



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und

Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie

**Untersuchungen zur Inaktivierung von Salmonella Typhimurium und
Salmonella Java mit Propionsäure und Essigsäure**

Diplomarbeit

vorgelegt von

ABDELAZIZ EL HAIBA

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2011-0068-6

Erstprüfer: Prof. Dr. Karl Steffens

Zweitprüfer: Dr. Joachim Riegel

Neubrandenburg, den 30.08.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungs- & Symbolverzeichnis	3
Danksagung	4
Abstract	5
1. Einleitung	6
2. Theoretische Grundlagen	7
2.1. Desinfektion	7
2.1.1. Begriffsbestimmungen	7
2.2. Bedeutsame antimikrobielle aktive Substanzen für die Veterinärmedizin und bekannte Wirkungsmechanismen	7
2.2.1. Aldehyde	7
2.2.2. Alkalien	8
2.2.3. Alkohole	9
2.2.4. Organische Säuren	9
2.3. Verfahren zur Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel	11
2.3.1. Liste des Verbundes für angewandte Hygiene	11
2.3.2. Desinfektionsliste des Robert-Koch- Institut (RKI)	12
2.3.3. Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)	12
2.4. Salmonellen	12
2.4.1. Taxonomie	13
2.4.2. Physiologie	13
2.4.3. Salmonellen als Zoonoseerreger	14
2.4.4. Salmonella Java	16
2.4.5. Salmonella Typhimurium	17
3. Materialien und Methoden	19
3.1. Materialien und Nährmedien	19
3.2. Arbeitsgeräte	19
3.3. Testkeime	20
3.4. Methodik	20
4. Ergebnisse	23
5. Diskussion	31
6. Zusammenfassung	33
7. Abbildungsverzeichnis	34
8. Tabellenverzeichnis	34
9. Literaturverzeichnis	35
Anhang	38-46

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abb.	Abbildung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
DIN Normung	Deutsche Industrie-Norm des Deutschen Instituts für
EFSA	Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
h	Stunde
KbE	Kolonie bildende Einheit
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
RKI	Robert Koch-Institut
S.	<i>Salmonella</i>
Tab.	Tabelle

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all Jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Steffens für die Aufgabenstellung und Betreuung der Diplomarbeit. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Joachim Riegel, für die Vergabe und Betreuung der Diplomarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dipl. Ing. Andrea Winkler für ihre freundliche Unterstützung bei der praktischen Ausführung meiner Arbeit.

Ich danke meiner Frau und meinem Sohn, die mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt haben.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

ABDELAZIZ EL HAIBA

Abstract

Salmonella is a major cause of food-borne illness in humans. Farm animals and foods of animal origin are important sources of human Salmonella infections.

Regulation (EC) No 2160/2003 on the control of Salmonella spp. And other specified zoonotic agents (EC, 2003b) provides for the setting of Community targets for reducing the prevalence of Salmonella serovars with public health significance in food/animal populations.

A successful and lasting reduction or elimination of salmonella in broiler- farms and poultry industry could be achieved only if hygiene in requirements is implemented at all levels of production.

Organic acids have a long history long being utilized as food additives and preservatives for preventing food deterioration. Organic acids are also used as combination additive in disinfectants, antiseptics and as an antiparasitic (Kramer & Assadian, 2008)

The aim of this study was to investigate comparatively the antibacterial activity of acetic acid and propionic acid against the serovars Typhimurium and Paratyphoid B d-Tartrate (+) (var. Java).

The investigations showed that acetic and propionic acid at a temperature of 40°C more effectively than at 20°C.

3,7% propionic acid at pH4 and 40°C after 30 min exposure showed the reduction of around 5log cfu/ml of total bacteria.

Concentrations of 2% and 4% acetic acid (exposure time 30min) at pH 3,5 and 40°C decreased Salmonella java and Salmonella Typhimurium populations by 4log cfu/ml compared to control.

Salmonella Java appears less sensitive to acetic acid and propionic acid as Salmonella Typhimurium.

1. Einleitung

Salmonellen sind nach wie vor eine der Hauptursachen lebensmittelbedingter Erkrankungen des Menschen. Eier und Geflügelfleisch stellen die Hauptinfektionsquelle für Menschen in der Europäischen Union dar. Mit der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 – zur Bekämpfung von Salmonellen und anderen Zoonoseerregern auf allen relevanten Herstellungs-, Verarbeitungs- und Vertriebsstufen, insbesondere auf der Primärproduktion- ist es ein formuliertes Ziel der Europäischen Union, die Prävalenz von Salmonellen mit Bedeutung für die öffentliche Gesundheit zu senken (EFSA 2006).

Eine erfolgreiche und andauernde Salmonellen-Reduzierung bzw. Eliminierung beim Mastgeflügel konnte erreicht werden, wenn die hygienischen Anforderungen auf allen Ebenen der Produktion umgesetzt werden (22. Jenaer Symposium-Zoonosen des Geflügels).

Organische Carbonsäuren werden vor allem zur Konservierung von Lebensmittel, aber auch als Kombinationspartner in Desinfektionsmitteln, Antiseptika und als Antiparasitika eingesetzt (Kramer & Assadian, 2008).

Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob und bei welcher Konzentration bei der Anwendung von Propionsäure und Essigsäure, Salmonella Typhimurium und Salmonella Java bei Temperaturen von 20°C und 40°C inaktiv werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Desinfektion

2.1.1. Begriffsbestimmungen

Die Bezeichnung „Desinfektion“ ist aus der medizinischen Praxis und bedeutet wörtlich „das Eliminieren von Infektionen“. Heutzutage bedeutet die Desinfektion nicht nur die Eliminierung von unerwünschten Mikroorganismen sondern auch die Verhinderung der Übertragung von Infektionskeimen durch deren Abtötung oder Inaktivierung (E.BESSEMS, 2003).

Nach Flamm (1983) ist die Desinfektion als „eine gezielte Reduktion der Anzahl bestimmter unerwünschter vermehrungsfähiger Mikroorganismen durch chemische oder physikalische Inaktivierung zu bezeichnen, so dass sie unter den gegebenen Umständen keine Schäden (Infektion, Verderbnis) mehr verursachen können“.

Die Desinfektion ist also von der Sterilisation zu unterscheiden, indem die Desinfektion nur ein beschränktes Spektrum von Mikroorganismen erfasst. Die Sterilisation umfasst die vollständige Abtötung aller Mikroorganismen einschließlich der besonders widerstandsfähigen Bakteriensporen.

2.2. Bedeutsame antimikrobielle aktive Substanzen für die Veterinärmedizin und bekannte Wirkungsmechanismen

2.2.1. Aldehyde

Aldehyde werden umfangreich in der Desinfektion und Antiseptik genutzt. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Formaldehyd, Glutaraldehyd und Glyoxa.

Als erster Aldehyd wird Formaldehyd eingesetzt. Die Gründe hierfür sind das breite Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Viren und Bakteriensporen. Es wird vor allem als Flächendesinfektionsmittel und bei der Gasdesinfektion in geschlossenen Räumen angewendet.

Formaldehyd (CH_2O) ist ein farbloses, stechend riechendes, entzündbares Gas, welches in Wasser leicht löslich ist.

In Wasser gelöstes Formaldehyd wird als Formalin bezeichnet (enthält 35-37% Formaldehyd). Der optimale pH-Wert bei dem Formaldehyd wirksamer ist, liegt zwischen 3 und 10 (pH-Wert von Formalin 2,8 bis 4).

Formaldehyd neigt zur Polymerisation, was durch die Anwesenheit von Wasser, Säuren und Alkalien begünstigt wird.

In der Luft wird Formaldehyd langsam zu Ameisensäure oxidiert.

Die Wirkung des Formaldehyds wird durch Ammoniak, Alkalien, H_2O_2 , Jod, Kaliumpermanganat, Tannin, Eisen, Gelatine und Schwermetallsalzen gehemmt, da die Aldehydgruppe mit Aminogruppen reagiert.

Formaldehyd ist jedoch bei oraler oder aerogener Aufnahme giftig und führt bei Hautkontakt zu Reizungen.

„Im Jahr 2004 wurde Formaldehyd durch die International Agency of Research on Cancer (IARC) von, wahrscheinlich humankarzinogen, in humankarzinogen 2 umgestuft. Dieses Risiko ist jedoch offensichtlich erst bei chronischer Exposition am Arbeitsplatz ab Raumluftwerten von mehr als $124\mu\text{g}/\text{m}^3$ relevant“.

Wegen der toxischen Risiken und lokalen Reizwirkungen ist der Einsatz von Formaldehyden zur Flächendesinfektion nicht mehr zu empfehlen (Kramer & Assadian, 2008).

2.2.2. Alkalien

Stark alkalisch wirkende Substanzen werden im Veterinärbereich häufig zur Grobdesinfektion von Oberflächen angewandt.

Zu dieser Stoffklasse gehört unter anderem Natriumhydroxidlösung (Natronlauge), Kalilauge und Kaliumhydroxid-Lösung (Kalkmilch).

Die Natronlauge wird am häufigsten verwendet. Die antimikrobielle Wirksamkeit der Natronlauge ist von dem pH-Wert abhängig, wobei pH-Werte >11 für Bakterien und pH-Werte >13 für Viren zu einem „pH-Schock“ führen. Natronlauge führt zu Verätzungen an der Haut und Schleimhaut. Bei der Verwendung von NaOH ($>5\%$) muss das Gefahrensymbol „ätzend“ angegeben werden.

Die freigesetzten OH-Ionen der Lauge wirken hydrolytisch. Dadurch kommt es zur Quellung und teilweisen Auflösung von Eiweißbestandteilen, wodurch der oberflächliche Abschluss der Erregerzellen gestört wird und die Tiefenwirkung der Alkalien zu erklären. Wegen dieser Eigenschaften werden Alkalien auch häufig zu anderen Desinfektionsstoffen zugesetzt (HANS-HASSO FREY; WOLFGANG LÖSCHER, 2010).

2.2.3. Alkohole

Alkohole werden hauptsächlich in der Medizin weiterverbreitet und zur Antiseptik eingesetzt, da sie schnell trocknen, rascher wirksam und hautverträglich sind. Das Wirkungsspektrum ist breit, wirken aber nicht sporozid.

Die wichtigste Wirkung der Alkohole besteht in Ihrem Einfluss auf die Membranen von Mikroorganismen. Die mikrobizide Wirkung der Alkohole nimmt mit dem Molekulargewicht und der Kettenlänge zu, wobei das Maximum bei 5-8C-Atomen liegt.

Im Vergleich zu anderen Wirkstoffen werden jedoch erheblich höhere Konzentrationen benötigt.

