

Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Axel Kramer)
und der Abteilung für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
(Abteilungsleiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Heckmann)
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Holger Lode)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Pasteurisierung von Muttermilch nach experimenteller Kontamination mit
homogener Mikrowelleneinwirkung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2014

vorgelegt von: Antje Kathrin Baschin, geb. Borgwardt

geboren am: 19.06.1984

in: Greifswald

Dekan: _____ Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar _____

1. Gutachter: _____ Prof. Dr. med. Axel Kramer _____

2. Gutachter: _____ Prof. Dr. med. Caroline Herr _____

3. Gutachter: _____

Tag der Disputation: _____ 16. März 2015 _____

Ort, Raum: _____ Greifswald, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin _____

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung und Problemstellung.....	5
1.1 Bedeutung von Muttermilch für die Ernährung von Früh- und Neugeborenen.....	5
1.2 Zielsetzung	7
1.3 Infektionsrisiken durch Muttermilch für Früh- und Neugeborene	8
1.4 Zur Thermoresistenz in Muttermilch vorkommender Krankheitserreger.....	11
1.5 Empfehlungen in der Literatur zur Pasteurisierung von Muttermilch unter Berücksichtigung der Mikrowellentechnik	12
2 Eigene Untersuchungen.....	20
2.1 Auswertung des Wochenscreenings der Station für Neonatologie der Universitätsmedizin Greifswald	20
2.1.1 Material und Methoden	20
2.1.2 Ergebnisse.....	21
2.1.3 Diskussion	23
2.2 Untersuchungen zur Erregerinaktivierung in Kuhmilchproben durch Mikrowelleneinwirkung	24
2.2.1 Material und Methoden	24
2.2.2 Ergebnisse.....	28
2.2.3 Diskussion	40
3 Schlussfolgerung und weiterführende Gedanken	42
4 Zusammenfassung	44
5 Summary.....	45
6 Literaturverzeichnis.....	46
Anhang.....	50
Eidesstattliche Erklärung.....	70

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grad Celsius
CMV	Cytomegalievirus
CSA	Caso Agar
CSL	Tryptische Soja-Nährbouillon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogener <i>Escherichia coli</i>
h	Stunde(n)
HACCP	hazard analysis and critical control points
HIV	human immunodeficiency virus
HTLV	human T-lymphotropic virus
HTST	High-temperature short-time pasteurization
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
KAA	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar
KbE	koloniebildende Einheiten
KNS	koagulase-negative Staphylokokken
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MRSA	methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
NCTC	National Collection of Type Cultures
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NHS	National Health Service
RF	Reduktionsfaktor
s	Sekunden
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
WHO	World Health Organization

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Bedeutung von Muttermilch für die Ernährung von Früh- und Neugeborenen

Muttermilch ist die optimale Nahrung für Früh- und Neugeborene. Die zahlreichen Vorteile gegenüber Formulanahrungen, von denen die gute Verträglichkeit, der Schutz vor Allergien und weiteren Erkrankungen sowie die optimale Zusammensetzung nur eine kleine Auswahl sind, sprechen für die Ernährung von Säuglingen mit Muttermilch, wann immer dies möglich ist (Bundesinstitut für Risikobewertung 2012). Durch ihre spezielle Zusammensetzung kann Muttermilch weder durch Kuhmilch noch durch Formulanahrungen, die größtenteils auf Kuhmilchbasis hergestellt sind, gleichwertig ersetzt werden. Vor allem im Proteingehalt und in der Proteinzusammensetzung unterscheidet sich Muttermilch von Kuhmilch, wie Schanler in einer Zusammenfassung aus verschiedenen Arbeiten 2012 übersichtlich dargestellt hat. Die Industrie kann diese Unterschiede bei den Formulanahrungen zwar größtenteils ausgleichen, die komplexe Zusammensetzung aus antimikrobiellen, antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und bioaktiven Faktoren kann jedoch noch immer nicht imitiert werden (Mayatepek 2007). Dazu kommt, dass sich die Zusammensetzung der Muttermilch im Verlauf der Stilldauer ändert und den jeweiligen Bedürfnissen des Säuglings angepasst wird.

Noch viel wichtiger als bei reifen Neugeborenen ist die Ernährung von Frühgeborenen mit Muttermilch, da ihr Darm noch unreifer und dementsprechend empfindlicher ist. Für sie ist es besonders wünschenswert, dass sie mit Muttermilch ernährt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz von Infektionen und Sepsis/Meningitis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht bis 1500 g signifikant reduziert wird, wenn diese Kinder mit Muttermilch statt mit Formulanahrung ernährt werden (Hylander et al. 1998).

Aus verschiedenen Gründen können jedoch viele Frühgeborene nicht direkt von der Mutter gestillt werden. Einige sind noch zu schwach, um selbst an der Brust zu saugen. Bei anderen ist es der Mutter aus unterschiedlichen Gründen nicht möglich zu stillen. Damit auch diese Kinder in den Genuss der Vorteile von Muttermilch kommen, pumpen viele Mütter die Milch ab und bringen sie zur

Ernährung ihrer Kinder in Flaschen in die Klinik. Bei dieser Prozedur und auch in der Klinik besteht bis zur Verabreichung die Gefahr der Kontamination mit bakteriellen Krankheitserregern und deren nachfolgender Vermehrung. Das kann zu einer gesundheitlichen Gefahr für die Säuglinge werden bis hin zur Sepsis, insbesondere bei Frühgeborenen oder bei Kindern mit sehr geringem Geburtsgewicht (Cossey et al. 2011).

Um das zu verhindern, wird Muttermilch bzw. Spendermilch für besonders gefährdete Kinder bei grenzwertiger Erregerlast auf ärztliche Anordnung pasteurisiert. Außerdem sind strenge Hygienevorschriften sowohl beim Abpumpen als auch beim Umfüllen und Portionieren einzuhalten (Kramer et al. 2013).

Zu beachten bleibt jedoch, dass es auch Kontraindikationen zum Stillen gibt. Dazu gehören u.a. die Galaktosämie (absolute Kontraindikation zur Muttermilchernährung, also auch keine Spendermilch), der mütterliche Konsum von „Straßendrogen“, die Einnahme von kontraindizierten Medikamenten wie Chemotherapeutika oder Radioisotopen und (zumindest in den Industrieländern) eine HIV-Infektion der Mutter (Mayatepek 2007). Die Infektion der Mutter mit Hepatitis-B-Virus, HTLV-1, Herpes-simplex-Virus, Varizella-zoster-Virus, Grippevirus, CMV, Borrelien, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, Toxoplasmen und Tuberkuloseerregern sowie Fieber unklarer Ursache stellen nur eine relative Kontraindikation dar. Bei Einhaltung gewisser Schutzmaßnahmen kann trotzdem gestillt werden (Kramer et al. 2013). Schadstoffbelastungen aus der Umwelt wie chlorierte Kohlenwasserstoffe und Dioxine können zwar in der Muttermilch nachgewiesen werden, sind aber nach heutigem Wissensstand kein Grund zum Abstillen. Eine Reduktionsdiät der Mutter mit erheblichem Abbau der Fettmasse sollte während der Stillzeit dennoch in jedem Fall unterbleiben (Mayatepek 2007).

Die Pasteurisierung ist ein nach dem französischen Chemiker Louis Pasteur (1822-1895) benanntes Verfahren zur Inaktivierung pathogener vegetativer Mikroorganismen in vorzugsweise flüssigen Produkten durch Hitzeeinwirkung < 100 °C (Holzapfel et al. 2004). Pasteur zeigte, dass Lebensmittel auf diese Art und Weise länger haltbar gemacht werden können.

Für die Qualität von abgepumpter Muttermilch und die Stabilität ihrer Inhaltsstoffe sind verschiedene Faktoren wichtig. Lawrence (2001) nennt in diesem Zusammenhang das Verfahren der Gewinnung sowie den Sammel- und den Lagerungsbehälter (sofern die Muttermilch umgefüllt wird). Den größten Einfluss auf die Qualität der Muttermilch haben laut Lawrence jedoch die Lagerungstemperatur und die Methode der Sterilisation bzw. Pasteurisierung. Daraus ergab sich für die vorgesehene Untersuchung die Fragestellung, ob es neben den bisher gebräuchlichen nicht ein weiteres Pasteurisierungs-Verfahren gibt, das mindestens genauso zuverlässig eine Erregerinaktivierung in der Milch zulässt, doch durch kürzere Einwirkzeiten der Temperatur die Inhaltsstoffe der Muttermilch schont.

1.2 Zielsetzung

Für die Entwicklung von reifen Neugeborenen und insbesondere von Frühgeborenen stellt Muttermilch die beste Möglichkeit der Ernährung dar. Die WHO erhält ihre bereits früher gegebene Empfehlung zur Wahl der Ernährung von Frühgeborenen mit geringem Geburtsgewicht auch in der aktuellen Leitlinie von 2011 aufrecht. An erster Stelle steht hier nach wie vor die Milch der eigenen Mutter. Ist dies nicht möglich, wird die Ernährung mit gespendeter Muttermilch fremder Mütter (sogenannter Frauenmilch) empfohlen, wann immer ein sicheres Milchbank-System zur Verfügung steht. Erst wenn auch diese Variante nicht möglich ist, wird eine Ernährung mit Formulanahrung empfohlen (WHO 2011).

Wird Muttermilch bzw. Frauenmilch abgepumpt und dem Säugling mit der Flasche oder mittels Sonde gegeben, kann es zu bakterieller Kontamination kommen. Gerade für Risiko-Frühgeborene kann diese Kontamination eine ernste, ggf. vitale Bedrohung darstellen. Auch von einer intrinsischen Kontamination mit Viren oder Bakterien kann eine entsprechende Gefährdung für die Kinder ausgehen. Um trotzdem nicht auf die Vorteile von Muttermilch verzichten zu müssen, ist man dazu übergegangen, diese für besonders gefährdete Kinder bei entsprechender Indikation zu pasteurisieren.

In der vorliegenden Arbeit wird analysiert, welche Mikroorganismen bei der Kontamination von Muttermilch eine besondere Bedeutung haben. Desweiteren wird ein Überblick über gebräuchliche Pasteurisierungsverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Eignung der Mikrowellentechnik gegeben. Angestrebt wird hierdurch eine zeitsparendere und eventuell schonendere Verarbeitung.

Die eigenen Untersuchungen umfassen die folgenden Schwerpunkte:

1. Analyse des Erregerspektrums mit der größten Bedeutung für die Kontamination von Muttermilch durch Auswertung des Wochenscreenings der Neonatologie der Universitätsmedizin Greifswald sowie Auswertung der routinemäßigen Pasteurisatorkontrollen in der Milchküche der Universitätsmedizin Greifswald
2. Untersuchungen zur Erregerinaktivierung in Kuhmilchproben durch Mikrowelleneinwirkung mit den verwendeten Mikroorganismen *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium* und *E. cloacae*

1.3 Infektionsrisiken durch Muttermilch für Früh- und Neugeborene

Grundsätzlich besteht für alle Früh- und Neugeborenen ein Infektionsrisiko durch Viren oder Bakterien in kontaminierter Muttermilch. Im Gegensatz zu Formulamilch gibt es für Muttermilch, die ausschließlich an das eigene Kind im Krankenhaus gefüttert wird, bisher keine mikrobiologischen Qualitätsstandards und allgemein verbindliche Regelungen zum hygienischen Umgang. Cossey et al. (2011) entwickelten deshalb ein HACCP-Konzept zum Umgang mit abgepumpter Muttermilch in Krankenhäusern. Der Plan umfasst die folgenden Schritte:

1. Abpumpen der Milch und Lagerung bei der Mutter zu Hause
2. Transport zum Krankenhaus
3. Lagerung im Krankenhaus
4. Vorbereitung für den Gebrauch (z.B. beim Umfüllen und Portionieren in der Milchküche der Klinik)
5. Fütterung.

