkhydratbehandlung von Rohabwasser und Primärschlamm sowie der Nachkonditionierung von Siloschlamm mit Branntkalk. *gwf-wasser/abwasser* 127, H.6

STRAUCH, D. (1987): Hygiene of animal waste management. In D. Strauch (ed.): *Animal Production and environmental health*. Elsevier, Amsterdam, 155-202

STRAUCH, D. (1991a): Wirtschaftsdünger als Vektor für Infektionserreger. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 98, 265-268

STRAUCH, D. (1991b): Survival of pathogenic microorganisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. sci. tech. O.i.e. off int. epizoot.* 10(3): 813-846

STRAUCH, D., BÖHM, R. (2002): *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft* 2. Auflage. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

TIERNEY, J.T., SULLIVAN, R., LARKIN, E.P. (1997): Persistence of poliovirus 1 in soil and on vegetables grown in soil previously flooded with inoculated sewage sludge or effluent. *Appl. Environm. Microbiol.* 33: 109-113

ULMANN, U. (1994): Die Gattung Salmonella und Shigella; Typhus, Paratyphus, Enteritis und Ruhr. In: BRANDIS, H., KÖHLER, W. EGGERS, H.J. PULVERER, G.: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*; 7. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Jena, New York

UNEP (2000) -(UNEP, 1998 oder 2000; zit in MARISKA C.A. VAN LOENEN, 2002): Case studies on Alternatives to Methylbromide: Technologies with Low Environmental Impact. United Nations Environmental Programme. Nairobi, Kenia. 77 p

USEPA (2000): Biosolids technology fact sheet alkaline stabilisation of biosolids. EPA 832-F-00052

VALANCONY, H. (2000): Comparaison de résultats de décontamination entre un sol en terre battue et un sol cimenté », (AFSSA), Journée Nationale Volailles de Chair, ITAVI, Rennes

VASILADIS, P. (1983): The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. J. Appl. Bacteriol. 54, 69-76

VELA, G.R., WU, J.F., (1979): Effect of 2450 MHz microwave radiation on some soil microorganisms in situ. Soil Sci. 121, 44-51

WALLHÄUSSER, K.H. (1995): Praxis der Sterilisation, Desinfektion-Konservierung. 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart

WALTER, R. (2000): Umweltvirologie. Viren in Wasser und Boden. Springer-Verlag/Wien ISBN 3-211-83345-5

WEIGEL, T. (1995): Untersuchungen des Infiltrationsverhaltens von Mikroorganismen in Böden mittels Gruben- und Laborversuchen sowie eines selbst entwickelten Prototyps zur Probenahme ohne Selbstkontamination. Agrarwiss. Diss., Univ., Hohenheim

WELLINGER, A., BASERGA, U., EDELMANN, W., EGGER, K., SEILER, B. (1991): Biogas-Handbuch. Verlag Wirz Ag Aarau

WESTPHAL, P.A., CHRISTENSEN G.L. (1983): Lime stabilisation effectiveness of two process modifications. J. Wat. Poll. Contr. Fed. 55, 1381-1386

WHO (1988): Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Report of a WHO expert committee, Technical report series 774, World Health organisation, Geneva

YAMAMORI, T., YURA, T. (1982): Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance to *Escherichia coli*: K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 860-864

YEAGER, J.G., O' BRIEN, R.T. (1979): Enterovirus inactivation in soil. Appl. Environ. Microbiol. 38 (4): 694-701