Alkohole wie Ethanol (C_2H_5OH) und Isopropanol ($(CH_3)_2CHOH$) sind klare, farblose Flüssigkeiten. Sie sind Wasser mischbar und ihr optimaler Wirkungsbereich liegt im sauren pH-Bereich (Kramer & Assadian, 2008).

2.2.4. Organische Säuren

„Organische Carbonsäuren werden vor allem zur Konservierung, aber auch als Antiparasitika eingesetzt“.

Nach BÖHM (1987) wirken organische Säuren sehr gut gegen Bakterien und behüllte Viren. Der wirksame Bestandteil der organischen Säuren ist die Carboxylgruppe (COOH-Gruppe). Die antimikrobielle Wirkung von aliphatischen Fettsäuren insbesondere kurzer und mittlerer Kettenlängen ist an das undissoziierte Molekül (R-COOH) gebunden (Kramer & Assadian, 2008). Sie wirken als Gesamtmolekül, indem sie die Innenstruktur der Zelle durch Hydrolyse, Wasserentzug und Oxidationsvorgänge zerstören (BREMER, 2003).

Wallhäußer (1988) unterscheidet jedoch zwischen der reinen Säurewirkung durch Absenken des pH-Wertes und der ausschließlichen Wirkung des undissoziierten Säureanteils. Dieser kann in der Mikroorganismenzelle eindringen und dort wichtige Stoffwechselfunktionen, in der Regel durch Hemmung der Enzymsysteme, unterbrechen. Der Anteil undissoziierter Säure sinkt bei steigendem pH-Wert.

Zu den organischen Säuren gehören unter anderem die Essig- und Propionsäure. Sie sind Vertreter der aliphatischen Monocarbonsäuren, welche eine Carboxylgruppe besitzen, die in wässriger Lösung in Protonen und negativ geladene Säure-Anionen dissoziieren (P.BREMER, 2003).

Essig- (CH_3COOH) und Propionsäure ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) sind klare, farblose Flüssigkeiten mit stechendem Geruch, die mit Wasser und Ethanol in jedem Verhältnis mischbar sind. Das Wirkoptimum von Essigsäure liegt bei ca. pH 3-6 während der von Propionsäure bei 3,5 – 4,5 (Tab.1).

Tab.1: physikalische und chemische Eigenschaften von Essig- und Propionsäure

(Kramer & Assadian, 2008; CHERRINGTON et al., 1991)

Name	Formel	Molare Masse	Schmelzpunkt (°C)	Siedepunkt (°C)	Dissoziationskonstant (pKa) bei 25°C	Optimaler pH-Wert	Geruch
Essigsäure	CH_3COOH	60,05	16,6	116-118	4,75	3,0-6,5	stechend
Propionsäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	74,08	-21,5	141,1	4,87	3,5-4,5	stechend-ranzig

Die antimikrobielle Wirkung der Essigsäure beruht in erster Linie auf die Absenkung des pH-Wertes. Es wird vermutet, dass die undissoziierte Essigsäure infolge ihrer besseren Lipidlöslichkeit besser in das Zellinnere eindringen kann. Bei pH 3 ist die antimikrobielle Wirkung zwischen 10- bis 100mal stärker als die anderen Säuren.

Die antimikrobielle Wirkung der Propionsäure ist von dem Anteil an undissoziierter Säure und dieser wiederum vom pH-Wert abhängig (WALLHÄUßER, 1995).

So beruht beispielsweise die Wirkung der *organischen Säuren*, neben der reinen Säurewirkung, auch auf dem undissoziierten Säureanteil, der mit steigendem pH-Wert absinkt, im Neutralbereich nahezu vollständig dissoziiert und damit beinahe unwirksam ist (WALLHÄUßER, 1988).

Bezüglich der Wirksamkeit von *organischen Säuren* unter Eiweißbelastung herrscht eine kontroverse Auffassung. Nach BÖHM (1987) soll es durch den Zusatz von Eiweiß zu Protonenwanderungen kommen und somit zu einer Abpufferung der Wirksamkeit. Andere Autoren hingegen beschreiben, dass die Wirksamkeit der organischen Säuren durch Eiweißbelastungen nicht vermindert wird (BREMER, 2003).

Essig- und Propionsäure sind biologisch abbaubar und weisen keine ökologisch negativen Effekte (Kramer & Assadian, 2008).

2.3. Verfahren zur Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel

Bei der Desinfektionsmittelprüfung werden zwei Gruppen von Tests angewandt: Suspensionstests und praxisnahe Tests. Diese Prüfmethode gewährleisten mehr oder weniger standardisierte Bedingungen, sodass ein objektiver Vergleich verschiedener Präparate möglich ist.

In Deutschland existieren drei Desinfektionsmittellisten für unterschiedliche Anwendungsbereiche. Für die Aufnahme in diese Listen wurden jeweils eigene Prüfmethode entwickelt. Eine Vielzahl europäischer Normen findet zum Teil auch bei Listungsverfahren Anwendung.

2.3.1. Liste des Verbundes für angewandte Hygiene

Für die Aufnahme in diese Liste sind Gutachten gemäß den Standardmethoden der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel und deren entsprechenden Anforderungen erforderlich.

Die Methoden beinhalten sowohl Suspensionstests als auch praxisnahe Tests und berücksichtigen zum Teil bereits europäische Normen.

2.3.2. Desinfektionsliste des Robert- Koch- Institut (RKI)

Das Robert- Koch- Institut hat Methoden für die Flächen- und Instrumentendesinfektion beschrieben. Die Prüfungen werden vorwiegend an besonders resistenten Mikroorganismen wie Mykobakterien und unbehüllte Viren durchgeführt, die in geronnenes Schafblut eingebettet werden.

Bei der Fläche muss das Produkt bei Einwirkzeiten von 1, 2 oder 4 Stunden eine Reduktion von mindestens 4log- Stufen erreichen.

2.3.3. Richtlinien der Deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)

Die Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel der DVG wurden für den Lebensmittelbereich und die Tierhaltung entwickelt (DVG 2000).

Auch diese Prüfrichtlinien sehen ein zweistufiges Verfahren von quantitativen Suspensions- und Praxisnahen Tests vor. In beiden Bereichen wird der Wirkungsbereich Bakterien und Pilze abgedeckt.

Die Prüfmethode von Desinfektionsmittel in der Tierhaltung schließen zusätzlich Angaben zur Wirksamkeit gegen Mykobakterien, Parasiten und behüllte Viren ein (Kramer & Assadian, 2008).

2.4. Salmonellen

Salmonellen gehören zur Familie der Enterobacteriaceae und sind in der Regel bewegliche, gramnegative Stäbchen, nicht- Sporenbildende, fakultativ anaerobe Bakterien (FEHLHABER, 2007).

2.4.1. Taxonomie

International verbindliche Grundlagen für die Ordnung der Salmonellen stellt Kaufmann- Le- Minor-Schema (früher Kaufmann-White-Schema). Die Serovare werden auf diese Art, anhand ihrer Oberflächen-(O)- und Geißel-(H)- Antigene eingeordnet.

Insgesamt sind derzeit etwa 2.500 Serovare bekannt, die eine Gattung mit den beiden Arten, nämlich *Salmonella* (*S.*) *enterica* mit den Subspezies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica* und sowie *S. bongori* bilden (s. Abb.1)(RKI, 2009).

Die fünf letztgenannten Subspezies von *S. enterica* und *S. bongori* kommen vorzugsweise bei Kaltblütern vor und sind lebensmittelhygienisch weniger bedeutend.

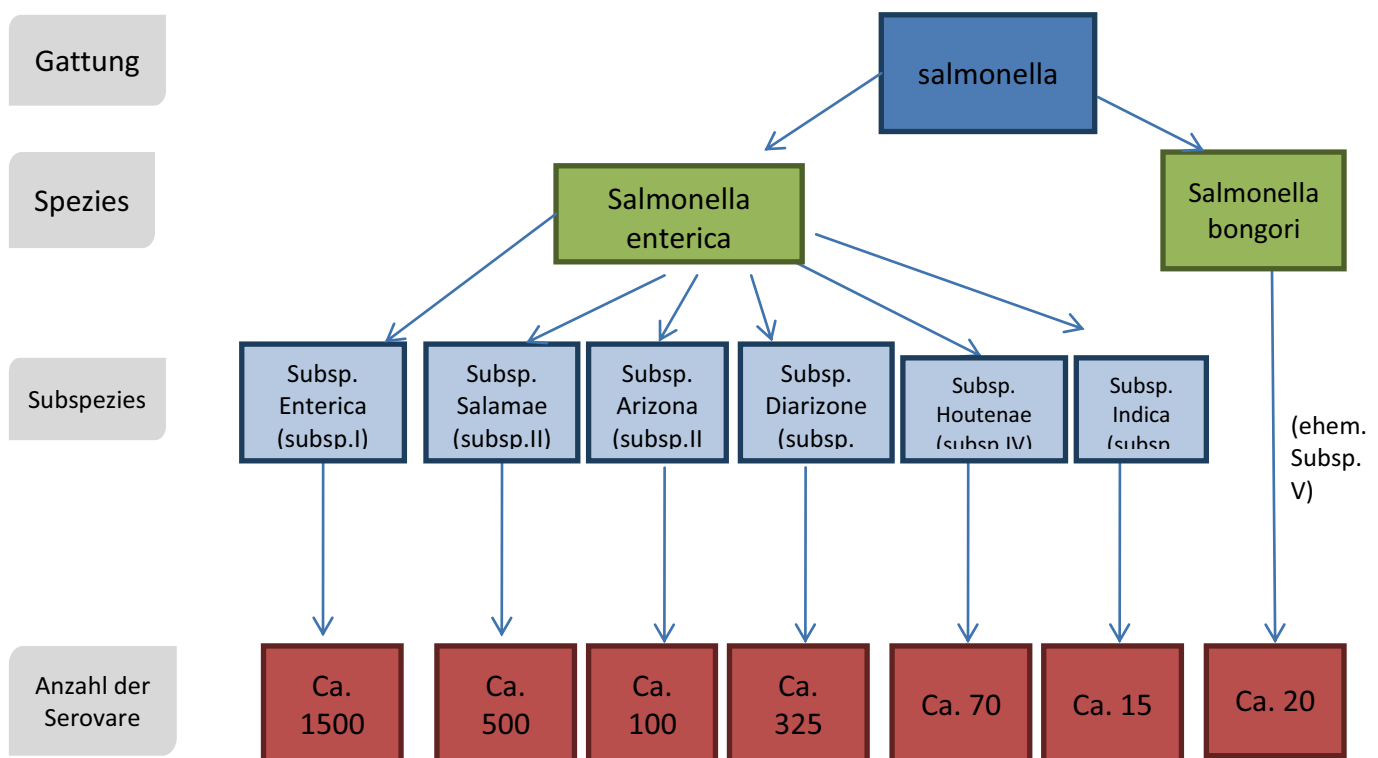


Abb.1 Taxonomie und Nomenklatur der Gattung *Salmonella* (RKI, 2009)

2.4.2. Physiologie

Salmonellen sind fakultativ anaerob wachsende Stäbchen mit einer Größe von 0,7-1,5 x 2,5µm. Sie sind gramnegativ, Oxidase-negativ und Katalase-positiv.