Bei jedem dieser Schritte kann es zur Kontamination der Muttermilch durch Mikroorganismen der mütterlichen Hautflora, Umweltflora oder pathogene Mikroorganismen kommen, wenn nicht sogar bereits durch eine Infektion der Mutter eine Kontamination besteht. In diesem Fall wären Mikroorganismen bereits vor dem Abpumpen in der Milch vorhanden, wie es gewöhnlich bei Viren, z.B. bei HIV, der Fall ist. Relevante Viren sind dabei vor allem CMV, HIV und HTLV (Tully et al. 2001). Auch an der Universitätsmedizin Greifswald wurde ein entsprechend den örtlichen Gegebenheiten und Bedürfnissen angepasstes HACCP-Konzept für die hauseigene Milchküche entwickelt (Kramer u. Ryll 2011). Wie es in der Lebensmittelbranche in Deutschland üblich und für Betriebe vorgeschrieben ist, sollte ein solches Konzept zur Sicherstellung der Nahrungssicherheit für jede Milchküche erstellt werden.

An Bakterien haben Israel-Ballard et al. (2006) in ihren Untersuchungen in Südafrika *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und Streptokokken der Gruppen A und B in Muttermilchproben gefunden. Van Gysel et al. (2012) zitieren Studien, nach denen 60-80 % der Proben von abgepumpter Muttermilch kontaminiert waren, v.a. mit Vertretern der Hautflora wie KNS, alpha-hämolyisierende und nichthämolyisierende Streptokokken sowie Diphtheroide, aber auch mit potentiell pathogenen Erregern wie CMV, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella spp.*

Diese Mikroorganismen können durch geeignete Pasteurisierungsmethoden entweder komplett aus der Muttermilch eliminiert oder zumindest in ihrer Anzahl soweit reduziert werden, dass eine Infektion des Früh- oder Neugeborenen unwahrscheinlich ist. Allerdings gibt es bisher keine festgelegte minimale Infektionsdosis, die als Grenzwert und Qualitätsmerkmal einer Pasteurisierungsmethode verwendet werden könnte – weder für die kommensale Hautflora noch für spezifische Pathogene (Cossey et al. 2011). Lediglich für Muttermilch aus Milchbanken gibt es Empfehlungen, die vom National Institute for Health and Clinical Excellence des NHS (2010) veröffentlicht wurden. Darin heißt es, dass rohe Muttermilch nicht mehr als 10^5 KbE/ml Gesamtlast haben darf, für *Enterobacteriaceae* und *S. aureus* muss dieser Wert $< 10^4$ KbE/ml sein. Für pasteurisierte Milch darf hiernach ein Wert von 10 KbE/ml nicht überschritten werden. Ob diese strengen Richtlinien

allerdings auch herangezogen werden sollten, wenn eine Mutter für ihr eigenes Kind Muttermilch abgibt, wird von Cossey et al. bezweifelt.

Wie groß der Vorteil der Pasteurisierung bei der Minimierung des Infektionsrisikos auch ist, darf dennoch die Frage, inwieweit dadurch ernährungsphysiologisch wichtige Eigenschaften der unbehandelten Muttermilch durch thermische Einwirkung beeinflusst werden, nicht unberücksichtigt bleiben. So wirkt sich das Füttern von roher Muttermilch schützend für eine ganze Reihe von Erkrankungen aus. Hierzu gehören z.B. Otitis media, Diarrhoe, nekrotisierende Enterokolitis (NEC) sowie Infektionen des Respirationstraktes (Van Gysel et al. 2012). Laut dieser Studie verändern sich durch Pasteurisierung auch die antimikrobiellen Eigenschaften von Muttermilch. So konnte gezeigt werden, dass rohe Muttermilch die Vermehrung von Mikroorganismen hemmt. In ihrer Studie verwendeten Van Gysel et al. *S. aureus* (ATCC 6538) und *Escherichia coli* (NCTC 10538) und verglichen beimpfte Muttermilchproben in ihren antimikrobiellen Eigenschaften mit einer beimpften Nährbouillon als Positivkontrolle. Jede Muttermilchprobe wurde vor dem Beimpfen in zwei Aliquote geteilt, von denen ein Aliquot mittels Holder Pasteurisierung behandelt und das andere roh belassen wurde. Nach Inkubation wurde abgelesen, dass sowohl in der Fraktion mit den rohen Proben als auch in der Fraktion mit den pasteurisierten Proben eine Wachstumshemmung der Mikroorganismen (im Vergleich zur Positivkontrolle) stattgefunden hatte, dass jedoch diese Wachstumshemmung bei den rohen Muttermilchproben deutlich ausgeprägter war. Auch Tully et al. (2001) zitieren Studien, nach denen sich Mikroorganismen in pasteurisierter Milch schneller vermehren als in unbehandelter Milch, da bakteriostatische Eigenschaften der Milch durch den Prozess des Pasteurisierens reduziert werden. Insofern ist es bei pasteurisierter Muttermilch noch wichtiger, die hygienischen Standards im Umgang mit ihr einzuhalten und die Indikation zur Pasteurisierung insgesamt streng zu stellen.

1.4 Zur Thermoresistenz in Muttermilch vorkommender Krankheitserreger

Zu den resistentesten Mikroorganismen gegen Umwelteinflüsse gehört *S. aureus*, der eine Hitzeeinwirkung von 60 °C über eine Zeitdauer von 30 min übersteht (Hahn et al. 2009). Auch weitere Staphylokokkenspezies, wie *Staphylococcus epidermidis* als Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken, sind resistent gegen den Faktor Hitze (Hahn et al. 2009). Zu den eher thermosensiblen Organismen gehören die Streptokokken, daher sind sie bei der Pasteurisierung von Muttermilch ein eher kleineres Problem. Enterokokken, wie z.B. *E. faecium*, sind sehr thermostabil. Temperaturen von 45 °C überstehen sie problemlos (Hahn et al. 2009). Bei den Enterobakterien, zu denen *E. coli*, *E. cloacae*, Serratien und Klebsiellen gehören, ist ebenfalls eine hohe Resistenz gegen Umwelteinflüsse bekannt. So vermehrt sich *E. coli* noch bis 46 °C und wird bei Temperaturen über 60 °C erst nach mehreren Minuten inaktiviert. *E. coli* ist auch insofern gefährlich, weil er sich auch bei 4 °C vermehren kann (Hahn et al. 2009). Dieser Wert entspricht der im Krankenhaus üblichen Kühlschrank-Lagerungstemperatur von Muttermilch.

Es stellt sich jedoch nicht nur die Frage, wie thermoresistent die in Muttermilch vorkommenden Krankheitserreger sind, sondern auch, inwieweit einzelne Bestandteile der Milch auf thermische Einwirkung reagieren. So stellten Tully et al. (2001) fest, dass z.B. die in Muttermilch enthaltenen Lipasen sehr thermolabil sind und durch Holder-Pasteurisierung inaktiviert werden. Milch, die der HTST-Pasteurisierung unterzogen wurde, zeigte eine Lipaseaktivität, die der von unbehandelter Muttermilch noch am ähnlichsten ist (Baro et al. 2011). Das deutet darauf hin, dass nicht nur die Temperatur allein, sondern auch die Zeitspanne der thermischen Behandlung von Muttermilch Einfluss auf die Aktivität der verschiedenen Komponenten hat und dass zumindest im Fall der Lipasen offensichtlich ein günstigerer Effekt erzielt wird, wenn die Temperatur zwar höher ist als bei der Holder-Pasteurisierung, die Einwirkzeit jedoch deutlich geringer.

1.5 Empfehlungen in der Literatur zur Pasteurisierung von Muttermilch unter Berücksichtigung der Mikrowellentechnik

Empfehlungen zur Pasteurisierung von Muttermilch allgemein

Die in der Literatur am häufigsten genannte Form der Pasteurisierung ist die Holder Pasteurisierung. Dabei wird die Milch im Wasserbad auf eine Temperatur von 62,5 °C erhitzt und diese Temperatur über einen Zeitraum von 30 min aufrechterhalten (Tully et al. 2001). Viele Geräte verfügen dabei über keine Möglichkeit, die Muttermilch während des Pasteurisierungsvorganges zu durchmischen.

Neben der Holder Pasteurisierung findet man in der Literatur als weitere Methode zur Pasteurisierung die aus der Lebensmittelindustrie bekannte HTST-Pasteurisierung. Dabei wird die Milch für 15 s auf 72 °C erhitzt (Baro et al. 2011). In der Literatur ist man sich nicht einig, welche Methode als die bessere anzusehen ist.

Während die einen Autoren es für die Gesamt-Proteinaktivität als besser betrachten, die Milch auf eine möglichst geringe Temperatur zu erhitzen und dafür in Kauf nehmen, dass die gesamte Prozedur bei der Holder Pasteurisierung über den langen Zeitraum von 30 min aufrechterhalten wird, sind andere Autoren gegenteiliger Auffassung und plädieren dafür, den Zeitraum der thermischen Behandlung so kurz wie möglich zu halten und dafür eine höhere Temperatur zuzulassen. So geben Baro et al. (2011) an, dass die Proteinmuster nach der Pasteurisierung denen von frischer, unbehandelter Muttermilch ähnlicher sind, wenn man die HTST-Pasteurisierung im Vergleich zur Holder-Pasteurisierung anwendet. Weiterhin heißt es in der Studie, dass Lactoferrin, IgA, IgG, Insulin und Wachstumsfaktoren sowie die antioxidative Kapazität von Muttermilch durch HTST-Pasteurisierung besser erhalten bleiben. Dabei wurde jeweils nicht nur untersucht, inwieweit die Integrität, sondern auch inwieweit die biologische und immunologische Aktivität dieser Proteine erhalten blieb. Die Ergebnisse sprechen dafür, Muttermilch möglichst nur eine kurze Zeitspanne thermischer Einwirkung zu unterziehen. Andererseits argumentieren Silvestre et al. (2008), dass man nicht nur die einzelnen Komponenten der Muttermilch isoliert untersuchen darf, sondern die Eigenschaften des

Endproduktes vergleichen muss. In ihren Untersuchungen fanden sie, dass die bakterizide Aktivität von Muttermilch umso mehr abnimmt, je höher die Temperatur bei der Pasteurisierung war. Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen war jedoch, dass auch unpasteurisierte Muttermilch deutlich an bakterizider Kapazität verliert, wenn sie bis zum Füttern im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wird. Sowohl die mittels Holder-Methode als auch die mittels HTST-Methode pasteurisierte Milch verlor durch die Lagerung im Kühlschrank jedoch nicht weiter an bakterizider Aktivität (Silvestre et al. 2008). Somit war letztendlich der Unterschied in der bakteriziden Aktivität zwischen pasteurisierter und unbehandelter Milch nicht mehr so groß.