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Plastikcontainer mit 8 kg Boden, 300 g CaO, gemahlen eingemischt	34
Abb. 2:	Bodenproben mit 300 g Ca(OH) ₂ und 2200 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden	36
Abb. 3:	Bodenproben mit 300 g Ca(OH) ₂ und 2800 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden	36
Abb. 4:	Bodenproben mit 300 g Ca(OH) ₂ und 3400 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden	36
Abb. 5:	Bodenproben mit 300 g Ca(OH) ₂ und 4000 g Wasser, eingemischt in 8 kg Boden	36
Abb. 6:	Kontrolle; Boden ohne Kalkmilch	37
Abb. 7:	Boden behandelt mit Kalkmilch	37
Abb. 8:	Kontrolle im 4. Laborversuch	38
Abb. 9:	Boden behandelt mit Kalkmilch, Ca(OH) ₂ ohne abgetragene obere Erdschicht	39
Abb. 10:	Boden behandelt mit Kalkmilch, Ca(OH) ₂ mit der abgetragenen oberen Erdschicht	39
Abb. 11:	Container gefüllt mit Boden, vermischt mit CaO	40
Abb. 12:	BVS-Bodensanierungsgerät mit Zugmaschine in Vorbereitung während des praktischen Einsatzes	42
Abb. 13:	Ein mit einer Ackerfräse zur Bodendesinfektion mit dem BVS-Gerät vorbereitetes Feld	43
Abb. 14:	Umkehrbodenfräse mit Rotation gegen die Arbeitsrichtung zur besseren Zerkleinerung der Bodenpartikel bei variabler Tiefeneinstellung	43
Abb. 15:	Thermokammer, in der die Bodenpartikel mit Hilfe der Umkehrfräsen geschleudert werden und somit hohen Temperaturwerten ausgesetzt sind	44
Abb. 16:	Erhitzter Boden mit starker Dampfentwicklung	44
Abb. 17:	6 Versuchsflächen mit Kalk; im Vordergrund 0,8 kg CaOH ₂ /m ² , im Hintergrund 1,6 kg CaOH ₂ /m ²	50
Abb. 18:	Einbringung der mit den Prüfmikroorganismen kontaminierten Keimträger in ca. 5 cm Bodentiefe der jeweils gekalkten Versuchsflächen	51
Abb. 19:	Fräsen der Versuchsflächen bis ca. 15 cm Bodentiefe zur Realkalisierung des Bodens. nach Ende der Versuche	51
Abb. 20:	Konzentrationen <i>Salmonella</i> Typhimurium Typ „Zoosal oral“ in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 55 °C	55
Abb. 21:	Konzentrationen überlebender <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 65 °C	56
Abb. 22:	Konzentrationen überlebender <i>E. coli</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 50 °C	58
Abb. 23:	Darstellung der Medianwerte überlebender <i>Salmonella</i> Typhimurium im Boden bei der Anwendung von Kalkmilch; 38 g Kalk pro 1 kg Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten	62
Abb. 24:	Darstellung der Medianwerte der überlebenden <i>Salmonella</i> Typhimurium Typ „Zoosaloral“ und <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/g im Boden bei der Anwendung einer 16,7%-igen Kalkmilch; 1,25 kg Kalkhydrat(Ca(OH) ₂)/m ² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten	64

Abb. 25:	Darstellung der Medianwerte der überlebenden <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „Zoosal oral“ und <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 16,7%-igen Kalkmilch; 5 kg Kalkhydrat ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)/m ² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten	67
Abb. 26:	Darstellung der Medianwerte der überlebenden <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „Zoosal oral“ und <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 16,7 %-igen Kalkmilch; 2,5 kg Kalkhydrat + 15 kg H ₂ O und 5,0 kg Kalkhydrat+ 30 kg H ₂ O/m ² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten	71
Abb. 27:	Darstellung der Medianwerte der überlebenden <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „Zoosal oral“ und <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk/m ² Boden	74
Abb. 28:	Darstellung der Medianwerte der überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „Zoosal oral“ im Boden bei der Anwendung Von 3,2 kg Branntkalk (CaO)/m ² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten. Trockensubstanzgehalt des Bodens vor der Befeuchtung: ca. 100%	77
Abb. 29:	Darstellung der Medianwerte der überlebenden <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „Zoosal oral“ in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO) pro m ² Boden mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (30 % und 50 % TS) nach unterschiedlichen Kontrollzeiten (in Tagen)	88
Abb. 30:	Darstellung der Mittelwerte der überlebenden <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> in KBE/ml und <i>Bovinem-Parvovirus</i> (in KID ₅₀ in 100 µl) im Boden vor und nach 90 min der Behandlung mit dem Injektorbrenner	87
Abb. 31:	Darstellung der Mittelwerte der überlebenden <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> in KBE/ml und <i>Bovinem-Parvovirus</i> in KID ₅₀ in 100 µl im Boden vor und nach 90 min der Behandlung mit dem Injektorbrenner	93
Abb. 32:	Darstellung der Mittelwerte der überlebenden <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> in KBE/ml und <i>Bovinem-Parvovirus</i> in KID ₅₀ in 100 µl im Boden vor und nach der Hitzeeinwirkung mit einem Dämpfgerät	104
Abb. 33:	Darstellung der Mittelwerte der überlebenden <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> in KBE/ml im Boden bei der Anwendung von Kalk in den Mengen von 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m^2	114