Temperatur

Salmonellen sind sehr hitzeempfindlich. Die Wachstumstemperatur für Salmonellen liegt bei 37°C (Optimum), 48°C (Maximum) und bei 7-10°C (Minimum) die D-Werte bei 65°C liegen Stammspezifisch in einem Bereich zwischen 0,02 und 0,25 Minuten (KRÄMER, 2007). Bestimmte hitzeresistente Stämme (S. Senftenberg 775 W: D_{72} 0,09min, S. Typhimurium: D_{72} 0,003min) können allerdings auch bei bis zu 54°C noch wachsen. Manche Salmonellen zeigen auch psychotrophe Eigenschaften und wachsen noch bei 2°C (in Hackfleisch nach 24h), allerdings ist die Vermehrung unter 15°C stark eingeschränkt. Bei Gefriertemperaturen reduzieren sich die lebensfähigen Zellen langsam, wobei besonders Bakterien in der log-Phase geschädigt werden (B. HAIDERER, 2010).

pH-Wert

Bei Salmonellen liegt das pH-Minimum bei 4,0 bis 4,5. Das Maximum liegt bei pH 9,0 und das Optimum bei pH 6,5 und 7,5 (KRÄMER, 2007). Nach GRAU (1983) wächst Salmonella Typhimurium bei 25°C bei einem pH-Wert > 6 besser als bei einem pH-Wert < 5,7. ALFORD und PALUMBO (1969) haben bei niedrigeren pH-Werten (pH 5,0) und hohem Salzgehalt (NaCl 8%) eine Wachstumshemmung von Salmonellen festgestellt (V. KYSELOVA, 2009). Der Antimikrobielle Effekt von Essigsäure und Propionsäure ist größer als der von Zitronensäure. Der Antimikrobielle Effekt von Ameisen-, Essig- und Propionsäure gegen S. Typhimurium sinkt bei steigendem pH-Wert und zunehmender Länge der Fettsäuren (http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000000448/2_kap2.pdf;jsessionid=B7C7E305FDBBF7CC613DFFBA6EE7E593?hosts=).

Durch eine zunächst milde pH-Wert-Senkung auf 5,5 bis 6,0 (preshock), gefolgt von einer drastischen Absenkung auf $\leq 4,5$ (acid shock), kommt es zur Ausbildung einer „acid tolerance response (ATR)“ (B. HAIDERER, 2010).

2.4.3. Salmonellen als Zoonoseerreger

Nach Campylobacter zählen Salmonellen-Infektionen zu den wichtigsten Zoonosen. Die gemeldeten Salmonellen-Infektionen des Menschen sind in Deutschland im Jahr 2007 gegenüber dem Vorjahr um 5% auf 55400 Erkrankungen angestiegen (Abb.3).

Während es sich in den 70er bis Mitte der 80er Jahren hauptsächlich um *S. Typhimurium* handelte, so wurde dieses Serovar in den folgenden Jahren durch Enteritidis abgelöst (RODRIGUE et al. 1990, Fernandez, 2007). Seitdem ist *S. Enteritidis* bei menschlichen Erkrankungen die häufigste Ursache für Salmonellose mit 71% gefolgt von *S. Typhimurium* mit 23% der typisierten Salmonellen-Infektionen (HARTUNG, 2009).

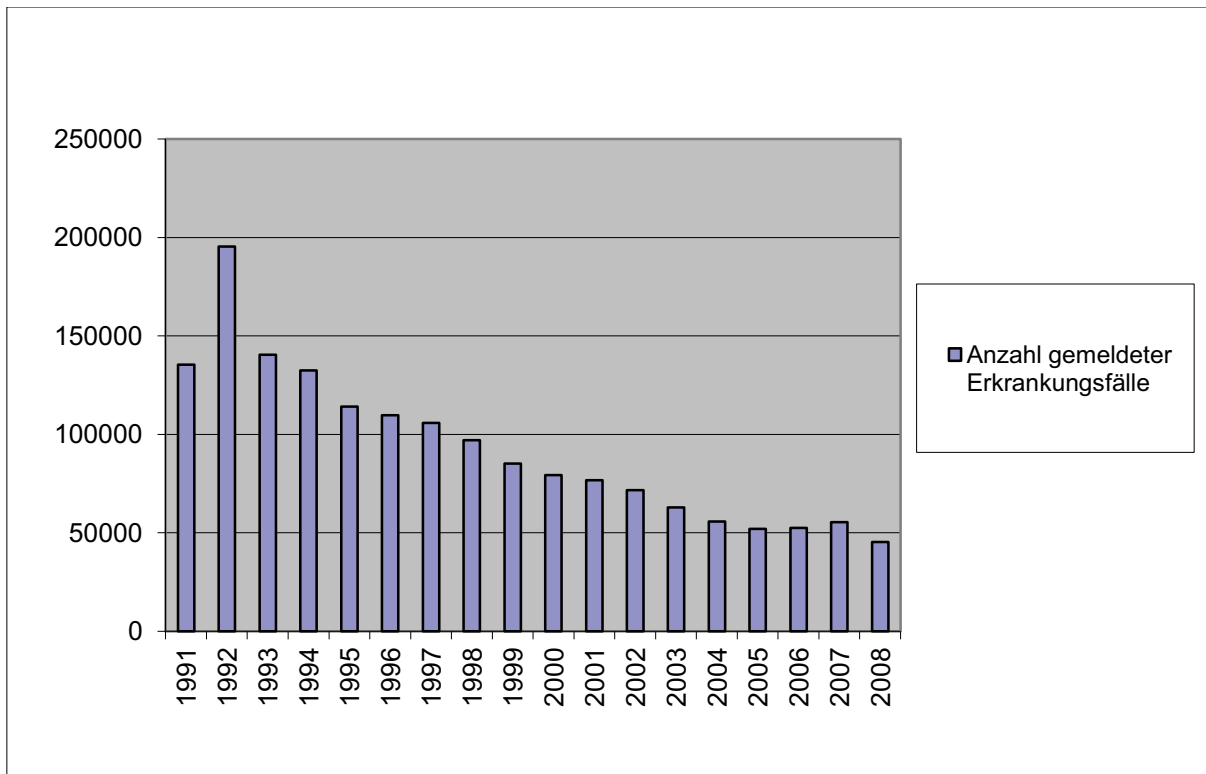


Abb.2 Anzahl gemeldeter Fälle von Salmonellosen in Deutschland von 1991 bis 2008 (KRÄMER, 2007; HARTUNG, 2009)

Wie in den Vorjahren wurden bei Geflügel und Geflügelfleisch deutlich häufiger Salmonellen nach gewiesen, als bei Rindern, Schweinen und Rotfleisch (HARTUNG, 2009).

Eine EU-Studie im Jahr 2008 zeigt, dass bei Hähnchen zur Zeit der Schlachtung häufig neben *Campylobacter* und Salmonellen nachweisbar sind. Hierbei wurden insgesamt 14 verschiedene *Salmonella*-Serovare nachgewiesen. Die drei Serovare *Salmonella* 4,12:d-, *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Paratyphi B(dT+) machten zusammen mehr als die Hälfte (55%) der Nachweise aus (BfR, 2010).

Obwohl die Nachweisrate in Geflügelfleisch höher liegt als bei Eiern, stellen Hühner-
eier oder Erzeugnisse mit Zusatz von Eiern nach wie vor die häufigste Infektions-
quelle für den Menschen dar. Ein Grund hierfür ist, dass Geflügelfleisch in der Regel
vor dem Verzehr einer Salmonellen- abtötenden Erhitzung unterzogen wird und da-
her eine Kontamination der Schlachtkörper zur keiner Infektion beim Menschen führt
(FERNÁNDEZ, 2007).

2.4.4. Salmonella Java

Salmonella paratyphi B-d-Tartrat(+)(var.Java), wurde im Jahr 2002 aus Masthähn-
chen bis zu 2% isoliert, steigt dagegen leicht an, wurde bei menschlichen Erkrankun-
gen bisher aber nur selten beobachtet. Diese Erregervariante erzeugt vorwiegend
akute Durchfallerkrankungen (HARTUNG, 2004; RKI, 2002), im Gegensatz zur klas-
sischen Variante von *S. paratyphi*, die mit einem septischen Krankheitsbild einher-
geht.

Die minimale Infektionsdosis für Erwachsene liegt bei 10^4 bis 10^6 Keime. Bei Kindern
und immungeschwächten Personen und in stark fetthaltigen Lebensmitteln wie
Schokolade oder Käse (Schutz des Erregers in der Magenpassage), reicht eine we-
sentlich geringere Zahl aus (weniger als 100 Keime!), um eine Infektion auszulösen
(M. KIST; J. STEIN, 2006).

Der serovare *Salmonella paratyphi B d-Tartrat(+)* wurde in den letzten Jahren sowohl
in Niederlande als auch in der Bundesrepublik Deutschland vermehrt beim Mastge-
flügel nachgewiesen (Abb. 4).