Als eine weitere, wenig technisierte Methode zur Pasteurisierung beschreiben Chantry et al. (2011) die Flash-Heat-Behandlung. Diese wurde entwickelt, um unter häuslichen Bedingungen eine Pasteurisierung von Muttermilch zu ermöglichen und damit HIV-positiven Müttern in weniger entwickelten Ländern ein Instrument in die Hand zu geben, die Übertragungsrate von HIV über infizierte Muttermilch zu verringern. In der Studie wurden fünfzig Muttermilchproben von südafrikanischen HIV-infizierten Müttern gesammelt. Diese wurden auf eine Art behandelt, wie es den Müttern im häuslichen Umfeld selbst möglich wäre, wenn sie abgepumpte Muttermilch für ihre Kinder pasteurisieren wollten.

Die Milch wurde in Portionen von 50 ml in einem offenen 455 ml-Glasgefäß in einem Aluminium-Topf mit 450 ml Wasser auf einer Gasflamme erhitzt, bis das Wasser bei 100 °C sichtbar sprudelnd kochte. Dann wurde das Glasgefäß sofort aus dem Wasserbad genommen um abzukühlen. Dabei erreichte die Milch selbst meist Temperaturen um 72 °C und hatte über einen Zeitraum von circa 6 min eine Temperatur von über 56 °C. Die Autoren fanden in ihren Untersuchungen, dass die bakteriostatische Aktivität von Flash-Heat-behandelter Muttermilch vergleichbar ist mit der von nicht erhitzter Muttermilch und vermuteten, dass durch das langsamere Erhitzen und Abkühlen, wie es bei ihrer Methode stattfindet, im Vergleich zur HTST-Pasteurisierung ein geringerer Schaden an der Qualität der Milch entsteht. Das könnte die Unterschiede ihrer Ergebnisse zu denen aus der Studie von Silvestre et al. (2008) erklären, die

trotzdem noch einen signifikanten Unterschied zwischen HTST-behandelter und unbehandelter Muttermilch fanden.

Auch die Methode der Pretoria-Pasteurisierung ist wie die Flash-Heat-Behandlung speziell für wenig entwickelte Länder mit niedrigem technischem Standard ausgelegt. Sie wurde ebenfalls entwickelt, um HIV-positiven Müttern das gefahrlose Füttern ihrer Muttermilch an ihre Babys zu ermöglichen. Auch in diesem Fall wird die Muttermilch in ein definiertes Glasgefäß gefüllt, jedoch mit einem Deckel verschlossen. In einem Aluminiumtopf wird Wasser zum Siedepunkt erhitzt, bis es sichtbar sprudelnd kocht. Der Topf wird dann von der Hitzequelle entfernt und das Glasgefäß mit der Muttermilch sofort und ohne Verzögerung in den Topf gestellt. Im Unterschied zur Flash-heat-Methode werden also nicht das Wasser im Aluminiumtopf und das Milchgefäß zusammen erhitzt, sondern das Gefäß mit der Muttermilch wird erst in das bereits kochende Wasser gestellt. Das Gefäß mit der Muttermilch bleibt dann für 20 min in dem heißen Wasserbad stehen. Dieser passive Hitzetransfer soll bei einer sicheren Erregerinaktivierung die ernährungsphysiologischen Bestandteile und die protektiven Eigenschaften der Muttermilch erhalten (Jeffery u. Mercer 2000).

Eine Weiterentwicklung der HTST-Pasteurisierung geht derzeit von der Universität Tübingen aus. Dort wurde in einer Kooperation von Wissenschaft (Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikums Tübingen und Abteilung für Neonatologie der Universitäts-Kinderklinik Tübingen) und Industrie (Klaus Lauf, Medizintechnik und Sonderbau und Virex GmbH, beide Tübingen, Deutschland) ein neues Gerät zur Kurzzeithitzebehandlung entworfen und hergestellt. Mit diesem Gerät (Virex IV) werden Muttermilchproben mit einem Volumen von 15-50 ml mittels Heißluft auf eine Maximaltemperatur von 60-62 °C erhitzt. Diese wird für 5 s gehalten. Anschließend erfolgt eine rasche Abkühlung mittels Kühlwasser. Der gesamte Bearbeitungsprozess einer einzelnen Probe dauert 90 s. Die Hersteller versprechen eine absolut zuverlässige Inaktivierung von humanem CMV. Gleichzeitig sollen die übrigen Inhaltsstoffe der Milch (Proteine, Enzyme) nicht denaturiert werden. Ihre Aktivität soll erhalten bleiben (Virex GmbH). Unabhängige Studien über die

Wirksamkeit dieses Verfahrens und die Qualität bzw. Aktivität der Inhaltsstoffe der Milch stehen bisher jedoch aus. Auch Untersuchungen über die Eignung dieses Verfahrens zur Inaktivierung bakterieller und weiterer viraler Erreger wären interessant.

Pasteurisierung von Muttermilch in Mikrowellengeräten

Im Allgemeinen wird von einer Erwärmung von Muttermilch in Mikrowellengeräten eher abgeraten. Das bezieht sich vor allem auf den Einsatz von handelsüblichen Haushaltsmikrowellen. Als ein Hauptproblem erweist sich hierbei insbesondere die inhomogene Erhitzung von Flüssigkeiten in Haushaltsmikrowellen. Dabei entstehende Hitzenester können zu Verbrühungen führen, wenn einem Säugling in einem Mikrowellengerät erhitzte Muttermilch (oder auch Formulanahrung) gegeben wird (La Leche Liga International 2014). Auch die möglicherweise stattfindende negative Beeinträchtigung der Bestandteile von Muttermilch wird immer wieder als Grund genannt, keine Mikrowellengeräte zu verwenden. Die Studienlage hierzu ist jedoch nicht eindeutig.

Resultate der Mikrowellenbehandlung sind u.a. eine reduzierte Zellzahl sowie reduzierte Zellfunktion der überlebenden Zellen. Dieser Effekt auf die Qualität der Muttermilch wird jedoch nicht nur bei der Mikrowellenbehandlung beobachtet, sondern findet auch durch Lagerung, Einfrieren, Pasteurisieren und Behandeln mittels Ultraschall statt (Lawrence 2001).

Sigman et al. führten 1989 eine Studie zur Behandlung von Muttermilch in einem Mikrowellengerät durch. Dabei wurden Proben zu je 30 ml für 50 s bei 700 Watt in einem handelsüblichen Mikrowellengerät behandelt. Im Ergebnis zeigte sich, dass im Mikrowellengerät zwar eine akzeptable Erregerinaktivierung stattfindet, dass jedoch auch das in der Muttermilch enthaltenen IgA zerstört wird. Die Ausprägung dieser IgA-Zerstörung scheint von der erreichten Temperatur der Milch abhängig zu sein. Und genau hier liegt nach Meinung der Autoren auch das Problem der Mikrowellenbehandlung. Durch die inhomogene Erhitzung der Muttermilch, die z.B. auch von der genauen Positionierung des Probenbehälters im Gerät abhing, wurden

Endtemperaturen mit einer Schwankungsbreite von 24 °C gemessen. Im Vergleich dazu betrug diese Schwankungsbreite bei der Holder-Pasteurisierung nur 6 °C. Sigman et al. schlugen jedoch vor, die Pasteurisierung mittels Mikrowellentechnik weiter zu untersuchen, wenn geeignetere Geräte zur Verfügung stehen.

Quan et al. untersuchten 1992 die Auswirkungen von Mikrowellenbehandlung auf Muttermilch. Sie erhitzen die Proben für 30 s in Standard-Haushaltsmikrowellen auf unterschiedlichen Leistungsstufen (niedrig und hoch) und untersuchten sie danach auf Lysozymaktivität und IgA (Gesamt-IgA und spezifisches sekretorisches IgA gegen *E. coli* Serotypen 01, 04 und 06). Außerdem setzten sie in einem weiteren Versuchsaufbau mikrowellenbehandelter Muttermilch eine *E. coli*-Suspension zu und verglichen die antibakteriellen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Leistungsstufe des Mikrowellengeräts (niedrig – 22-25 °C, mittel – 60-70 °C und hoch - ≥ 98 °C), mit der die Proben behandelt wurden. Leider wird der Energieeintrag in dieser Studie nicht genau in Watt beziffert, sondern lediglich mit „niedrig“, „mittel“ und „hoch“ angegeben. Dies macht es schwierig, den genauen Versuchsaufbau nachzuvollziehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lysozym-Aktivität und IgA signifikant abnahmen. Die bakterielle Wachstumshemmung ging mit steigender Leistungsstufe zurück. Hierzu muss jedoch angemerkt werden, dass durch die Verwendung von einfachen Haushaltsmikrowellen in diesem Studiendesign starke Temperaturschwankungen auftraten. Quan et al. gaben für die Versuche zum Einfluss auf Lysozym und IgA für die niedrige Leistungsstufe eine Durchschnittstemperatur von 33,5 °C an, jedoch mit einer hohen Schwankungsbreite zwischen 20 und 53 °C. Für die hohe Leistungsstufe wurde die Durchschnittstemperatur mit 90,5 °C angegeben, die Schwankungsbreite lag zwischen 72 und 98 °C. Die Temperatur wurde auch nicht während der Mikrowellenbehandlung bestimmt (in einfachen Haushaltsmikrowellen nicht ohne weiteres möglich), sondern hinterher durch Umrühren der Probe mit einem Thermometer. Das zeigt bereits die technischen Schwierigkeiten, die bei der Behandlung mit einfachen Haushaltsmikrowellen entstehen. Dazu gehört neben der genauen Temperaturbestimmung während der Behandlung auch die exakte Dosierung der Strahlung, die bei

Haushaltsmikrowellen z.B. stark von der genauen Positionierung der Probe im Gerät und damit verbunden vom Abstand zur Strahlenquelle abhängt. Jedoch gaben Quan et al. zu bedenken, dass die von ihnen beobachteten Auswirkungen auf die Qualität von mikrowellenbehandelter Muttermilch möglicherweise nicht allein auf die Temperatur, der die Milch ausgesetzt wird, zurückzuführen ist. Es gibt möglicherweise auch nicht-thermische Effekte durch die Mikrowellenbehandlung, die die Qualität der Milch beeinträchtigen. Daher sehen es auch diese Autoren als notwendig an, in weiteren Studien zu untersuchen, ob und wie eine sichere Anwendung von Mikrowellenbehandlung der Muttermilch möglich ist.

Auch Ovesen et al. stellten 1996 die Frage, ob Muttermilch in Mikrowellengeräten behandelt werden kann, ohne dass unerwünschte Verluste von Nährstoffen und Immunglobulinen auftreten. Durch ihre Untersuchungen kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Pasteurisierungsmethode (Wasserbad oder Mikrowelle) keine Auswirkungen auf den Gehalt von Vitaminen und mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Muttermilch habe. Im Falle der Aktivität von spezifischen Immunglobulinen (IgA, IgG und IgM) kam es zwar temperaturabhängig zu einer Abnahme der Aktivität, jedoch geschah das auch bei der konventionellen Pasteurisierung. Zwischen beiden Methoden gab es laut Ovesen et al. keinen signifikanten Unterschied. Das Hauptproblem der mikrowellenbasierten Pasteurisierung wird auch von diesem Team in der inhomogenen Erhitzung von Flüssigkeiten in herkömmlichen Mikrowellengeräten gesehen. Es kann hier leicht zu versehentlichem Überhitzen der Muttermilch kommen. Jedoch wird auch in dieser Studie nicht nur die erreichte Höchsttemperatur als bedeutende Variable für die Qualität der Muttermilch und ihrer Komponenten gesehen, sondern ebenfalls die Zeit, die bis zum Erreichen der gewünschten Temperatur gebraucht wird („Zeitrampe“). Als weitere relevante Variablen werden außerdem die Zeit zum Abkühlen, das Probenvolumen und die Proteinkonzentration aufgeführt.