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Auswirkung unterschiedlicher Faktoren auf die Tenazität von Bakterien im Boden (nach SCHWARZ, 2003, modifiziert)	4
Tab. 2:	Untersuchungsparameter in den Wasserbadversuchen zur thermischen Inaktivierung von <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. coli</i> im Boden	30
Tab. 3:	Tabellarische Übersicht zu acht Laborversuchen bei unterschiedlichen Mengen von Kalk und Wasser	33
Tab. 4:	Konzentrationen überlebender <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/g bei verschiedenen Einwirkzeiten im Wasserbad bei 65 °C mit autoklaviertem und nicht autoklaviertem Boden	52
Tab. 5:	Konzentrationen überlebender <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/g bei verschiedenen Einwirkzeiten im Wasserbad bei 65 °C bei unterschiedlichem TS-Gehalt des Bodens	53
Tab. 6:	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 50 °C	53
Tab. 7:	Konzentration überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 55 °C	54
Tab. 8:	Konzentration überlebender <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 65 °C	56
Tab. 9:	Konzentration überlebender <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 67 65 °C	57
Tab. 10:	Konzentration überlebender <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 70°C	57
Tab. 11:	Konzentration überlebender <i>E. coli</i> in KBE/ml bei verschiedenen TS-Gehalten des Bodens im Wasserbad bei 50°C	57
Tab. 12:	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ in KBE/ml bei der Anwendung von Kalk in Mengen von 38 g Kalk pro 1 kg Boden. Keimsuspension mit der Ausgangskeimzahl von 10 ⁸ KBE/ml	59
Tab. 13	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ in KBE/g Boden bei der Anwendung von Kalkmilch; 38 g Kalk pro 1 kg Boden mit einem TS-Gehalt von 81 %; pH-Wert des Bodens: 7,8. Keimsuspensionsversuch	61
Tab. 14:	Ergebnisse der Trockensubstanzgehalte des Bodens im 2. Versuch	62
Tab. 15	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ und Enterokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 16,7 %-igen Kalkmilch; 1,25 kg Kalkhydrat, Ca(OH) ₂ /m ² . (Der pH-Wert des nicht gekalkten Bodens vor dem Versuch: 7,8. Keimsuspensionsversuch)	63
Tab. 16:	Ergebnisse der Trockensubstanzgehalte des Bodens im 3. Versuch	64
Tab. 17:	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ und Enterotokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung einer 16,7 %-igen Kalkmilch; 5 kg Kalkhydrat, Ca(OH) ₂ /m ²	66
Tab. 18:	Ergebnisse der pH-Messung des Bodens in unterschiedlichen Bodentiefen im 4. Versuch	68
Tab. 19:	Trockensubstanzgehalt des Bodens nach Ausbringung von 16,7 %iger Kalkmilch in der Menge so, dass 5 kg Kalkhydrat (Ca(OH) ₂)/m ² Boden eingearbeitet wurden	68
Tab. 20:	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella Typhimurium</i> Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ und Enterokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung von 16,7 %-iger Kalkmilch; 2,5 kg Kalkhydrat/m ² und 5 kg Kalkhydrat/m ² . Angaben in KBE/g Boden	70

Tab. 21:	Ergebnisse der pH-Werte und der Trockensubstanzgehalt des gekalkten Bodens bei der Anwendung von 16,7 %-iger Kalkmilch; 2,5 kg Kalkhydrat/m ² und 5 kg Kalkhydrat/m ² (TS-Gehalt des Bodens ohne Kalk: 88 %)	72
Tab. 22:	Konzentrationen überlebender <i>S. Typhimurium</i> Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ und Entertokokken in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk/m ² Boden nach verschiedenen Einwirkungszeiten	75
Tab. 23:	Ergebnisse der Trockensubstanzgehalte des Bodens Kalkmenge: 3,2 kg Branntkalk/m ² Boden	75
Tab. 24:	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella</i> Typhimurium in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Kalkpulver, CaO/m ² Boden bei der Befeuchtung mit Wasser (Trockensubstanzgehalt des Bodens: ca. 100% vor der Befeuchtung)	76
Tab. 25:	Ergebnisse der pH-Werte und Trockensubstanzgehalte des Bodens bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO)/m ² (Trockensubstanzgehalt des Bodens ca. 100% vor der Befeuchtung)	78
Tab. 26:	Konzentrationen überlebender <i>Salmonella</i> Typhimurium Typ „ <i>Zoosal oral</i> “ in KBE/g Boden bei der Anwendung von 3,2 kg Branntkalk (CaO) pro m ² Boden mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (30 % und 50 % TS) nach unterschiedlichen Kontrollzeiten (in Tagen)	79
Tab. 27:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/ml im Boden nach der Hitze einwirkung mit dem BVS-System	82
Tab. 28:	Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und in Zeitabständen von 1, 15 und 40 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das BVS-System	82
Tab. 29:	Darstellung der Trockensubstanzgehalte des Bodens vor und nach der Behandlung mit dem Injektorbrenner	83
Tab. 30:	Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und Zeitabständen von 0, 1, 10, 25 und 90 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das BVS-System	85
Tab. 31:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium in KBE/ml und <i>Bovinem Parvovirus</i> in KID ₅₀ in 100 µl im Boden nach der Hitze einwirkung mit dem BVS-System	86
Tab. 32:	Temperaturwerte in unterschiedlichen Bodentiefe bei verschiedenen Zeitabständen von 0, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das BVS-System	88
Tab. 33:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium in KBE/ml und <i>Bovinem Parvovirus</i> in KID ₅₀ in 100 µl im Boden nach der Hitze einwirkung mit dem BVS-System	89
Tab. 34:	Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen von 0, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach der Hitzebehandlung durch das BVS-System	91
Tab. 35:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium in KBE/ml und <i>Bovinem Parvovirus</i> in KID ₅₀ in 100 µl im Boden nach der Hitze einwirkung mit dem BVS-System	92