S. Java in Broiler monitoring in Germany

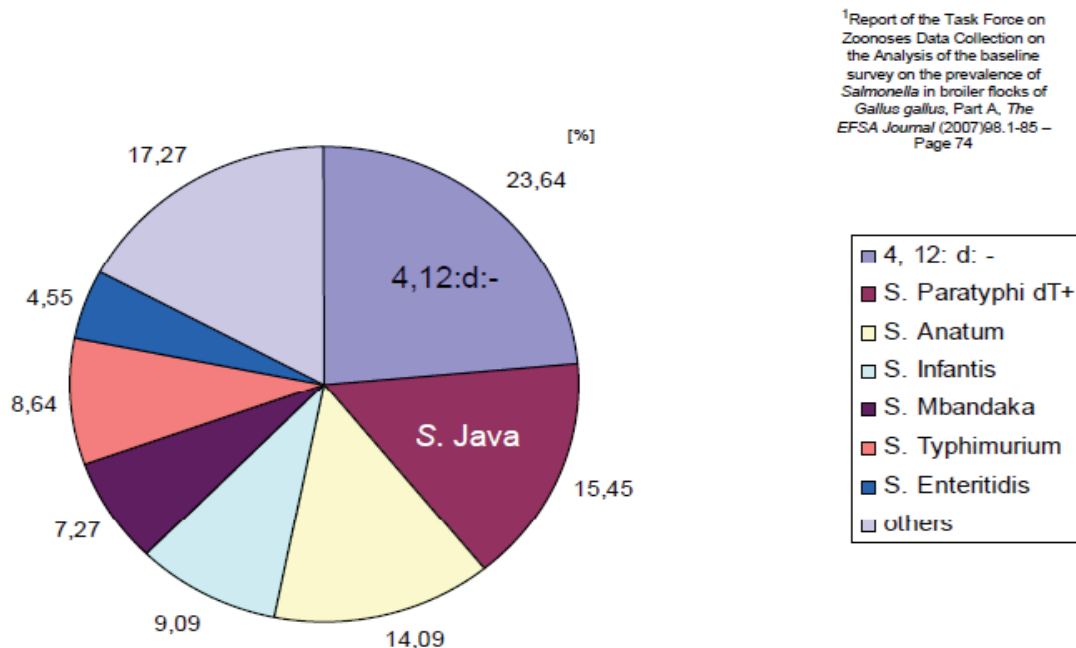


Abb.3 Nachgewiesene Serovare in deutschen Broiler-Herden (Istvan Szabo, 2008; Studie, 2006)

2005/2006 war das häufigste Serovar die monophasische Variante 4,12:d:- . Im Gegensatz dazu wurde S. Paratyphi B d-Tarat (+) in der Grundlagenstudie aus dem Jahr 2008 am Schlachthof häufiger im Blinddarm von Masthähnchen nachgewiesen (M. HARTUNG und A. KÄSNOHERER, 2011; BfR Studie 2009).

Salmonella paratyphi B- d-Tarat (+) (var. S.Java) ist Antibiotika- multiresistent („multidrug- resistance“) (N.B. BOLDER, 2006).

S. Java zeichnet sich durch eine Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin/Spectinomycin, Sulfonamiden und Tetracycline aus (DONG WOOK KIM, 2006).

2.4.5. Salmonella Typhimurium

Das Serovar S. Typhimurium und das eng verwandte monophasische Serovar S. 4,[5],12:i:- konnten im Schweinefleisch, aber auch im Fleisch von Hähnchen und Puten relativ häufig nachgewiesen werden. S. Typhimurium war im Jahr 2009 mit 33% der nachgewiesenen Isolate wie in den vorherigen Jahren das zweithäufigste Serovar bei den humanen Salmonellosen. Da aber das Serovar in mehreren Reser-

voiren (Produktionsketten) vorkommt, ist eine anteilige Zuordnung der menschlichen Infektionen zum Fleisch einer bestimmten Tierart nicht möglich (M. Hartung und A. Käsbohrer, 2011; BfR, 2009).

3. Materialien und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die für die Versuche verwendeten Materialien und Arbeitsgeräte aufgeführt. Desweiteren werden die Untersuchungsmethoden erläutert, die in dieser Diplomarbeit Anwendung fanden.

3.1. Materialien und Nährmedien

Es wurden die nachfolgenden Materialien und Nährmedien verwendet.

- Caso-Agar: Applichem, Darmstadt
- Endo- Agar
- Caso- Bouillon: Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin
- Di- Kaliumhydrogenphosphat: Applichem, Karlsruhe
- Kaliumhydrogenphosphat: Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Propionsäure 99%
- Essigsäure 100%
- NaOH 1,8M
- NaCl 0,85%: Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.2. Arbeitsgeräte

Nachfolgend werden die in der Versuchsdurchführung verwendeten Arbeitsgeräte und Kleinmaterialien aufgeführt.

- Autoklav (Thermo Scientific)
- Brutschrank (Heraeus Instruments)
- Wasserbad (GFL 1083)
- Schüttler (Edmund Bühler)
- Koloniezählgerät
- Mikroskop
- pH- Messgerät
- pH-Fix 0-14: farbfixierte Indikatorstäbchen
- Waage (KERN 770)

- Sterile Reagenzgläser
- Pipetten
- Drigalski-Spatel
- Petrischalen
- Bechergläser
- Impfösen
- Bunsenbrenner

3.3. Testkeime

Für die Untersuchungen wurden die Teststämme Salmonella Java und Salmonella Typhimurium vom Labor WEK in Viesbek verwendet.

3.4. Methodik

Es wurde der Einfluss der Essigsäure und Propionsäure auf das Wachstum von S. Java und S. Typhimurium bei Temperaturen von $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ bzw. $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und eine Einwirkungszeit von 30min untersucht. Als Grundlage für die Untersuchungen wurde die DIN EN 13704 verwendet.

In der folgenden Abbildung wird ein Schema des Versuchsablaufs dargestellt.

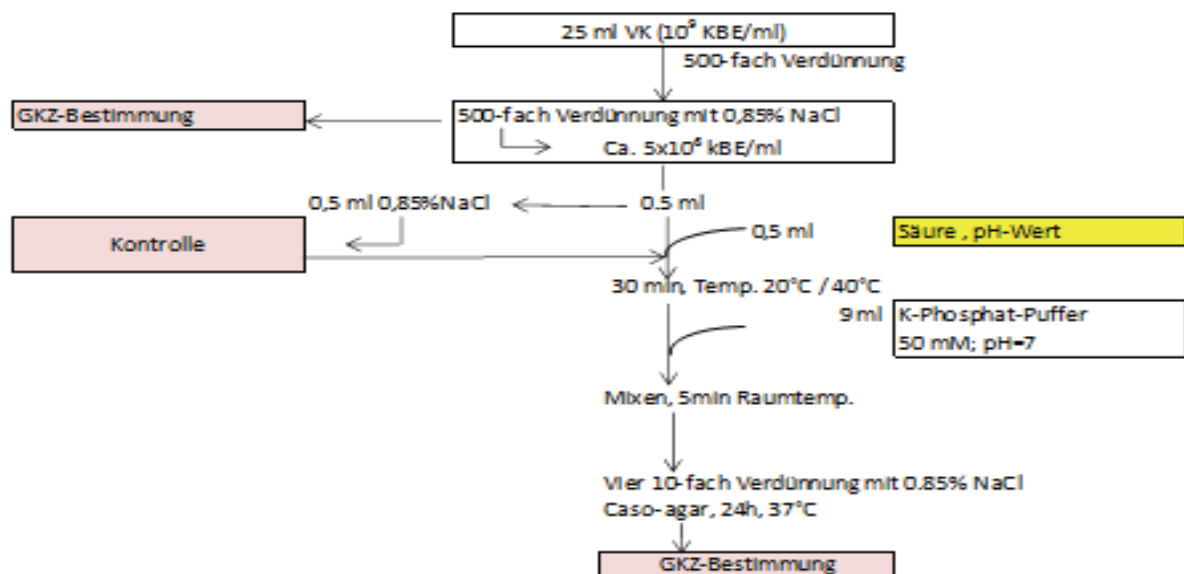


Abb.4: Schema zum Versuchsablauf

Die eingesetzten Stämme wurden zunächst mit Hilfe des Biotestsystems auf ihre Identität überprüft. Das Testsystem wurde nach Angaben des Herstellers inokuliert und einen Tag bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Ermittlung des entsprechenden Zahlenschlüssels mit Hilfe des MHK-ID Nachweiskatalogs.

Mit der Öse wurde ein Dreierausstrich durchgeführt, die beimpften Caso-Agar-Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Nach der Bebrütungszeit wurde eine Kolonie entnommen und wurde mit 25ml Nährbouillon beimpft. Die Keimsuspension wurde dann im Schüttler bei 37°C und für ca. 18 Stunden inkubiert (geschätzte Ausgangskeimzahl der *S. Typhimurium*- und *S. Java*- Vorkultur: 10^9 KBE/ml). Die Vorkultur wurde zunächst 500-fach mit steriler 0,85%iger NaCl- Lösung verdünnt. Im zweiten Schritt wurde eine Gesamtkeimzahlbestimmung auf Caso-Agar durchgeführt. 0,5ml der Keimsuspension wurden in einem sterilen Prüfröhrchen pipettiert. 0,5ml der Prüflösung (Essigsäure pH= 3,5 bzw. Propionsäure pH= 4) in 5 verschiedenen Konzentrationen wurden zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Prüfröhrchen in einem geregelten Wasserbad auf 20°C bzw. 40°C \pm 1°C gestellt. Die Einwirkzeit beträgt 30min \pm 10s.

Nach Ablauf der Einwirkungszeit wurden 9ml Kalium-Phosphat- Puffer (50mM; pH=7) zugegeben und gründlich gemischt um die Einwirkung der Säure zu stoppen. Die Röhrchen wurden 5min bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Nach Ablauf der Neutralisationszeit wurde 1ml der Mischung (Keimsuspension, organische Säure, Pufferlösung) entnommen und in einem sterilen Röhrchen mit 9ml Verdünnungsflüssigkeit (0,85%iger NaCl- Lösung) gegeben. Aus diesem wurde nach gründlicher Durchmischung 1ml entnommen und in ein weiteres Röhrchen mit steriler Verdünnungsflüssigkeit pipettiert. Die Zahl der weiterhin benötigten Verdünnungsstufen richtet sich nach dem zu erwartenden Keimgehalt der Suspension.

Aus jeder der benötigten Verdünnungsstufen wurden 0,1ml in Petrischalen mit Caso-Agar überführt, wobei für jede Stufe, drei Petrischalen (Dreifachbestimmung) angelegt wurden. Die aufgetragenen Teilmengen auf den Petrischalen wurden mit einem sterilen Drigalski- Spatel in kreisender Bewegung gleichmäßig verteilt. Die so beimpften Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank mit dem Boden nach oben bebrütet. Nach Ablauf der Bebrütungszeit wurden alle sichtbaren Kolonien der Platten ausgezählt, deren Koloniezahlen zwischen 1 und 300 lagen unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufen. Die Berechnung des gewichteten

Mittelwertes (GKZ) erfolgte aus den Kolonienzahlen der niedrigeren und der nächst höheren auswertbaren Verdünnungsstufen:

$$\bar{C} = \frac{\Sigma c}{(n_1 \times 1) + (n_2 \times 0,1) d} \times 10$$

\bar{C} : der gewichtete Mittelwert der Kolonienzahl (in KBE/ml)

Σc : Summe der gezählten Kolonien auf allen ausgewerteten Platten

n_1 : Anzahl der Platten der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 : Anzahl der Platten der nächst höheren, auswertbaren Verdünnungsstufe

d : der Verdünnungsfaktor der ersten ausgewerteten Verdünnung

Beim Oberflächen-Spatelverfahren ergibt sich der Wert pro ml durch Multiplikation des errechneten gewichteten Mittelwertes mit 10 (es wurden 0,1ml ausgespatelt) und anschließende Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor, bezogen auf die niedrigere Verdünnungsstufe.