Die von Carbonare et al. ebenfalls 1996 durchgeführte Studie stellt die Anwendung von Mikrowellengeräten in Zusammenhang mit Muttermilch deutlich weniger bedenklich dar. Auch hier wurden die Auswirkungen

verschiedener Behandlungsmethoden auf Kolostrum und reife Milch untersucht und festgestellt, dass die Fähigkeit von Muttermilch, die Anhaftung von *E. coli* an humane Epithelzellen zu hemmen, weder durch Mikrowellenbehandlung noch durch Pasteurisierung signifikant verändert wurde. Der IgA-Gehalt der Milch wurde nach dieser Studie sogar durch Pasteurisierung stärker reduziert als durch Mikrowellenbehandlung, insbesondere die Konzentration von anti-EPEC IgA in Kolostrum. Der Gesamtproteingehalt sei jedoch bei keiner der verwendeten Behandlungsmethoden beeinträchtigt worden. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass der Schutz vor durch EPEC ausgelöster infantiler Diarrhoe durch Muttermilch weder durch Pasteurisierung noch durch Mikrowellenbehandlung beeinträchtigt wird.

In der wahrscheinlich neuesten Untersuchung von Tacken et al. (2009) wird festgestellt, dass nach Mikrowellenbehandlung der Gehalt an Triglyceriden und Karotinoiden in reifer Muttermilch stabil bleibt. Die Autoren sehen den Gebrauch von Mikrowellen in Zusammenhang mit Muttermilch als sicher an. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass Tacken et al. die Muttermilch lediglich auf Temperaturen zwischen 35 und 40 °C erhitzt haben.

Pasteurisierung von Muttermilch in der Universitätsmedizin Greifswald

Bedauerlicherweise gibt es in Deutschland keine bundeseinheitlichen Leit- oder Richtlinien für die Indikationsstellung zur Pasteurisierung von Muttermilch. Das führt dazu, dass jede Klinik ein eigenes Verfahrensschema entwirft. Auf der Station für Neonatologie der Universitätsmedizin Greifswald gelten derzeit folgende Indikationen zur Pasteurisierung von Muttermilch:

Die Pasteurisierung der Muttermilch erfolgt bei Frühgeborenen bis zur 32. SSW, wenn das Stillen durch die Eltern des Kindes erwünscht ist, wobei die ersten beiden Tage nicht pasteurisiert werden muss, da das CMV frühestens am 3. Tag im Kolostrum nachweisbar ist (Doctor et al. 2005). Das ist auch für CMV-IgG positive, aber CMV-IgM negative Mütter möglich (Kramer et al. 2013). Vorher müssen die Eltern darüber aufgeklärt werden, dass man durch das Pasteurisieren zwar eine sehr seltene, schwere CMV-Infektion verhindert, das

Risiko für eine NEC sich aber dadurch verdreifacht. Das Ergebnis des Aufklärungsgesprächs muss durch den aufklärenden Arzt schriftlich festhalten werden. Für die Risikoanalyse ist zu berücksichtigen, dass auch bei negativem CMV-IgM CMV-IgG-positive Mütter das Virus durch Reaktivierung über die Muttermilch übertragen können (Hayes et al. 1972, Hamprecht et al. 2001, Doctor et al. 2005). Für Reifgeborene ist das nicht kritisch, weil die Infektion mit CMV asymptomatisch verläuft (Kumar et al. 1984, Hamprecht et al. 2001, 2003, Capretti et al. 2009). Auch bei Frühgeborenen findet sich meist kein Unterschied zur Kontrollgruppe (Dworsky et al. 1993, Kumar et al. 1984, Paryani et al. 1985, Dvorak et al. 2003, Vollmer et al. 2004). Bei extrem unreifen Frühgeborenen sind dagegen schwere Infektionen mit tödlichem Ausgang beschrieben (Stagno et al. 1980, Dworsky et al. 1993, Vochem et al. 1998, Maschmann et al. 2001, Neuberger et al. 2006). Da das reifste Kind mit schwerem CMV Verlauf ein Frühgeborenes von 30 SSW war (Hamprecht et al. 2001), sollten Frühgeborene vor der 32. SSW entweder nach Aufklärung der CMV-IgM oder CMV-IgG positiven Mutter nicht gestillt werden oder die Milch ist zu pasteurisieren (Kramer et al. 2013).

Zusätzlich kann eine Pasteurisierung auf gesonderte ärztliche Anordnung durchgeführt werden (z.B. bei pathologischen Befunden im mikrobiologischen Monitoring).

Die genannten Punkte sind jedoch eher eine Entscheidungshilfe für den behandelnden Arzt, keinesfalls aber eine fest verbindliche Handlungsanweisung. Ob Muttermilch tatsächlich pasteurisiert wird, bleibt immer eine Einzelfallentscheidung, in die viele Faktoren einbezogen werden müssen.

Abschließend sei noch einmal bekräftigt, dass unpasteurisierte Muttermilch der eigenen Mutter für jeden Neonaten – auch Frühgeborene – die beste Wahl ist (Baro et al. 2011). Daher sollte die Indikation zur Pasteurisierung unter Abwägung aller Vor- und Nachteile für das Kind streng gestellt werden.

2 Eigene Untersuchungen

Die Untersuchungen gliedern sich in die folgenden beiden Schwerpunkte:

1. Ermittlung des Erregerspektrums mit der größten Bedeutung für die Kontamination von Muttermilch durch Auswertung des Wochenscreenings der Neonatologie der Universitätsmedizin Greifswald sowie durch Auswertung der routinemäßigen Pasteurisatorkontrollen in der Milchküche der Universitätsmedizin Greifswald
2. Untersuchungen zur Erregerinaktivierung in Kuhmilchproben durch Mikrowelleneinwirkung mit den verwendeten Mikroorganismen *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium* und *E. cloacae*

2.1 Auswertung des Wochenscreenings der Station für Neonatologie der Universitätsmedizin Greifswald

2.1.1 Material und Methoden

Muttermilchscreening

Auf der Station für Neonatologie werden routinemäßig einmal wöchentlich Muttermilchproben auf darin enthaltene Mikroorganismen untersucht. Hierbei werden Proben aus den Fütterungsflaschen der Säuglinge direkt auf der Station entnommen und in das krankenhaushygienische Labor des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald geschickt. Dort werden die Proben kultiviert, ausgewertet und in Protokollen dokumentiert. In dieser Arbeit wurde retrospektiv eine Auswertung des sogenannten Wochenscreenings mithilfe der Screeningprotokolle aus den Jahren 2008 bis 2010 durchgeführt. Auf jedem Protokoll wurden die folgenden Daten vermerkt: Name und Geburtsdatum des Kindes, Datum der Probenentnahme, Angabe, ob die Muttermilchprobe pasteurisiert oder nicht pasteurisiert wurde und das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung (Art und Menge der gefundenen Mikroorganismen). Dazu wurden 0,5 ml und 0,1 ml einer Verdünnung von 10^{-2} auf Blutagar angelegt und für 24 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die qualitative und quantitative Auswertung der gewachsenen Kulturen.

Pasteurisatorkontrolle

Weiterhin wird im Rahmen des Wochenscreenings ca. einmal monatlich die Effektivität des hauseigenen Pasteurisators (Holder-Methode, Barkey-Pasteurisierung, 63 °C für 30 min) stichprobenartig kontrolliert. Hierzu wird eine Bakteriensuspension hergestellt, indem der Testorganismus *E. faecium* ATCC 6057 auf einer Stammplatte angelegt wird. Von dieser Stammplatte können innerhalb von 4 Wochen Arbeitsplatten angelegt werden, d.h. es werden CSA-Platten beimpft und 24 h bei 36 ± 1 °C inkubiert. Anschließend werden die Arbeitsplatten mit je 10 ml NaCl 0,9 % abgeschwemmt. Die zu bestimmende Ausgangskoloniezahl soll 10^9 KbE/ml betragen. Nun wird eine 150 ml-Milchflasche mit 1 ml der hergestellten Erregersuspension versehen und mit NaCl 0,9 % auf 100 ml aufgefüllt. Zunächst wird die Ausgangskoloniezahl in der Testflasche bestimmt. Dazu werden 0,1 ml der Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} auf KAA-Agar angelegt und 48 h bei 36 ± 1 °C inkubiert. Es sollte eine Konzentration von 10^7 KbE/ml erreicht werden. Anschließend durchläuft die Testflasche einen normalen Prozess im Pasteurisator und wird danach im Labor untersucht. Nach Eingang im Labor werden sofort 0,1 ml und 1,0 ml der Testsuspension auf KAA-Agar angelegt und für 48 h bei 36 ± 1 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platten ausgewertet. Wurde eine Reduktion um mindestens 5 log-Stufen erreicht, wird das Ergebnis als zufriedenstellend betrachtet. Werden die 5 log-Stufen unterschritten, wird eine Kontrolle angeordnet.

2.1.2 Ergebnisse

Muttermilchscreening

Im Jahr 2008 wurden 189 Muttermilchproben auf eine Kontamination mit Mikroorganismen untersucht. Davon waren 80 Proben vorher pasteurisiert und 35 nicht pasteurisiert worden. Die übrigen 74 Proben mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden, weil die Angabe fehlte, ob eine Pasteurisierung stattgefunden hatte oder nicht.

Für das Jahr 2009 standen 184 Protokolle zur Verfügung, von denen 171 in die Auswertung eingeschlossen werden konnten, davon 67 von pasteurisierten Muttermilchproben und 104 von unpasteurisierten Proben.

Aus dem Jahr 2010 gab es Protokolle von insgesamt 65 Proben. Davon konnten 20 pasteurisierte und 44 unpasteurisierte Proben in die Auswertung eingeschlossen werden. Nur eine Probe musste wegen fehlender Angabe zur Pasteurisation ausgeschlossen werden.

In den insgesamt 350 untersuchten Proben (167 pasteurisiert, 183 nicht pasteurisiert) sind die in Tab. 1 genannten Mikroorganismen nachgewiesen worden.

Tab. 1: In pasteurisierten bzw. unpasteurisierten Muttermilchproben nachgewiesene Bakterienspezies

Erreger	pasteurisiert (167)	unpasteurisiert (183)
KNS	63 (37,7 %)	166 (90,7 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	20 (12,0 %)	26 (14,2 %)
MSSA	13 (7,8 %)	20 (10,9 %)
<i>Enterococcus faecium</i>	7 (4,2 %)	18 (9,8 %)
aerobe Sporenbildner	11 (6,6 %)	9 (4,9 %)
<i>Escherichia coli</i>	2 (1,2 %)	17 (9,3 %)
<i>Enterobacter cloacae</i>	14 (8,4 %)	3 (1,6 %)
<i>Streptococcus</i> spp.	3 (1,8 %)	10 (5,5 %)
<i>Klebsiella</i> spp.	5 (3,0 %)	6 (3,3 %)
kein Erregernachweis	76 (45,5 %)	5 (2,7 %)

Alle Angaben in Prozent geben die Häufigkeit für jede Spezies bezogen auf das Vorkommen in allen Proben in der jeweiligen Tabellenspalte an.

In weniger als 3 % aller Proben wurden außerdem folgende Erreger gefunden: *Acinetobacter* spp., andere *Enterococcus* spp., *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Pantoea* spp., *Alcaligenes* spp., andere *Enterobacter* spp., *Micrococcus luteus*, *Acremonium* spp. und *Pseudomonas fluorescens*.