Tab. 36:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> in KBE/ml im Boden mit Folienabdeckung (Anzahl der Mikroorganismen in der Suspension: 10^9 KBE/ml. TS-Gehalt des Bodens ohne Folienabdeckung: 76,8 %; mit Folie: 80,2 %)	95
Tab. 37:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Salmonella</i> Typhimurium Typ "Zoosal oral" in KBE/ml im Boden mit Folienabdeckung. (Anzahl der Mikroorganismen in der Suspension: 10^9 KBE/ml. TS-Gehalt des Bodens ohne Folienabdeckung: 76,8 %; mit Folie: 80,2%)	96
Tab. 38:	Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Folienversuchen	96
Tab. 39:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)	98
Tab. 40:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Salmonella</i> Typhimurium Typ "Zoosal oral" in KBE/ml im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)	98
Tab. 41:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>E. coli</i> 63 in KBE/ml im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)	99
Tab. 42:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Bovinem Parvovirus</i> (BPV) in im Boden unter Solarfolien (Angaben in) KID ₅₀ in 100 µl	99
Tab. 43:	Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Folienversuchen	99
Tab. 44:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Salmonella</i> Typhimurium Typ "Zoosal oral" im Boden unter Solarfolien (Angaben in KBE/ml)	101
Tab. 45:	Temperaturdaten in unterschiedlichen Bodentiefen und verschiedenen Zeitabständen bei den Versuchen mit Solarfolien	101
Tab. 46:	Temperaturverlauf bei der Bodendämpfung nach 20 minütigem Dämpfen	102
Tab. 47:	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Keimträgern zur Inaktivierung von <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium in KBE/ml und <i>Bovinem-Parvovirus</i> in KID ₅₀ in 100 µl im Boden nach der Hitzeeinwirkung mit einem Dampfgerät	103
Tab. 48:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 0,8 kg und 1,6 kg CaO/m ² , quantitativer Nachweis der Prüforganismen in der Abschüttelflüssigkeit der Keimträger, die Werte der Kontrollproben sind aus Tabelle 51 ersichtlich (Angaben in KBE/ml)	106
Tab. 49:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 0,8 kg und 1,6 kg CaO/m ² , qualitativer Nachweis der Prüforganismen aus dem Boden	107
Tab. 50:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden ohne Anwendung von Kalk (Kontrollproben), qualitativer und quantitativer Nachweis der Prüforganismen auf den Keimträgern und in den Bodenproben	108

Tab. 51:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden bei der Anwendung von Branntkalk (0,8 kg und 1,6 kg CaO/m ²), jeweils fünf Keimträger pro Mikroorganismenart und Beprobungstag, Keimträgerversuch (Angaben in KBE/ml)	110
Tab. 52:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 0,8 kg und 1,6 kg CaO/m ² qualitative Untersuchung: Suspensionsversuch	111
Tab. 53:	KBE/ml in der Abschüttelflüssigkeit von den Kontrollkeimträgern kontaminiert mit <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> ohne Anwendung von Kalk, quantitativer Nachweis der Prüforganismen (Angaben in KBE/ml)	111
Tab. 54:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m ² , quantitativer Nachweis der Prüforganismen (Angaben in KBE/ml)	113
Tab. 55:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> im Boden bei der Anwendung von Branntkalk in den Mengen von 1,6 kg und 3,2 kg CaO/m ² , qualitativer Nachweis der Prüforganismen	115
Tab. 56:	Ergebnisse zur Inaktivierung von <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium und <i>Enterococcus faecalis</i> in Kontrollproben im Boden ohne Anwendung von Kalk, quantitativer (Angaben in KBE/ml) und qualitativer Nachweis der Prüforganismen	116