4. Ergebnisse

In diesem Abschnitt erfolgte die Zusammenfassung, Darstellung und Auswertung der in dieser Diplomarbeit erzielten Ergebnisse.

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Wirksamkeit von Propionsäure gegen *S. Typhimurium* und *S. Java* bei pH-Wert von 4, Wirkungszeit von 30min und Temperaturen von 20°C und 40°C, dargestellt.

Tab.2: Effekt von Propionsäure auf das Wachstum von *S. Typhimurium* und *S. Java* bei pH 4, 20°C bzw.40°C nach 30min Einwirkzeit

		Einwirktemperatur 20°C					
Salmonella ssp. Type	Konzentration von Propionsäure (%)						
	0	0,05	0,25	0,5	2	3,7	
	pH-Wert nach Zusatz von K-Phosphat-Puffer						
	7	7	7	7	7	6,5	
	Kolonienzahl (KBE/ml)						
	<i>S. Typhimurium</i>	$5,3 \cdot 10^8$	n.a.	n.a.	n.a.	$6 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^5$
<i>S. Java</i>	$2,2 \cdot 10^8$	n.a.	n.a.	n.a.	$4,2 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^3$	
		Einwirktemperatur 40°C					
Salmonella ssp. Type	Konzentration von Propionsäure (%)						
	0	0,05	0,25	0,5	2	3,7	
	pH-Wert nach Zusatz von K-Phosphat-Puffer						
	7	7	7	7	7	6,5	
	Kolonienzahl (KBE/ml)						
	<i>S. Typhimurium</i>	$6 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	0
<i>S. Java</i>	n.a.	$4,7 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$	

Die Gesamtkeimzahl der Kontrollprobe (bei 20°C) ohne Zusatz von Propionsäure wurde wie folgt für *S. Typhimurium* $5,3 \cdot 10^8$ KBE/ml. Bei 20°C Propionsäure 3,7%ig wurde eine Keimzahlreduzierung (im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle) von *S. Typhimurium* von 3,16log- Stufen und von *S. Java* von 4,7log- Stufen erreicht. Bei Einwirkungstemperatur von 40°C wurde fast die gleiche Keimzahlreduzierung schon mit einer Konzentration von 2% erreicht.

Bei 40°C Propionsäure 3,7%ig wurde *S. Typhimurium* sowie *S. Java* um mindestens 5 log- Stufen reduziert.

Die gewichteten Mittelwerte der überlebenden Kolonien von *S. Typhimurium* und *S. Java* bei unterschiedlichen Propionsäure-Konzentrationen sowie die Standardabweichungen sind in den Abbildungen 5, 6, 7 und 8 dargestellt.

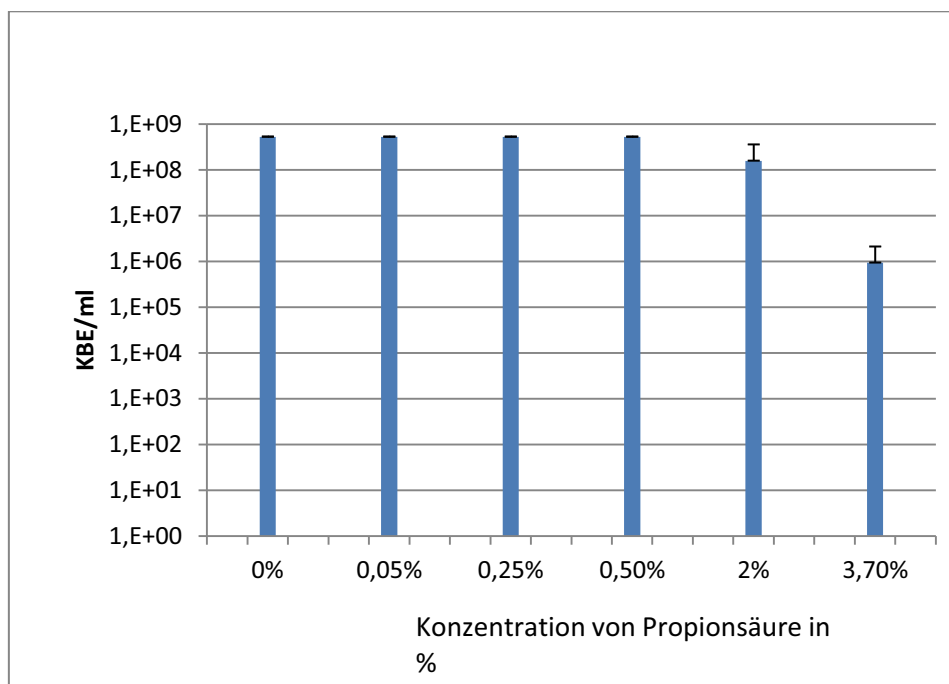


Abb.5: Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von *S. Typhimurium* bei pH 4, 20°C nach 30 min Einwirkungszeit

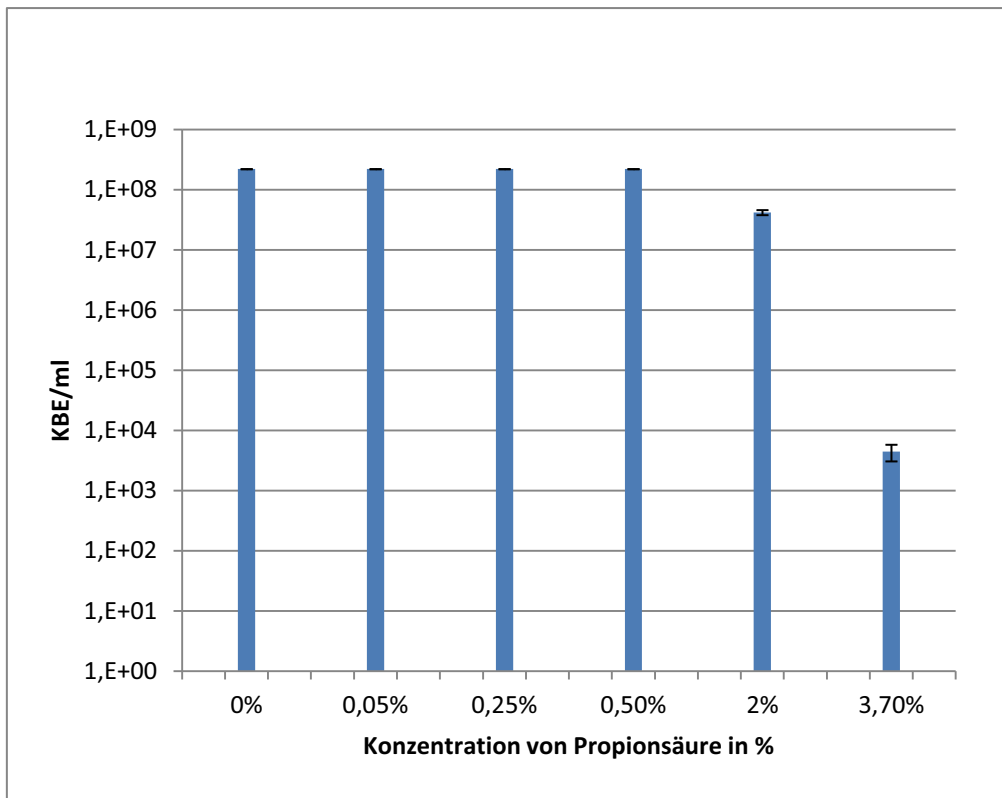


Abb.6: Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von *S. Java* bei pH 4, 20°C in 30 nach Einwirkungszeit

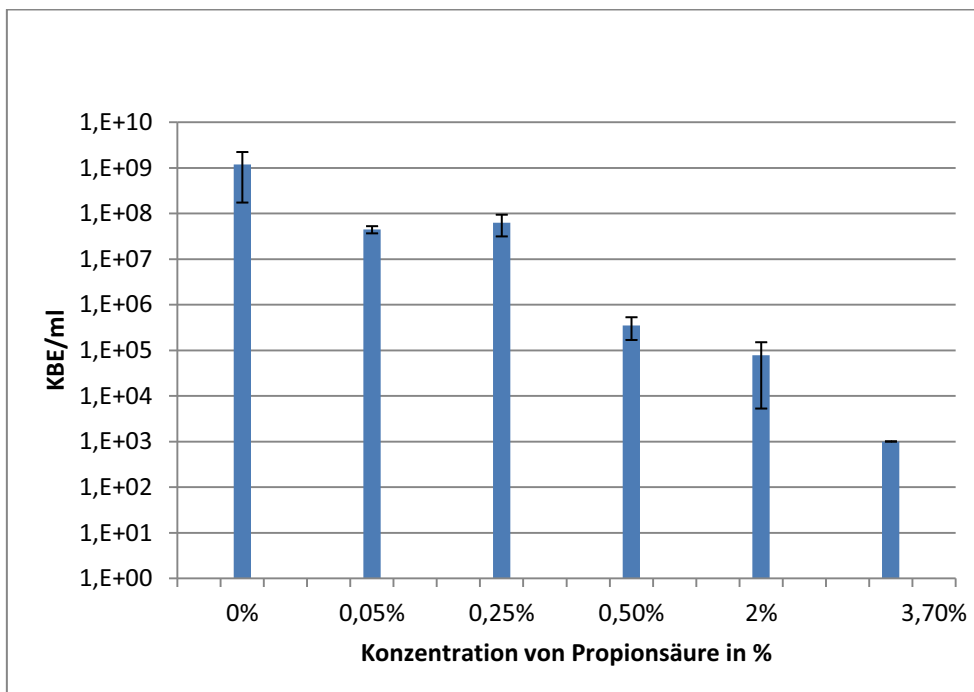


Abb.7: Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von *S. Typhimurium* bei pH 4, 40°C nach 30 min Einwirkungszeit