Es muss beachtet werden, dass viele Proben gleichzeitig mit verschiedenen Mikroorganismen kontaminiert waren. Bei 81 der insgesamt 350 Proben (23,1 %) wurde kein Erregerwachstum festgestellt. Darunter waren 76 der 167 pasteurisierten Proben (45,5 %) und 5 der 183 nicht pasteurisierten Proben (2,7 %).

Pasteurisatorkontrolle

Im Untersuchungszeitraum zwischen 2008 und 2010 wurden 41 Kontrollflaschen mit *E. faecium*-Suspension testweise im hauseigenen Pasteurisateur mitbehandelt. In 21 der 41 Testflaschen konnte eine ausreichende Reduktion von mindestens 5 log-Stufen erreicht werden. In den übrigen 20 Testflaschen wurde die 5 log-Stufen-Grenzmarke unterschritten.

2.1.3 Diskussion

Muttermilchscreening

Die mit Abstand am häufigsten gefundenen Mikroorganismen in den Muttermilchproben waren KNS. Sie waren in 90,7 % aller unpasteurisierten Proben und in 37,7 % der pasteurisierten Proben enthalten. Dieser hohe Anteil erklärt sich aus ihrer Rolle als Bestandteil der kommensalen Hautflora. Die Kontamination erfolgt am ehesten während des Abpumpens der Milch. Ihre Rolle als Pathogen ist bei alimentärer Aufnahme nicht gegeben; insofern sollen diese Erreger im Folgenden nicht berücksichtigt werden. Erschreckend ist jedoch, in wie vielen Proben Vertreter der Enterobakterien vorkommen, die häufig eine pathogene Rolle spielen. Unter den gefundenen Mikroorganismen sticht *Enterococcus faecium* als besonders thermostabiler Erreger heraus. Er wird z.B. in der Lebensmittelindustrie als Indikatororganismus für Hygienequalität genutzt, da ein Wachstum dieses Erregers noch bei 50 °C möglich ist. Auf diesen Erreger gilt es also im Zusammenhang mit Pasteurisierungsstudien von Muttermilch ein besonderes Augenmerk zu richten. Interessanterweise waren deutlich mehr pasteurisierte als unpasteurisierte Proben mit *Enterobacter cloacae* kontaminiert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass dieser Erreger besonders sensibel auf die bakteriostatischen Eigenschaften von unbehandelter Muttermilch reagiert. Wird die Milch jedoch pasteurisiert und eben diese Eigenschaft dadurch in Mitleidenschaft gezogen, vermehrt sich *E. cloacae* anscheinend leichter. Bei dieser Erklärung handelt es sich jedoch bisher lediglich um eine Hypothese, die experimentell untermauert werden müsste.

Pasteurisatorkontrolle

Die Stichproben zur Kontrolle des Pasteurisators zeigten ein unbefriedigendes Ergebnis. Nur in 51,2 % der untersuchten Flaschen war das Ergebnis zufriedenstellend. In 48,8 % war es das nicht, da die geforderte Reduktion von ≥ 5 log-Stufen nicht erreicht wurde. Das zeigt, wie dringend nötig es ist, sich über die Methode des Pasteurisierens Gedanken zu machen. Denn wenn von ärztlicher Seite erst einmal die Indikation zur Pasteurisierung gestellt wird, hat das wichtige medizinische Gründe und sollte deshalb auch effektiv sein. Es muss also entweder das derzeit angewendete Verfahren deutlich verbessert oder eine neue Methode eingeführt werden.

In dieser Arbeit sollte daher ein bereits bestehender Ansatz, nämlich die Pasteurisierung von Muttermilch mittels Mikrowelleneinwirkung, untersucht werden.

2.2 Untersuchungen zur Erregerinaktivierung in Kuhmilchproben durch Mikrowelleneinwirkung

2.2.1 Material und Methoden

Studiendesign

Milchproben wurden mit einer definierten Erregermenge kontaminiert und mit unterschiedlichen Einwirkungszeiten in einem Mikrowellengerät behandelt. Danach wurde die Abtötungskinetik der Erreger in den Milchproben ermittelt.

Milchproben

Die Studie wurde mit pasteurisierter Kuhvollmilch (Tetra Pak™) durchgeführt (im Folgenden als „Vollmilch“ bezeichnet), da diese mit einem Fettanteil von 3,5 % dem durchschnittlichen Fettanteil in Muttermilch von 3-5 % am ähnlichsten ist (Jenness 1979).

Kontrollierte Kontamination der Milchproben

Die Milchproben wurden in vier Versuchsreihen mit folgenden vier verschiedenen Erregern kontaminiert:

- *S. aureus* ATCC 6538
- *E. coli* ATCC 35218
- *E. faecium* ATCC 6057
- *E. cloacae* [Kinderklinikstamm; 1337/2; 04.08.2008; KNEO; Haare, Johanna-Charlotte, Rachenabstrich (Nabelabstrich)]

Für den Ansatz einer Testorganismensuspension wurden jeweils 30 ml CSL-Bouillon als Nährlösung mit einer Impföse einer Subkultur des jeweiligen Erregers beimpft. Diese Nährlösung wurde über 24 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden pro Versuchsreihe 500 ml Vollmilch mit 30 ml der Testorganismensuspension versetzt und gut durchgemischt. Aus diesem Ansatz wurden 10 Milchproben zu je 50 ml zur weiteren Prozessierung gewonnen. Aus den verbleibenden 30 ml wurde jeweils eine Probe zur Feststellung der Ausgangskoloniezahl entnommen. Diese Probe wurde in einer Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10^{-6} verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl aus den Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} direkt auf Agarplatten gebracht und ausgespatelt. Für *S. aureus*, *E. coli* und *E. cloacae* wurde CSA-Agar, für *E. faecium* KAA-Agar verwendet. Die Platten wurden zur Bestimmung der Ausgangskoloniezahl für 48 h bei 37 °C inkubiert. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h wurden die auf den Platten gewachsenen Kolonien ausgezählt und daraus die Ausgangskoloniezahl in KbE/ml bestimmt. Um eine Primärkontamination der Milch auszuschließen, wurde jeweils eine Probe auf das Vorhandensein des Prüforganismus untersucht.

Es wurden folgende Nährmedien verwendet:

CSA - Caso Agar (Firma: Carl Roth GmbH + Co KG)

Ph. Eur. f. d. Mikrobiologie, Caso Agar Agarmedium B, Art.-Nr.: X93.1

Zusammensetzung (g/l): Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat) 15,0

Pepton aus Soja (Papainhydrolysat) 5,0

Natriumchlorid 5,0

Agar 5,0

pH 7,3 ± 0,2

40 g Trockenmedium in 1 l Aqua dest. autoklavieren

CSL-Bacto™ (Firma: BD)

Tryptische Soja Nährbouillon/Sojabohnen-Casein-Abbau-Nährboden

Zusammensetzung (g/l): pankreatisch abgebautes Casein 17,0
enzymatisch abgebautes Sojamehl 3,0
Dextrose 2,5
Natriumchlorid 5,0
Dikaliumphosphat 2,5
pH: 7,3 ± 0,2

30 g Pulver in 1 l Aqua dest. auflösen, bis zum Lösen leicht erwärmen,
autoklavieren (15 min bei 121 °C)

KAA - Kanamycin aesculin azide agar base (Firma: Oxoid)

CM: 0591

Zusammensetzung (g/l): Tryptone 20,0
Yeast extract 5,0
Natriumchlorid 0,5
Natriumcitrat 1,0
Aesculin 1,0
Ferric ammonium citrate 0,5
Sodium azide 0,15
Agar 10,0
pH 7,0 ± 0,2 bei 25 °C

21,3 g in 500 ml Aqua dest.

1 Röhrchen Kanamycin-Selektiv-Supplement aseptisch in 2 ml Aqua dest.
lösen, gelösten Inhalt zu 500 ml Nährbodenbasis geben, bis zum vollständigen
Lösen erhitzen, autoklavieren für 15 min bei 121 °C

*Behandlung der Milchproben im Mikrowellengerät „Discover“ und Berechnung
der Effektivität des Verfahrens*

Zur Pasteurisierung der Milchproben wurde ein Mikrowellengerät der Firma
CEM, Modell Discover (CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland), verwendet.
Dieses Gerät erlaubt es, verschiedene Parameter einzustellen. Es wurden die
Zieltemperatur mit 85 °C, die Zeitrampe bis zum Erreichen der Temperatur mit

2:45 min, der Energieeintrag mit 100 Watt und die Haltezeit der Temperatur mit 5 min gewählt. Da die Pasteurisierung in einem offenen System erfolgte, konnte kein Druck aufgebaut werden.

Während der Behandlung mit Mikrowelleneinwirkung wurden die Proben mithilfe eines sterilen Magnetrührstabs gerührt, um eine gleichmäßige Verteilung der Temperatur zu erreichen. Von außen wurde das System mit Druckluft gekühlt, um ein zu starkes oder sprunghaftes Ansteigen der Temperatur zu vermeiden. Am Ende der Behandlung wurde jede Probe noch für weitere 5 min unter Rühren mit Druckluft auf eine Temperatur $< 55\text{ °C}$ abgekühlt.

Da die Temperaturmessung im Gerät mittels eingebautem Infrarotsensor nur von außerhalb des Probengefäßes erfolgte, sind geringe Abweichungen der gemessenen von der tatsächlichen Temperatur um wenige °C möglich.

Auch während der Behandlung der Proben ließ sich eine Temperaturschwankung von $\pm 5\text{ °C}$ aus technischen Gründen nicht völlig ausschließen.

Nach Abschluss der Behandlung einer Probe wurden aus dem Probengefäß $100\ \mu\text{l}$ entnommen, auf eine Agar-Platte aufgebracht und ausgespatelt. Weiterhin wurde eine Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10^{-2} angelegt. Auch aus diesen beiden Verdünnungsstufen wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ auf Agar-Platten aufgebracht und ausgespatelt, so dass letztlich für jede Probe 3 Agarplatten in 3 verschiedenen Verdünnungsstufen zur Verfügung standen. Diese wurden ebenfalls für 48 h bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien nach 24 h und nach 48 h ausgezählt.

Pro Versuchsreihe (also pro verwendetem Mikroorganismus) wurden 45 Versuche durchgeführt. Als Differenz zwischen Ausgangskoloniezahl und Erregerbelastung nach der Mikrowellenbehandlung wurde eine Reduktion um mindestens 5 log-Stufen angestrebt. Der Reduktionsfaktor RF wurde wie folgt berechnet:

$$\text{RF} = \log_{\text{Ausgangswert}} - \log_{\text{Endwert}}$$

2.2.2 Ergebnisse

Insgesamt wurden 180 Versuche durchgeführt. Differenziert nach den vier verwendeten Testorganismen wurden die in den Tabellen 1 bis 4 (siehe Anhang) dargestellten Ergebnisse ermittelt.

In der Versuchsreihe mit *S. aureus* wurde der Reduktionsfaktor von ≥ 5 log-Stufen in 37 von 45 Fällen erreicht. In den verbleibenden 8 Fällen betrug der RF 4 log-Stufen (Tab. 2-5).