8.3 Abkürzungen

Abb.	Abb.
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BFR:	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BPV	Bovines Parvovirus
BVS-System	Bodenverbesserungs- und Sanierungssystem
CPE	cytopathischer Effekt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FKS	FBS, Fetale Bovine Serum, fötales Kälberserum
FKS	Fäkalstreptokokken, <i>Enterococcus faecalis</i>
g	Gramm
h	hour
Hrsg.	Herausgeber
KBE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
KID ₅₀	Dosis, die 50 % der Zellkultur infiziert
l	Liter
max.	maximal
min.	Minuten
ml	Milliliter
m	Meter
MPN	most-probable-numbar
MPNCU	most-probable-numbar cytopathogenic units (am meisten wahrscheinliche Zahl an infektiösen Viruseinheiten)
n.a.	nicht auswertbar
n	normale (Lösung)
n.n.	nicht nachweisbar
o.g.	obengenannten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Phosphat-buffered-saline
PFU	plaque forming unit (plaquibildende Einheit)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumjonenkonzentration
Pkt.	Punkt
sog.	sogenannte

<i>S. Senft.</i>	<i>Salmonella Senftenberg</i>
<i>S. Typh.</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
sek	Sekunde
sog.	sogenannte
ssp.	species
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
TS	Trockensubstanzgehalt
u. a.:	unter anderen
VO:	Verordnung

8.4 Puffer und Lösungen

Alle Standardchemikalien wurden von der Firma Merck, D-64271 Darmstadt bezogen

Beef-Extrat-Lösung (pH-Wert: 8,5), Zusammensetzung:

4 % Fleischextrakt trocken granuliert

0,5 ml NaCl

Einstellen auf pH 8,5 mit 0,5 n NaOH

Phosphat-buffered-saline (PBS), pH-Wert: 7.5, Zusammensetzung:

NaCl 8,00 g

KCl 0,20 g

H₂PO₄ 0,12 g

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 0,91 g

Aqua dest. ad 1000,00 ml

PH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt

Versen-Trypsin-Lösung (pH-Wert: 7,0), Zusammensetzung:

NaCl 80,00 g

KCl 2,00 g

KH₂PO₄ 2,00 g

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 23,10 g MgSO₄ x 7 H₂O 1,00 g

CaCl₂ x 2 H₂O 1,32 g

Trypsin 1: 250⁵³ 12,50 g

Versen (Tryplex III) 12,50 g

Strptomycin Sulfat 0,50 g

Penicillin G 0,50 g

Aqua dest. Ad 1000,00 ml

PH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. R. Böhm für die Überlassung des Themas und für die Gewährung der Möglichkeit, in Rahmen des Forschungsvorhabens diese Dissertation anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. hab. Dr. h.c. G. Baljer danke ich für die Vertretung der vorliegenden Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen.

Herrn Dr. W. Philipp gilt mein ganz besonderer Dank für die konstruktiven Hinweise und die umfangreiche, tatkräftige Hilfe bei meiner Arbeit.

Bei Herrn PD. Dr. W. Beyer, Frau Dr. B. Hunsinger, Frau Dr. R. Haumacher und Frau Dr. R. E. Marschang bedanke ich mich sehr herzlich für die konstruktiven Hinweise, die zur Gestaltung dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Petra Veit danke ich für Ihre unermüdliche Hilfe bei den Laborarbeiten.

Herrn M. Beller danke ich für die Hilfe bei der Arbeit im Freiland und im Labor.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim bedanke ich mich für die Unterstützung in alltäglichen Arbeiten.

Für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens (Nr. 514-43.20/02OE150) gilt mein bester Dank dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.

Zuletzt danke ich meiner Frau, die mich seit dem Jahr 1997 finanziell bei allen tiermedizinischen Bildungsangelegenheiten unterstützt hat. Meiner Mutter und meinem Sohn danke ich für die Motivation und moralische Unterstützung.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Zuhilfenahme der von mir angegebenen Quellen und Hilfen verfasst habe. Die Arbeit wurde in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht.

Krzysztof Wasiak

édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5465-2



9 17 8 3 8 3 5 19 5 4 6 5 6