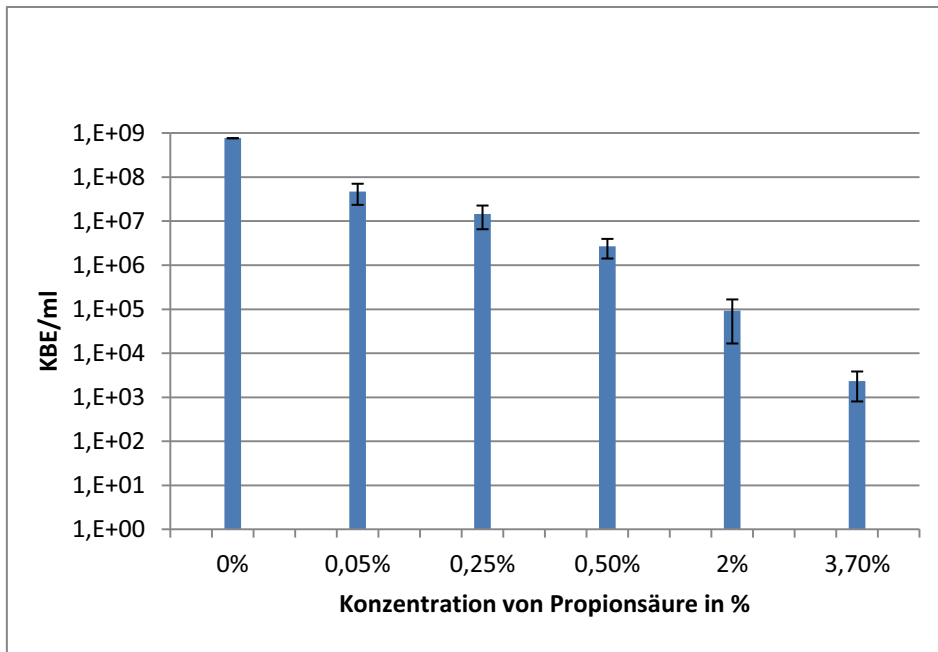


Abb.8: Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von *S. Java* bei pH 4, 40°C nach 30 min Einwirkungszeit

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Essigsäure sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Effekt von Essigsäure auf das Wachstum von *S. Typhimurium* und *S. Java* bei pH 4, 20°C bzw. 40°C nach 30 min Einwirkzeit

		Einwirktemperatur 20°C					
Salmonella ssp. Type	Konzentration von Essigsäure (%)						
		0	0,25	0,5	1	2	4
	pH-Wert nach Zusatz von K-Phosphat-Puffer 50 mM						
		7	7	7	6	5	4,5
	Kolonienzahl (KBE/ml)						
S. Typhimurium		$2,6 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^4$	0
S. Java		$2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$9,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^5$
		Einwirktemperatur 40°C					
Salmonella ssp. Type	Konzentration von Essigsäure (%)						
		0	0,25	0,5	1	2	4
	pH-Wert nach Zusatz von K-Phosphat-Puffer 50 mM						
		7	7	7	6	5	4,5
	Kolonienzahl (KBE/ml)						
S. Typhimurium		$4,1 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^4$	0	0	0
S. Java		$1,3 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^4$	0	0

Bei einer Temperatur von 20°C, pH 3,5 und eine Einwirkungszeit von 30 min wies Essigsäure bei einer Konzentration von 2% eine Reduzierung (im Vergleich mit der Kontrollprobe) der Gesamtkeimzahl von *S. Typhimurium* von 2,65 log-Stufen,

während die Reduzierung von *S. Java* bei gleichen Untersuchungsbedingungen war von 0,83 log-Stufen. 4%iger Essigsäure wurde die Gesamtkeimzahl von *S. Typhimurium* um mindestens 4 log-Stufen reduziert, während *S. Java* wurde um weniger als 2 log-Stufen reduziert. Bei einer Temperatur von 40°C zeigt Essigsäure eine höhere Wirksamkeit als bei 20°C.

Schon bei einer Konzentration von 1% wurde die Gesamtkeimzahl von *S. Typhimurium* im Vergleich zu der Kontrolle um mindestens 4 log-Stufen und die von *S. Java* um 2,4 log-Stufen. 2%iger Essigsäure reichte um die Gesamtkeimzahl von *S. Typhimurium* und *S. Java* um ca. 4 log-Stufen zu reduzieren.

Die gewichteten Mittelwerte der überlebenden Kolonien von *S. Typhimurium* und *S. Java* bei unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen sowie die Standardabweichungen sind in den Abbildungen 9,10,11 und 12 dargestellt.

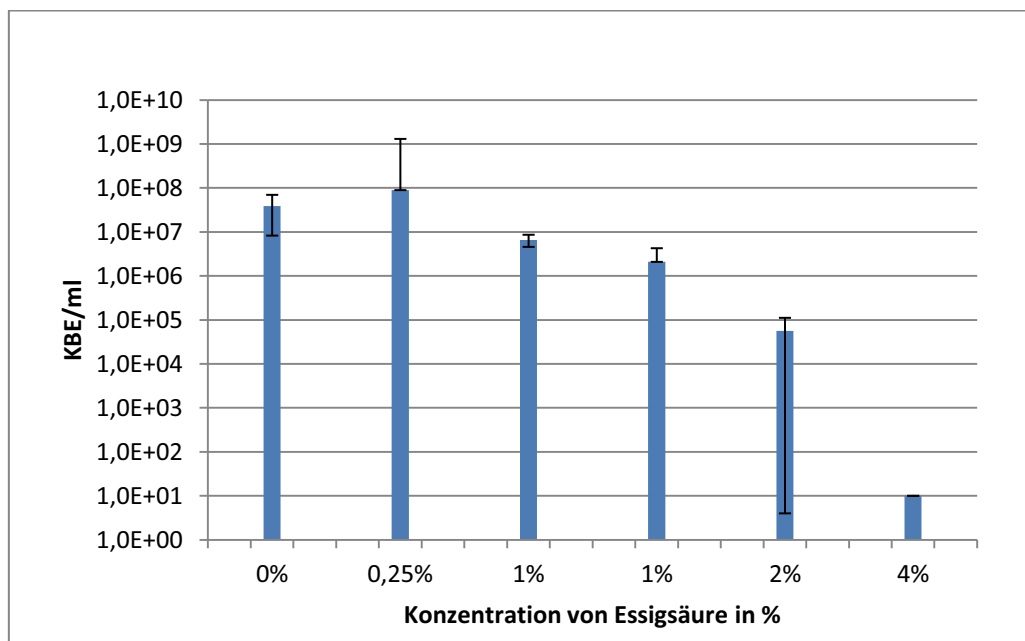


Abb. 9: Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von *S. Typhimurium* bei pH 3,5; 20°C nach 30 min Einwirkungszeit

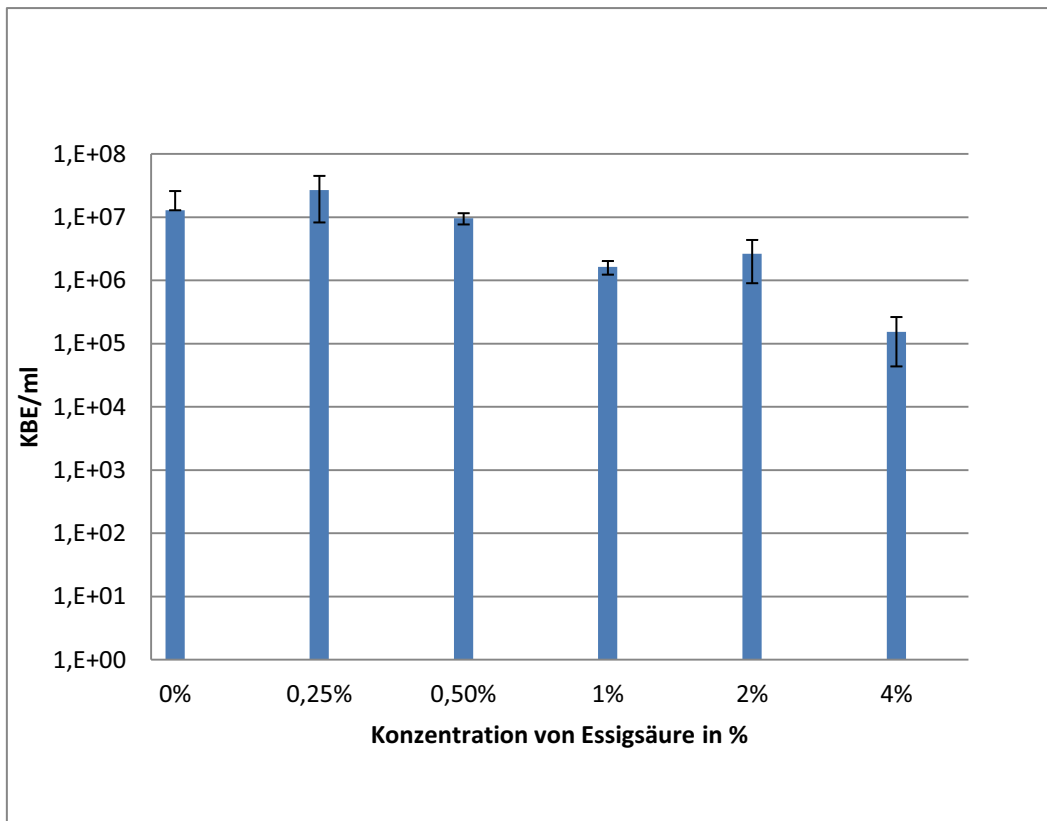


Abb.10: Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von *S. Java* bei pH 3,5 ; 20°C nach 30 min Einwirkungszeit

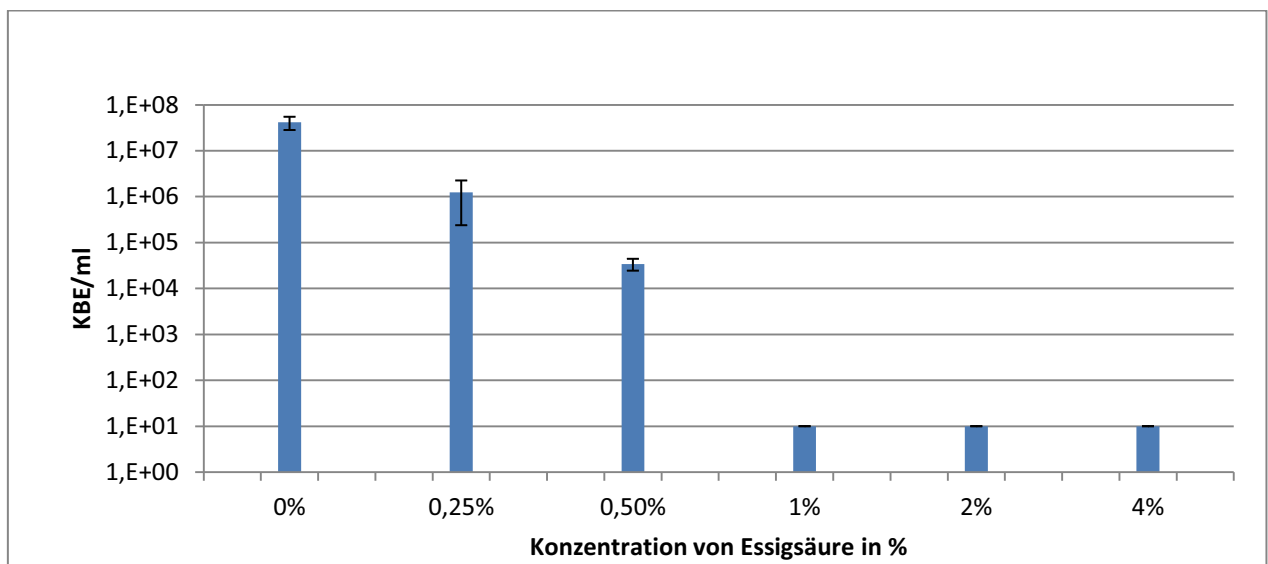


Abb.11: Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von *S. Typhimurium* bei pH 3,5; 40°C nach 30 min Einwirkungszeit