Tab. 2: Versuchsansatz 1 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Staphylococcus aureus*, Ausgangskoloniezahl $4,3 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
1	$1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
2	$9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
3	$1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
4	$2,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
5	$2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
6	$1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
7	$8,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
8	$3,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
9	$1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
10	$7,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	4

Tab. 3: Versuchsansatz 2 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Staphylococcus aureus*, Ausgangskoloniezahl $4,2 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
11	$1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
12	$5,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
13	$3,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
14	$1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
15	$1,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	5

Tab. 4: Versuchsansatz 3 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Staphylococcus aureus*, Ausgangskoloniezahl $6,5 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
16	$1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
17	$1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
18	$2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
19	$5,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
20	$3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
21	$7,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
22	$9,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
23	$2,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
24	$1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
25	$2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
26	$1,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
27	$4,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
28	$1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
29	$2,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
30	$2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5

Tab. 5: Versuchsansatz 4 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Staphylococcus aureus*, Ausgangskoloniezahl $6,1 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
31	$8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
32	$7,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
33	$3,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
34	$3,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
35	$1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
36	$1,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
37	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
38	$3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
39	$2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
40	$1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
41	$1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
42	$2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
43	$4,6 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
44	$9,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
45	$8,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	4

Bei den 45 Proben mit dem Testorganismus *E. coli* wurde in 27 Fällen ein RF von 7 log-Stufen erreicht. In 8 Fällen betrug der RF 6 log-Stufen, in 7 Fällen 5 log-Stufen und in einem Fall 4 log-Stufen. Es gab zwei Proben, bei denen nur in der Verdünnungsstufe 10^{-2} jeweils eine Kolonie gezählt wurde (Tab. 6-8).

Tab. 6: Versuchsansatz 5 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Escherichia coli*, Ausgangskoloniezahl $6,4 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
1	0	7
2	0	7
3	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
4	0	7
5	0	7
6	$2,54 \cdot 10^3$ KBE/ml	4
7	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
8	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
9	0	7
10	$1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
11	0	7
12	$1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
13	$1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
14	$4,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
15	0	7

Tab. 7: Versuchsansatz 6 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Escherichia coli*, Ausgangskoloniezahl $5,9 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
16	$1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
17	$1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
18	0	7
19	$3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
20	0	7
21	0	7
22	$2,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
23	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
24	0	7
25	0	7
26	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
27	0	7
28	0	7
29	0	7
30	0	7

Tab. 8: Versuchsansatz 7 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Escherichia coli*, Ausgangskoloniezahl $4,4 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
31	0	7
32	0	7
33	0	7
34	0	7
35	0	7
36	0	7
37	0	7
38	0	7
39	0	7
40	0	7
41	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
42	0	7
43	0	7
44	0	7
45	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6

Die Versuchsreihe mit dem Testorganismus *E. faecium* ergab folgende Resultate: In einer von 45 Proben wurde ein RF von 7 log-Stufen, in 4 Proben ein RF von 6 log-Stufen, in 24 Proben ein RF von 5 log-Stufen und in 16 Proben ein RF von 4 log-Stufen erreicht. 6 Proben zeigten sich in den verschiedenen Verdünnungsstufen inhomogen. Für diese Proben wurde die Platte mit der geringsten Verdünnungsstufe ausgewertet (Tab. 9-11).

Tab. 9: Versuchsansatz 8 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterococcus faecium*, Ausgangskoloniezahl $3,8 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
1	$6,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
2	$3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
3	$9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
4	$2,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
5	$1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
6	$7,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
7	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
8	$1,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
9	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
10	$5,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
11	$3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
12	$7,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
13	$7,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
14	$1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
15	$3,6 \cdot 10^2$ KBE/ml	5

Tab. 10: Versuchsansatz 9 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterococcus faecium*, Ausgangskoloniezahl $3,4 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
16	$2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
17	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
18	$7,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
19	$1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
20	$3,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
21	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
22	$4,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
23	$9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
24	$6,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
25	$2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
26	$4,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
27	$4,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
28	$7,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
29	$8,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
30	$1,12 \cdot 10^3$ KBE/ml	4

Tab. 11: Versuchsansatz 10 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterococcus faecium*, Ausgangskoloniezahl $2,8 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
31	0	7
32	$3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
33	$8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
34	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
35	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
36	$4,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
37	$2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
38	$9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5
39	$4,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
40	$1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
41	$4,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
42	$2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
43	$2,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
44	$4,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4
45	$6,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	4

Die Versuchsreihe mit *E. cloacae* zeigte in 33 von 45 Proben einen RF von 7 log-Stufen, in 9 Proben einen RF von 6 log-Stufen und in 3 Proben einen RF von 5 log-Stufen (Tab. 12-14).

Tab. 12: Versuchsansatz 11 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterobacter cloacae*, Ausgangskoloniezahl $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
1	0	7
2	0	7
3	0	7
4	$4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
5	0	7
6	0	7
7	$1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
8	0	7
9	0	7
10	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
11	0	7
12	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
13	0	7
14	$2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
15	0	7

Tab. 13: Versuchsansatz 12 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterobacter cloacae*, Ausgangskoloniezahl $6,2 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
16	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
17	0	7
18	0	7
19	$3,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	5
20	0	7
21	0	7
22	0	7
23	0	7
24	$3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
25	0	7
26	0	7
27	0	7
28	$3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
29	0	7
30	0	7

Tab. 14: Versuchsansatz 13 - Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterobacter cloacae*, Ausgangskoloniezahl $8,6 \cdot 10^7$ KBE/ml

Probe	KbE/ml	RF
31	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
32	$1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6
33	0	7
34	0	7
35	0	7
36	0	7
37	0	7
38	0	7
39	0	7
40	0	7
41	0	7
42	0	7
43	0	7
44	0	7
45	$1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	5

2.2.3 Diskussion

Um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde nicht mit Muttermilch experimentiert. Bei Muttermilch als „Naturprodukt“ kann eine Kontamination der Milch durch Infektion der Mutter bzw. durch unsterile Abpumpbedingungen nicht ausgeschlossen werden. Pasteurisierte Kuhvollmilch aus dem Tetra Pak™ bietet den Vorteil einer weitestgehend standardisierten Zusammensetzung und Erregerfreiheit, so dass die Ergebnisse reproduzierbar sind.

Die Mikroorganismen wurden aus folgenden Gründen ausgewählt: *S. aureus* und *E. coli* sind die in Zusammenhang mit Pasteurisierungsstudien am häufigsten erwähnten Erreger und zugleich relevante Mikroorganismen, die in Zusammenhang mit Infektionsrisiken durch Muttermilch genannt werden (Chantry et al. 2011, Cossey et al. 2011, Israel-Ballard et al. 2006, Silvestre et al. 2008, Van Gysel et al. 2012). *E. faecium* ist von den Erregern, die in der Auswertung des Wochenscreenings gefunden wurden, einer der thermostabilsten Organismen. In der Universitätsmedizin Greifswald wird *E. faecium* üblicherweise als Testorganismus genutzt, um stichprobenartig die Effektivität des hauseigenen Pasteurisators zu überprüfen. Es musste also in dieser Studie derselbe Erreger verwendet werden, um eine Vergleichbarkeit beider Pasteurisierungsmethoden zu ermöglichen. Mit *E. cloacae* wurde bewusst ein Erreger ausgewählt, der direkt bei einem Patienten in der Kinderklinik der Universitätsmedizin Greifswald nachgewiesen wurde.

Die Versuchsreihe mit *Staphylococcus aureus* zeigte in 8 von 45 Fällen (17,8 %) eine nicht ausreichende Reduktion.

Nur in einem von 45 Fällen (2,2 %) wurde in der Versuchsreihe mit *Escherichia coli* das angestrebte Ziel der Reduktion nicht erreicht. In zwei weiteren Fällen gab es zwar bei der höchsten Verdünnungsstufe ein Erregerwachstum von jeweils 1 KbE/ml auf den Testplatten. Da aber in den zugehörigen kleineren Verdünnungsstufen kein Wachstum beobachtet wurde, kann es sich dabei wohl nur um einen Fehler z.B. durch Kontamination handeln. Außerdem wurde bei dieser Versuchsreihe in 27 von 45 Proben (60 %) eine komplette Reduktion

beobachtet, d.h. nach der Behandlung war kein Wachstum auf den Testplatten mehr feststellbar. Geht man in den beiden oben genannten Fällen tatsächlich von einer Kontamination nach der Mikrowellenbehandlung aus, wäre sogar in 29 von 45 Fällen (64,4 %) eine komplette Reduktion erreicht.

Wie zu erwarten war, zeigte sich bei der Versuchsreihe mit Enterococcus faecium die höchste Versagerquote, d.h. es wurde in 16 von 45 Proben (35,6 %) die angestrebte Reduktion nicht erreicht. Doch gerade aufgrund der bekannten Hitzestabilität von *E. faecium* wurde dieser Erreger ausgewählt, um die Sicherheit des Verfahrens zu testen. Zwar ist die Versagerquote von 35,6 % kein ausreichend gutes Ergebnis. Vergleicht man diese Zahl allerdings mit der Versagerquote, die im Testzeitraum im vorhandenen Pasteurisateur mit demselben Erreger ermittelt wurde (48,8 %), liegt das mittels Mikrowelle erzielte Ergebnis trotzdem noch deutlich darunter.

Das beste Ergebnis lieferte die Versuchsreihe mit Enterobacter cloacae, da in allen der 45 Proben die angestrebte Reduktion ≥ 5 log erreicht wurde. Dabei konnte in 34 Fällen (75,6 %) eine komplette Reduktion erzielt werden.

3 Schlussfolgerung und weiterführende Gedanken

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die oben beschriebene Mikrowellen-Methode zur Pasteurisierung von Milch der verbreiteten Methode der Holder-Pasteurisierung bei der Reduktion relevanter Mikroorganismen ebenbürtig oder ggf. sogar überlegen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Erregerinaktivierung unter den gewählten Parametern besser funktioniert. Das Studiendesign erlaubt es jedoch nicht, aus den gewonnenen Ergebnissen eine Überlegenheit der Mikrowellen-Methode abzuleiten, da Bedenken bestehen, dass Muttermilch und deren Bestandteile durch Mikrowelleneinwirkung ggf. nachteilig verändert werden könnten.

Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass das Verfahren der Pasteurisierung in der Mikrowelle mit dem Gerät „Discover“ unter den genannten Bedingungen bei den geprüften Erregern, im Vergleich mit dem momentan angewendeten Verfahren der Holder Pasteurisierung, bessere Ergebnisse erbrachte. Ein weiterer Vorteil ist die Zeitersparnis, da die einzelne Probe inklusive Aufwärm- und Abkühlphase nur 12 min und 45 s im Gerät behandelt werden muss. Das lässt vermuten, dass die Milch zugleich schonender behandelt wird.

Bevor allerdings an eine praktische Anwendung der Mikrowellen-Methode zur Pasteurisierung erfolgen kann, sind weitere Sachverhalte zu klären. Zum Beispiel muss vorher auf jeden Fall überprüft werden, ob das angegebene Verfahren auch bei Viren wie CMV, HIV oder HTLV zu einer ausreichenden Erregerinaktivierung führt. Ferner muss in weiteren Studien abgeklärt werden, ob und inwieweit andere Bestandteile der Muttermilch, wie z.B. die enthaltenen Immunfaktoren, durch die Mikrowelleneinwirkung verändert oder zerstört werden, da sich dies nachteilig auf die Entwicklung des Säuglings auswirken könnte.

Außerdem müsste, wenn auch nach Abschluss dieser oben genannten Untersuchungen keine Bedenken gegen eine Anwendung in der Milchküche bestehen, von Seiten der Industrie ein Gerät entworfen und gebaut werden, das für den Routineeinsatz geeignet ist. Es müsste möglich sein, handelsübliche Babymilchflaschen in das Gerät zu stellen. Weiterhin ist es erforderlich, dass mehrere Flaschen gleichzeitig behandelt werden können (im Gerät „Discover“

kann jeweils nur eine Probe gleichzeitig bearbeitet werden), da sich sonst der Vorteil der Zeitersparnis durch die nacheinander notwendig werdende Bearbeitung verliert bzw. möglicherweise sogar ins Gegenteil verkehrt.