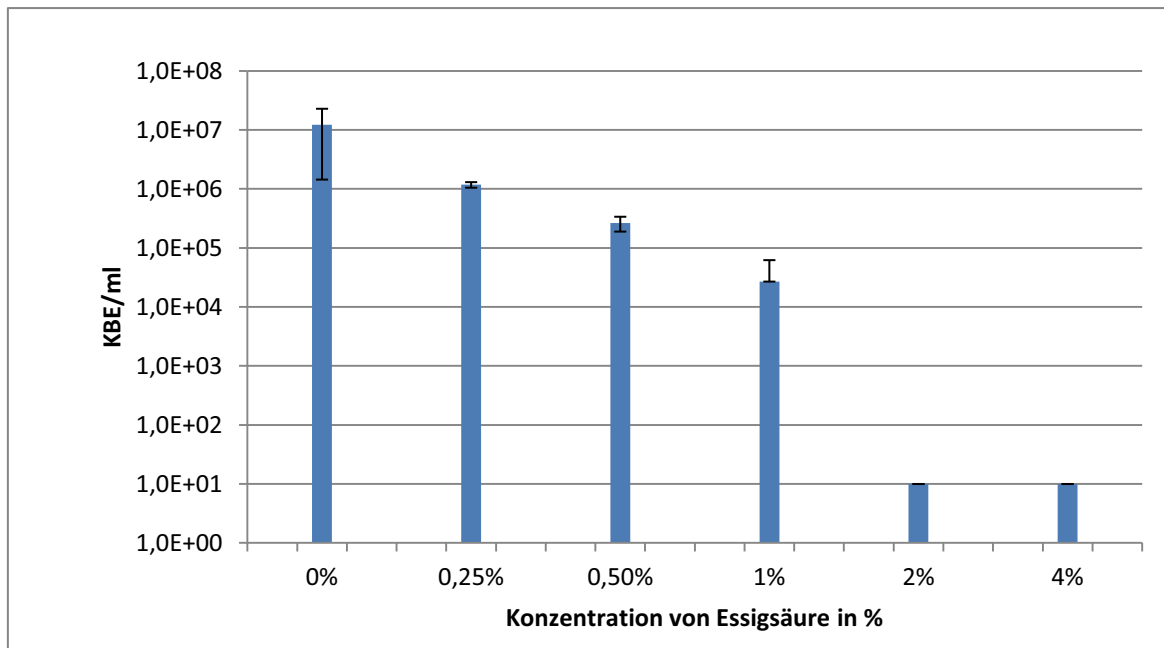


Abb.12: Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von *S. Java* bei pH 3,5; 40°C nach 30 min Einwirkungszeit

5. Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Propionsäure und Essigsäure eine antimikrobielle Wirkung gegen *S. Typhimurium* und *S. Java* aufweisen, allerdings in höheren Konzentrationen.

Die Wirksamkeit der oben genannten organischen Säuren wurde bei Temperaturen von 20°C und 40°C untersucht. Der pH-Wert von Propionsäure wurde auf 4 eingestellt und der von Essigsäure auf 3,5. Die Einwirkungszeit bei allen Versuchen waren 30 min.

Ein pH-Wert von ≤ 4 wurde ausgewählt, nicht nur weil die niedrigen pH-Werte das Wachstum von Salmonellen reduzieren BLACKBURN et al.(1997) stellte fest, dass ein optimales Überleben von Salmonellen in der Regel bei pH-Werten über 5 aufgetreten ist, sondern auch um sicherzustellen, dass die gelösten organische Säuren im großenteil, im undissoziierten Moleküle befinden. Der undissoziierte Säureanteil kann in die Mikroorganismenzelle eindringen und dort wichtige Stoffwechselfunktionen unterbrechen (Kramer & Assadian, 2008; S.R. MILILLO und S.C. RICKE, 2010).

Bei pH 3 ist die antimikrobielle Wirkung von Essigsäure 10- bis 100-mal stärker als die anderer Säuren (Kramer & Assadian, 2008).

Bei 40° C zeigte Propionsäure und Essigsäure eine höhere Wirksamkeit gegen *S. Typhimurium* und *S. Java* als bei 20°C. Untersuchungen zeigten, dass bei Raum-Temperatur Ameisensäure deutlich wirksamer gegen behüllte Viren ist, als Essig- und Propionsäure (Kramer & Assadian, 2008).

Bei einer Temperatur von 40°C, 3,7%iger Propionsäure bei pH 4 hat sich die Gesamtkeimzahl von *S. Typhimurium* und *S. Java* um mindestens 5 log-Stufen reduziert. 2%ige Essigsäure bei pH 3,5 und 40°C reichte aus um die Gesamtkeimzahl von *S. Java* und *S. Typhimurium* um ca.4 log-Stufen zu reduzieren.

In den Untersuchungsergebnissen konnte nicht festgestellt, welche organische Säure am wirksamsten ist, da bei 1%iger, 2%iger und 4%iger Essigsäure nach Zusatz von Kalium-Phosphat-Puffer 50-mM der pH-Wert wurde nicht auf 7 eingestellt, und damit wurde die Wirksamkeit von Essigsäure nicht vollständig nach der Einwirkzeit ge-

hemmt. Es wird empfohlen bei weiteren Versuchen mit Kalium-Phosphat-Puffer 100 mM statt 50 mM zu arbeiten.

Unter den Versuchsbedingungen, scheint es, dass Salmonella Java weniger empfindlich ist, als Salmonella Typhimurium.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Antimikrobielle Wirkung von Essigsäure und Propionsäure gegen Salmonella Typhimurium und Salmonella Java zu überprüfen.

Die Untersuchungen zeigten, dass Essigsäure und Propionsäure bei einer Temperatur von 40°C wirksamer als bei 20°C ist.

Bei 3,7% iger Propionsäure, bei pH 4 und 40°C nach 30 min Einwirkzeit konnte Salmonella Typhimurium und Salmonella Java um mindestens 5 log-Stufen reduziert werden.

Konzentrationen von 2% und 4% Essigsäure bei pH3,5 und 40°C nach 30 min konnten Salmonella Java und Salmonella Typhimurium um mindestens 4 log-Stufen reduziert werden.

Salmonella Java zeigt sich weniger empfindlich gegen Essigsäure und Propionsäure als Salmonella Typhimurium.

Hier bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, um die Ergebnisse statistisch abzusichern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Essigsäure und Propionsäure gute Kandidaten sind für eine Anwendung in vivo, um Salmonella Java und Salmonella Typhimurium zu inaktivieren.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1** Taxonomie und Nomenklatur der Gattung Salmonella (RKI, 2009)
- Abb.2** Anzahl gemeldeter Fälle von Salmonellose in Deutschland (1991-2008), (Krämer, 2007; Hartung, 2009)
- Abb.3** Nachgewiesene Serovare in deutschen Broiler-Herden (Istvan Szabo, 2008; BfR- Studie, 2006)
- Abb.4** Schema zum Versuchsablauf
- Abb.5** Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von S. Typhimurium bei pH4, 20°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.6** Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von S. Java bei pH4, 20°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.7** Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von S. Typhimurium bei pH4, 40°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.8** Wirkung von Propionsäure auf das Wachstum von S. Java bei pH4, 40°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.9** Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von S. Typhimurium bei pH 3,5; 20°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.10** Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von S. Java bei pH 3,5; 20°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.11** Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von S. Typhimurium bei pH 3,5; 40°C in 30min Einwirkungszeit
- Abb.12** Wirkung von Essigsäure auf das Wachstum von S. Java bei pH 3,5; 40°C in 30min Einwirkungszeit

8. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** physikalische und chemische Eigenschaften von Essig- & Propionsäure (Wallhäußer, 2008; Cherrington et al. 1991)
- Tab. 2** Effekt von Propionsäure auf das Wachstum von S. Typhimurium und S. Java bei pH4; 20°C bzw. 40°C und 30 min Einwirkungszeit
- Tab. 3** Effekt von Essigsäure auf das Wachstum von S. Typhimurium und S. Java bei pH 3,5; 20°C bzw. 40°C und 30 min Einwirkungszeit

9. Literaturverzeichnis

- A. Álvarez- Ordóñez, A. Fernández, A. Bernardo, M. López, 2008. Acid tolerance in Salmonella Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures
- Bessems, E., 2003: Desinfektionsmittel für die Lebensmittel- & Veterinärhygiene, 1. Auflage Behrs Verlag
- Böhm, R. (1987): Organische Säuren als Desinfektionsmittel. Fleischwirtschaft
- Bolder, N.M., 2006: Salmonella control in broiler farming
- Bremer, P. (2003): Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln bei verschiedenen Temperaturen
- Cherrington, C.A., Hinton, M., Mead, G.C. & Chopra, I., 1991. Organic acids: Chemistry, antibacterial activity and partial application
- Cheung, H.N.B., 2008: Bacterial Growth inhibition during composting of Food Waste; Effects of organic acids
- DIN EN 13704, 2002: chemische Desinfektionsmittel, quantitative Suspensionsversuche zur Bestimmung der sporiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen, Prüfverfahren und Anforderungen
- Fehlhaber, K., 2007: Handbuch der Lebensmittelhygiene. 1. Auflage, Behr's Verlag
- Fernández, N., 2007: Untersuchungen zur Inaktivierung von Salmonella enteritidis auf der Schale von Bruteiern mit Ozongas
- Flamm, H., Rotter, M., Koller, W. & Wewalka, G. (1983): 10.1 Desinfektion. In: Thofern, E. & Botzenhardt, K.: Hygiene und Desinfektion im Krankenhaus. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Friedrich, A.; Dorn, C.; 2010: Bericht des Nationalen Referenzlabors zur Durchführung von Analysen und Tests auf Zoonosen (Salmonellen) zum Vorkommen von Salmonellen in Nutztieren, Lebens- & Futtermitteln über den Zeitraum der letzten fünf Jahre in Deutschland (2004-2008)
- Haiderer, B., 2010: Zum Vorkommen von Salmonella spp. und Listeria spp. in Bauernhofmilchproben- Monitoring- Ergebnisse im Rahmen des EU-Projektes „GABRIEL“
- Hartung, M., 2008: Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2006
- Hartung, M., Käsbohrer, A., 2009: Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2007