Das Verfahren der Firma Virex wurde veröffentlicht, nachdem die hier getestete Mikrowellen-Methode entwickelt wurde. Es ist unserer Methode zumindest im Punkt der Zeitersparnis überlegen und damit bei Anwendung ggf. noch schonender für Muttermilch. Ob und inwieweit allerdings eine ausreichende Inaktivierung bakterieller Pathogene bei dem geringeren Temperatureintrag über eine kürzere Zeitspanne möglich ist, ist bisher nicht publiziert. Auch für dieses Verfahren gilt, dass für einen praktikablen Einsatz im Klinikalltag ein Gerät entwickelt werden müsste, in dem mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet werden können.

Da durch die Mikrowellenbehandlung eine gute Erregerreduktion erreicht werden kann, wäre ein Einsatz dieser Methode auch in anderen Bereichen vorstellbar. Davon profitieren könnten z.B. die Lebensmittelbranche oder onkologische Stationen, auf denen für Patienten nach Stammzelltransplantation unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls eine Ernährung mit erregerreduzierter Kost oder in Abhängigkeit von der Risikogruppe des Patienten sogar sterilisierter (meist autoklavierter) Kost angestrebt wird (KRINKO-Richtlinie 2010). Ggf. könnte durch den Einsatz des Mikrowellenverfahrens eine keimreduzierte Kost für diese Patienten hergestellt werden bei möglicherweise besserem Erhalt der gustatorischen Qualität der Nahrung. Gerade bei autoklavierten Nahrungsmitteln sei diese sehr schlecht, was wiederum zu schlechter Patientencompliance führt (KRINKO-Richtlinie 2010). Das setzt jedoch voraus, dass die Unbedenklichkeit der Mikrowellenbehandlung auf Nahrungsbestandteile zweifelsfrei nachgewiesen wird.

4 Zusammenfassung

Muttermilch ist die optimale Nahrung für Neu- und Frühgeborene. Unter bestimmten Voraussetzungen ist es nötig, für Säuglinge abgepumpte Muttermilch zu pasteurisieren.

In der vorliegenden Arbeit werden in Form einer Literaturlauswertung verschiedene Verfahren der Pasteurisierung von Muttermilch auf ihre Eignung verglichen.

Die eigenen Untersuchungen umfassen die Ermittlung eines Erregerspektrums, wie es in Muttermilchproben in der Universitätsmedizin Greifswald nachgewiesen wurde, und die Auswertung der Routine-Kontrollen des hauseigenen Pasteurisors. Mit dieser Zielsetzung sollte die Eignung eines speziellen Mikrowellengerätes zur Pasteurisierung untersucht werden. Im Unterschied zu im Haushalt benutzten Mikrowellengeräten erzeugt es ein homogenes Mikrowellenfeld, ermöglicht eine Durchmischung der Milchprobe während des Erhitzungsvorgangs mittels Magnetrührstab und genaue Einstellmöglichkeiten der gewählten Parameter sowie die Kühlung per Druckluft und die Temperaturmessung während der Behandlung mittels eingebautem Infrarotsensor.

Mit diesem Gerät wurde artifiziell kontaminierte Kuhmilch behandelt und untersucht, ob eine Erregerinaktivierung um mindestens 5 log-Stufen erreicht werden kann. Als Testorganismen wurden *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium* und *E. cloacae* eingesetzt. Es konnte mit dem Mikrowellengerät und den gewählten Parametern eine bessere Erregerinaktivierung in kürzerer Behandlungsdauer erreicht werden als bei der zum Vergleich herangezogenen Holder-Pasteurisierung.

Vor einem routinemäßigen Einsatz müssen allerdings noch verschiedene Probleme gelöst werden. Es bleibt zu klären, inwieweit die sensiblen Inhaltsstoffe der Muttermilch durch Mikrowelleneinwirkung beeinträchtigt oder geschädigt werden. Dabei ist das besondere Augenmerk auf die nicht-thermischen Effekte der Strahlung zu legen. Sollten nach derartigen Untersuchungen keine Bedenken gegen dieses Verfahren bestehen, könnte von der Industrie ein Gerät entwickelt werden, mit dem mehrere Milchflaschen gleichzeitig behandelt werden können. Sollte das gelingen, stände ein neues Pasteurisierungsverfahren für Muttermilch und weitere Anwendungsgebiete zur Verfügung.

5 Summary

Breast milk is the optimal nourishment for mature and premature infants. Under certain conditions it is necessary to pasteurise expressed breast milk for newborns. In the present work, several pasteurisation methods of breast milk were compared for their suitability in the form of a literature review.

The investigations include the determination of the germ spectrum, as it was detected in breast milk samples at the University Medicine Greifswald. Furthermore, results were compared to routinely conducted control experiments using the in-house pasteuriser (Holder pasteurisation). With this objective, a microwave oven was investigated for its feasibility of pasteurisation. In contrast to household microwave ovens our device generated a homogeneous microwave field and also allowed the mixing of the milk sample during the heating process by a magnetic stir bar. Furthermore it offered precise adjustment of the selected parameters as well as a cooling option using compressed air. Additionally, it took temperature measurements by the built-in infrared sensor during the runs.

Bovine milk, spiked *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium* and *E. cloacae*, was treated with this device and analyzed for a reduction $\geq 5 \log \text{CFU ml}^{-1}$.

Compared to the Holder pasteurisation, the microwave oven (under the selected parameters) was more effective in inactivating pathogens at a shorter treatment time.

However, before a routine use, a number of safety as well as practicality issues need to be clarified. Further research into the effect of the microwave exposure on the sensitive components of breast milk should be conducted. Here, special attention should be paid to non-thermal effects of radiation. Should there be no side-effects detected, a device would need to be developed by industry, in which more than one milk bottles can be treated simultaneously. If it was successful, a new pasteurisation method for breast milk as well as other areas of application would become available.

6 Literaturverzeichnis

- Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, Conti A, Tonetto P, Biasini A, Coscia A, Fabris C, Moro GE, Cavallarin L, Bertino E. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:818-29.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. Unterschiede in der Zusammensetzung von Muttermilch und industriell hergestellter Säuglingsanfangs- und Folgenahrung und Auswirkungen auf die Gesundheit von Säuglingen. Stellungnahme der Nationalen Stillkommission vom 16.07.2012. Verfügbar auf: <http://www.bfr.bund.de/cm/343/unterschiede-in-der-zusammensetzung-von-muttermilch-und-industriell-hergestellter-saeuglingsanfangs-und-folgenahrung.pdf>. (Zugriff vom 04.08.2014).
- Capretti MG, Lanari M, Lazzarotto T et al. Very low birth weight infants born to cytomegalovirus-seropositive mothers fed with their mother's milk: a prospective study. *J Pediatr* 2009; 154: 842–8.
- Carbonare SB, Palmeira P, Silva ML, Carneiro-Sampaio MM. Effect of microwave radiation, pasteurization and lyophilization on the ability of human milk to inhibit *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1996;14(2):90-4.
- Chantry CJ, Wiedeman J, Buehring G, Peerson JM, Hayfron K, K'Aluoch O, Lonnerdal B, Israel-Ballard K, Coutsooudis A, Abrams B. Effect of flash-heat treatment on antimicrobial activity of breastmilk. *Breastfeed Med*. 2011;6(3):111-6.
- Cossey V, Jeurissen A, Thelissen MJ, Vanhole C, Schuermans A. Expressed breast milk on a neonatal unit: a hazard analysis and critical control points approach. *Am J Infect Control*. 2011;39(10):832-8.
- Doctor et al. 2005 S, Friedman S, Dunn M et al. Cytomegalovirus transmission to extremely low-birth weight infants through breast milk. *Acta Paediatr* 2005; 94: 53–8.
- Dvorak B, Halpem M, Holubec H et al. Maternal milk reduces severity of necrotizing enterocolitis and increases IL-10 in a neonatal rat model. *Pediatric Res* 2003; 53: 426–33.
- Dworsky M, Yow M, Stagno S et al. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 1983; 72 (3): 295–9.

- Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Heidelberg: Springer; 2009.
- Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M et al. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 2001; 357:513–8.
- Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M et al. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants by breastfeeding. In: Prösch S, Cinatl J Scholz M (eds) *Monographs in Virology, New Aspects of CMV-related Immunopathology*. Basel: Karger; 2003; 24: 43–52.
- Hayes K, Danks DM, Gibas H et al. Cytomegalovirus in human milk. *N Engl J Med* 1972; 287: 177–8.
- Holzapfel WH. *Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene*. 3. Aufl. Hamburg: Behr; 2004; 221-222.
- Hylander MA, Strobino DM, Dhanireddy R. Human milk feedings and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics*. 1998;102(3):E38.
- Israel-Ballard K, Chantry C, Dewey K, Lönnerdal B, Sheppard H, Donovan R, Carlson J, Sage A, Abrams B. Viral, nutritional, and bacterial safety of flash-heated and pretoria-pasteurized breast milk to prevent mother-to-child transmission of HIV in resource-poor countries: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 1;40(2):175-81.
- Israel-Ballard K, Coutsoydis A, Chantry CJ, Sturm AW, Karim F, Sibeko L, Abrams B. Bacterial safety of flash-heated and unheated expressed breastmilk during storage. *J Trop Pediatr*. 2006;52(6):399-405.
- Jeffery BS, Mercer KG. Pretoria pasteurisation: a potential method for the reduction of postnatal mother to child transmission of the human immunodeficiency virus. *J Trop Pediatr*. 2000;46:219-223.
- Jenness R. The composition of human milk. *Semin Perinatol*. 1979;3(3):225-39.
- Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut (RKI). Anforderungen an die Hygiene bei der medizinischen Versorgung von immunsupprimierten Patienten. („KRINKO-Richtlinie“) *Bundesgesundheitsbl* 2010; 53:357–388.
- Kramer A, Heckmann M, Beyersdorff A, Ryll S, Knoll M. Hygienische Anforderungen an Muttermilch und Frauenmilchspenden. *Umweltmed, Hyg, Arbeitsmed*. 2013;18(4):225-239.

- Kramer A, Ryll S. Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). Umgang und Gewinnung von Muttermilch. Standardarbeitsanweisung (SAA) der Universitätsmedizin Greifswald. 25.01.2011.
- Kumar ML, Nankervis GA, Cooper AR et al. Postnatally acquired cytomegalovirus infections in infants of CMV-excreting mothers. *J Pediatr* 1984; 104: 669–73.
- La Leche Liga International. What are the LLLI guidelines for storing my pumped milk? Verfügbar auf: <http://www.llli.org/faq/milkstorage.html>. (Zugriff vom 04.08.2014).
- Lawrence RA. Milk banking: the influence of storage procedures and subsequent processing on immunologic components of human milk. *Adv Nutr Res.* 2001;10:389-404.
- Maschmann J, Hamprecht K, Dietz K et al. Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1998–2003.
- Mayatepek E. Pädiatrie. München: Elsevier; 2007; 167-174.
- McPherson RJ, Wagner CL. The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 2 concentrations in human milk. *Adv Exp Med Biol.* 2001;501:559-66.
- National Institute for Health and Clinical Excellence. Donor breastmilk banks: the operation of donor breast milk bank services. London. Clinical guideline CG93. 2010. Verfügbar auf: <http://guidance.nice.org.uk/CG93>. (Zugriff vom 04.08.2014).
- Neuberger P, Hamprecht K, Vochem M et al. Case-control study of symptoms and neonatal outcome of human milk-transmitted cytomegalovirus infection in premature infants. *J Pediatr* 2006; 148: 326–43.
- Oddy WH. The impact of breastmilk on infant and child health. *Breastfeed Rev.* 2002;10(3):5-18.
- Ovesen L, Jakobsen J, Leth T, Reinholdt J. The effect of microwave heating on vitamins B1 and E, and linoleic and linolenic acids, and immunoglobulins in human milk. *Int J Food Sci Nutr.* 1996;47(5):427-36.
- Paryani SG, Yeager AS, Hosford-Dunn H et al. Sequelae of acquired cytomegalovirus infection in premature and sick term infants. *J Pediatr* 1985; 107: 451–6.