- Joerger, R.D., 2003: Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins Antimicrobial Peptides and Bacteriophages
- Kim, D.W., 2006: Isolation of Salmonella enteric subspecies enteric serovars Paratyphi B dT+, or Salmonella Java, from Indonesia and alteration of d-tartrate fermentation phenotype by disrupting the ORF STM 3356
- Koch, F., 2005: Organische Säuren in der Tierernährung
- Kramer, A. & Assadian, O. (2008): Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Krämer, J., 2007: Lebensmittelmikrobiologie. 5. Auflage Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart
- Kyselova, V., (2009): Modell-Untersuchungen zum Verhalten von Salmonella Typhimurium auf Fleischoberflächen unter verschiedenen Temperatur- & Zeitbedingungen und unter Berücksichtigung der Konkurrenzmikroflora
- Ricke, S., 2003: Perspectives on the use of organic Acids and short chain fatty acids as Antimicrobials
- RKI, 2009: Epidemiologisches Bulletin; S.R. Milillo and S.C. Ricke 2010: Synergistic Reduction of Salmonella in a Model Raw Chicken Media using a Combined Thermal and Acidified Organic Acid Salt Intervention Treatment
- Séon, A.A., Nunes, C.S., 2009 Évaluation in Vitro des effets de different acides organiques sur trios sérovares de Salmonella enteric d'origine porcine
- Staffa, W., 2003: Salmonella Typhimurium DT104 aus einer mesophilen Biogasanlage: Überlebenszeiten und experimentelle Inaktivierung durch asugewählte organische Säuren
- Stellmacher, W., Scholz, K. & Preissler, K. (1974): Desinfektion. 2. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Szabo, I., 2008: Epidemiologie and Biology of d-Tartrate Positive Salmonella enteric Serovar Paratyphi B (S.Java)
- Visscher, C., (2006): Untersuchungen (Feldstudie) zur Salmonellen-Prävalenz bei Mastschweinen unter dem Einfluss einer gröbereren Futtermahlung sowie von Futteradditiven (organische Säuren bzw. Kaliumdiformiat)
- Wallhäußer, K.H. (1984): Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Wallhäußer, K.H. (1995): Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

([http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_00000000448/2_kap2.pdf;jsessionid=B7C7E305FDBBF7CC613DFFBA6EE7E593?host s= \)](http://www.diss.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_00000000448/2_kap2.pdf;jsessionid=B7C7E305FDBBF7CC613DFFBA6EE7E593?host s=))

Anhang

Ergebnisse von Versuch 1

Propionsäure , pH 4

Salmonella Typhimurium

Temperatur 20°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ(KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	136	158	4,6 · 10 ⁸
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	30	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	267	

	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	GKZ (KBE/ml)
Kontrolle	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	265	5,3 · 10 ⁸
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Konzentration 0,05 %	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
0,25 %	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
0,50 %	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
2,00 %	Kolonien	n.a.	n.a.	81	28	6 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	199	181	
		n.a.	n.a.	n.a.	194	
3,70 %	Kolonien	91	1	1	23	3,6 · 10 ⁵
		n.a.	125	1	0	
		162	n.a.	0	0	

Ergebnisse von Versuch 2

Propionsäure , pH 4

Salmonella Java

Temperatur 20°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	275	1,8 · 10 ⁹
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	85	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

Kontrolle	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	110	2,2 · 10 ⁸
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Konzentration 0,05%	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
0,25%	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
0,50%	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
2,00%	Kolonien	n.a.	n.a.	198	17	4,2 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	224	n.a.	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
3,70%	Kolonien	3	0	0	0	4,4 · 10 ³
		1	1	0	0	
		1	1	0	0	

Ergebnisse von Versuch 3

Propionsäure , pH 4

Salmonella Typhimurium

Temperatur 40°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	11	1,6 · 10 ⁸
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	21	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	GKZ(KBE/ml)
Kontrolle	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	236	1	6 · 10 ⁸
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	40	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	118	
Konzentration 0,05%	Kolonien	n.a.	n.a.	241	44		5 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	n.a.	18		
		n.a.	n.a.	n.a.	23		
0,25%	Kolonien	n.a.	n.a.	198	16		4,7 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	263	17		
		n.a.	n.a.	n.a.	49		
0,50%	Kolonien	52	27	0	0		3,5 · 10 ⁵
		221	8	0	0		
		39	229	0	0		
2,00%	Kolonien	0	38	1	0		2 · 10 ⁵
		84	1	0	0		
		n.a.	0	0	0		
3,70%	Kolonien	0	0	0	0		< 2000
		0	0	0	0		
		0	0	0	0		

Ergebnisse von Versuch 4

Propionsäure , pH 4

Salmonella Java

Temperatur 40°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4	7,7 · 10 ⁸
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	150	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

Kontrolle	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	GKZ (KBE/ml)
	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Konzentration 0,05 %	Kolonien	n.a.	n.a.	141	27	4,7 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	203	150	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
0,25%	Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	5	1,5 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	n.a.	12	
		n.a.	n.a.	n.a.	5	
0,50%	Kolonien	n.a.	n.a.	15	0	3,1 · 10 ⁶
		n.a.	n.a.	20	1	
		n.a.	n.a.	12	2	
2,00%	Kolonien	3	0	0	0	9,2 · 10 ⁴
		62	0	0	0	
		73	0	0	0	
3,70%	Kolonien	2	0	0	0	3 · 10 ³
		1	0	0	0	
		0	0	0	0	

Ergebnisse von Versuch 5

Essigsäure , pH 3,5

Salmonella Typhimurium

Temperatur 20°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	101	102	103	104	105	106	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	211	1	$2,1 \cdot 10^8$
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	235	0	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0	

	Verdünnungs-Stufe	101	102	103	104	GKZ (KBE/ml)
Kontrolle	Kolonien	n.a.	n.a.	35	2	$2,6 \cdot 10^8$
		n.a.	n.a.	202	31	
		n.a.	n.a.	n.a.	34	
Konzentration 0,25%	Kolonien	n.a.	n.a.	167	42	$5 \cdot 10^7$
		n.a.	n.a.	n.a.	1	
		n.a.	n.a.	n.a.	114	
0,50%	Kolonien	n.a.	n.a.	28	21	$2,2 \cdot 10^7$
		n.a.	n.a.	25	7	
		n.a.	n.a.	280	1	
1,00%	Kolonien	n.a.	44	19	0	$3,7 \cdot 10^6$
		n.a.	144	108	0	
		n.a.	68	177	51	
2,00%	Kolonien	65	1	0	0	$5,7 \cdot 10^4$
		13	2	0	0	
		10	0	0	0	
4%	Kolonien	0	0	0	0	< 2000
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	

Ergebnisse von Versuch 6

Essigsäure , pH 3,5

Salmonella Java

Temperatur 20°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	96	246	1	4 . 10 ⁷
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	102	

Kontrolle	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	GKZ (KBE/ml)
	Kolonien	n.a.	n.a.	37	0	
	n.a.	n.a.	165	5		
	n.a.	n.a.	n.a.	2		
Konzentration 0,25 %	Kolonien	n.a.	n.a.	147	128	4 . 10 ⁷
		n.a.	n.a.	63	4	
		n.a.	n.a.	n.a.	70	
0,50%	Kolonien	n.a.	n.a.	54	5	9,6 . 10 ⁶
		n.a.	n.a.	61	1	
		n.a.	n.a.	33	4	
1,00 %	Kolonien	n.a.	46	13	1	1,5 . 10 ⁶
		n.a.	83	16	2	
		n.a.	n.a.	10	0	
2,00 %	Kolonien	n.a.	31	26	2	3 . 10 ⁶
		n.a.	250	3	0	
		n.a.	n.a.	9	0	
4,00 %	Kolonien	0	13	0	0	2,8 . 10 ⁵
		0	1	0	0	
		0	0	0	0	

Ergebnisse von Versuch 7

Essigsäure , pH 3,5

Salmonella Typhimurium

Temperatur 40°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	140	12	0	1,5 · 10 ⁸
	n.a.	n.a.	n.a.	81	86	0	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5	10	

Kontrolle	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	GKZ (KBE/ml)
	Kolonien	n.a.	n.a.	147	7	
	n.a.	n.a.	292	8		
	n.a.	n.a.	n.a.	21		
Konzentration 0,25 %	Kolonien	265	60	0	0	7,4 · 10 ⁵
		147	259	0	0	
		n.a.	120	0	0	
0,50 %	Kolonien	16	3	1	0	3,4 · 10 ⁴
		20	3	1	0	
		11	2	0	0	
1,00 %	Kolonien	0	0	0	0	< 2000
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	
2,00 %	Kolonien	0	0	0	0	< 2000
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	
4,00 %	Kolonien	0	0	0	0	< 2000
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	

Ergebnisse von Versuch 8

Essigsäure , pH 3,5

Salmonella Java

Temperatur 40°C; Einwirkzeit : 30 min

Gesamtkeimzahl Vorkultur

Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	GKZ (KBE/ml)
Kolonien	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	74	13	5,6 · 10 ⁷
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	24	15	
	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2	

	Verdünnungs-Stufe	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	GKZ (KBE/ml)
Kontrolle	Kolonien	n.a.	n.a.	17	92	1,3 · 10 ⁷
		n.a.	n.a.	23	0	
		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Konzentration 0,25%	Kolonien	n.a.	n.a.	5	1	1,2 · 10 ⁶
		n.a.	n.a.	6	1	
		n.a.	n.a.	n.a.	0	
0,50 %	Kolonien	136	2	1	0	2,6 · 10 ⁵
		82	27	0	0	
		75	115	0	0	
1,00 %	Kolonien	26	0	0	0	5,2 · 10 ⁴
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	
2,00 %	Kolonien	0	0	0	0	< 2000
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	
4,00 %	Kolonien	0	0	0	0	< 2000
		0	0	0	0	
		0	0	0	0	

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Diplomarbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort, Datum

Unterschrift