- Schanler RJ, Nutritional composition of human milk for full-term infants. 2012
Verfügbar auf UpToDate®. (Zugriff vom 04.08.2014).
- Sigman M, Burke KI, Swarner OW, Shavlik GW. Effects of microwaving human
milk: changes in IgA content and bacterial count. *J Am Diet Assoc.*
1989;89(5):690-2.
- Silvestre D, Ruiz P, Martínez-Costa C, Plaza A, López MC. Effect of
pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J Hum Lact.*
2008;24(4):371-6.
- Stagno S, Reynolds DW, Pass RF et al. Breast milk and the risk of
cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1980; 302: 1.073–6.
- Tacken KJ, Vogelsang A, van Lingen RA, Slootstra J, Dikkeschei BD, van
Zoeren-Grobbe D. Loss of triglycerides and carotenoids in human milk
after processing. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94(6):F447-50.
- Tully DB, Jones F, Tully MR. Donor milk: what's in it and what's not. *J Hum
Lact.* 2001;17(2):152-5.
- Van Gysel M, Cossey V, Fieuws S, Schuermans A. Impact of pasteurization on
the antibacterial properties of human milk. *Eur J Pediatr.*
2012;171(8):1231-7.
- Virex GmbH. HCMV-Inaktivierung in der Muttermilch. Verfügbar auf:
<http://virex.eu/4579.html> und <http://virex.eu/13701.html>. (Zugriff vom
04.08.2014).
- Vochem M, Hamprecht K, Jahn G et al. Transmission of cytomegalovirus to
preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 53–8.
- Vollmer B, Seibold-Weiger K, Schmitz-Salue C et al. Postnatally acquired
cytomegalovirus infection via breast milk: effects on hearing and
development in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 322–7.
- World Health Organization. Guidelines on optimal feeding of low birthweight
infants in low- and middle-income countries. WHO Library Cataloguing-in-
Publication Data. 2011; 3.

Anhang

Auf den folgenden Seiten werden die ausführlichen Ergebnistabellen zum Kapitel 2.2.2 dargestellt. Im Kapitel selbst ist eine kondensierte Form der wichtigsten Daten angegeben.

Tab. 1: Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Staphylococcus aureus*

Versuchstag 1: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 1-10)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
422 KBE/Platte $4,22 \cdot 10^7$ KBE/ml	428 KBE/Platte $4,28 \cdot 10^7$ KBE/ml	25 KBE/Platte $2,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	25 KBE/Platte $2,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
1	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
2	9 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	9 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
3	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	18 KBE/Platte $1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
4	22 KBE/Platte $2,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	22 KBE/Platte $2,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
5	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
6	16 KBE/Platte $1,6 \cdot 10^2$ KBE/ml	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
7	88 KBE/Platte $8,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	89 KBE/Platte $8,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
8	34 KBE/Platte $3,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	35 KBE/Platte $3,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
9	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
10	72 KBE/Platte $7,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	72 KBE/Platte $7,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Versuchstag 2: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 11-15)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
415 KBE/Platte $4,15 \cdot 10^7$ KBE/ml	415 KBE/Platte $4,15 \cdot 10^7$ KBE/ml	32 KBE/Platte $3,2 \cdot 10^7$ KBE/ml	32 KBE/Platte $3,2 \cdot 10^7$ KBE/ml	0	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
11	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
12	55 KBE/Platte $5,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	55 KBE/Platte $5,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
13	31 KBE/Platte $3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	32 KBE/Platte $3,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
14	19 KBE/Platte $1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	19 KBE/Platte $1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
15	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	15 KBE/Platte $1,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Versuchstag 3: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 16-30)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
646 KBE/Platte $6,46 \cdot 10^7$ KBE/ml	646 KBE/Platte $6,46 \cdot 10^7$ KBE/ml	65 KBE/Platte $6,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	65 KBE/Platte $6,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
16	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
17	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	18 KBE/Platte $1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
18	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
19	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
20	31 KBE/Platte $3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	31 KBE/Platte $3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
21	69 KBE/Platte $6,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	70 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
22	91 KBE/Platte $9,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	94 KBE/Platte $9,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
23	24 KBE/Platte $2,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	24 KBE/Platte $2,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
24	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
25	27 KBE/Platte $2,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
26	15 KBE/Platte $1,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	15 KBE/Platte $1,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
27	42 KBE/Platte $4,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	42 KBE/Platte $4,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
28	9 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	10 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
29	24 KBE/Platte $2,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	25 KBE/Platte $2,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
30	20 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0

Versuchstag 4: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 31-45)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
611 KBE/Platte $6,11 \cdot 10^7$ KBE/ml	613 KBE/Platte $6,13 \cdot 10^7$ KBE/ml	75 KBE/Platte $7,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	76 KBE/Platte $7,6 \cdot 10^7$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
31	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
32	73 KBE/Platte $7,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	73 KBE/Platte $7,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	18 KBE/Platte $1,8 \cdot 10^3$ KBE/ml	20 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	0	0
33	39 KBE/Platte $3,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	39 KBE/Platte $3,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
34	35 KBE/Platte $3,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	35 KBE/Platte $3,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
35	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
36	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	13 KBE/Platte $1,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
37	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
38	31 KBE/Platte $3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	31 KBE/Platte $3,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
39	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
40	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
41	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
42	28 KBE/Platte $2,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
43	43 KBE/Platte $4,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	46 KBE/Platte $4,6 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
44	83 KBE/Platte $8,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	90 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml
45	80 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	88 KBE/Platte $8,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Tab. 2: Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Escherichia coli*

Versuchstag 1: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 1-15)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
635 KBE/Platte $6,35 \cdot 10^7$ KBE/ml	639 KBE/Platte $6,39 \cdot 10^7$ KBE/ml	69 KBE/Platte $6,9 \cdot 10^7$ KBE/ml	70 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	252 KBE/Platte $2,52 \cdot 10^3$ KBE/ml	254 KBE/Platte $2,54 \cdot 10^3$ KBE/ml	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^3$ KBE/ml	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^3$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^3$ KBE/ml
7	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
8	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	18 KBE/Platte $1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
11	0	0	0	0	0	0
12	19 KBE/Platte $1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	19 KBE/Platte $1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
13	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
14	47 KBE/Platte $4,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	48 KBE/Platte $4,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
15	0	0	0	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml

Versuchstag 2: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 16-30)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
584 KBE/Platte $5,84 \cdot 10^7$ KBE/ml	585 KBE/Platte $5,85 \cdot 10^7$ KBE/ml	59 KBE/Platte $5,9 \cdot 10^7$ KBE/ml	59 KBE/Platte $5,9 \cdot 10^7$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^8$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^8$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
16	15 KBE/Platte $1,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
17	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	22 KBE/Platte $2,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	22 KBE/Platte $2,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
23	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml

Versuchstag 3: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 31-45)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
431 KBE/Platte $4,31 \cdot 10^7$ KBE/ml	436 KBE/Platte $4,36 \cdot 10^7$ KBE/ml	53 KBE/Platte $5,3 \cdot 10^7$ KBE/ml	56 KBE/Platte $5,6 \cdot 10^7$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0
41	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
45	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0

Tab. 3: Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterococcus faecium*

Versuchstag 1: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 1-15)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
376 KBE/Platte $3,76 \cdot 10^7$ KBE/ml	376 KBE/Platte $3,76 \cdot 10^7$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^7$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^7$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
1	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
2	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
3	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	9 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
4	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	23 KBE/Platte $2,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
5	17 KBE/Platte $1,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	18 KBE/Platte $1,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
6	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
7	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
8	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	13 KBE/Platte $1,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
9	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
10	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
11	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
12	72 KBE/Platte $7,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	74 KBE/Platte $7,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
13	69 KBE/Platte $6,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	71 KBE/Platte $7,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
14	9 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0	0	0
15	35 KBE/Platte $3,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	36 KBE/Platte $3,6 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Versuchstag 2: Ausgangs-Koloniezahl (Proben 16-30)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
344 KBE/Platte $3,44 \cdot 10^7$ KBE/ml	344 KBE/Platte $3,44 \cdot 10^7$ KBE/ml	47 KBE/Platte $4,7 \cdot 10^7$ KBE/ml	47 KBE/Platte $4,7 \cdot 10^7$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	5 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
16	19 KBE/Platte $1,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	21 KBE/Platte $2,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
17	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
18	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
19	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
20	37 KBE/Platte $3,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	39 KBE/Platte $3,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
21	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
22	39 KBE/Platte $3,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	42 KBE/Platte $4,2 \cdot 10^2$ KBE/ml	10 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	10 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	0	0
23	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	9 KBE/Platte $9,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
24	56 KBE/Platte $5,6 \cdot 10^2$ KBE/ml	60 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
25	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	29 KBE/Platte $2,9 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
26	47 KBE/Platte $4,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	47 KBE/Platte $4,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^3$ KBE/ml

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
27	41 KBE/Platte $4,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	43 KBE/Platte $4,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
28	75 KBE/Platte $7,5 \cdot 10^2$ KBE/ml	78 KBE/Platte $7,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^3$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^3$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml
29	84 KBE/Platte $8,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	84 KBE/Platte $8,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^3$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^3$ KBE/ml	0	0
30	109 KBE/Platte $1,09 \cdot 10^3$ KBE/ml	112 KBE/Platte $1,12 \cdot 10^3$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^3$ KBE/ml	12 KBE/Platte $1,2 \cdot 10^3$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^3$ KBE/ml

Versuchstag 3: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 31-45)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
279 KBE/Platte $2,79 \cdot 10^7$ KBE/ml	281 KBE/Platte $2,81 \cdot 10^7$ KBE/ml	25 KBE/Platte $2,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	25 KBE/Platte $2,5 \cdot 10^7$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
31	0	0	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
32	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
33	6 KBE/Platte $6,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
34	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
35	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10 ⁻¹		0,1 ml von Verdünnung 10 ⁻²	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
36	45 KBE/Platte 4,5 · 10 ² KBE/ml	47 KBE/Platte 4,7 · 10 ² KBE/ml	3 KBE/Platte 3,0 · 10 ² KBE/ml	3 KBE/Platte 3,0 · 10 ² KBE/ml	0	0
37	19 KBE/Platte 1,9 · 10 ² KBE/ml	21 KBE/Platte 2,1 · 10 ² KBE/ml	0	0	0	0
38	8 KBE/Platte 8,0 · 10 ¹ KBE/ml	9 KBE/Platte 9,0 · 10 ¹ KBE/ml	0	0	0	0
39	41 KBE/Platte 4,1 · 10 ² KBE/ml	44 KBE/Platte 4,4 · 10 ² KBE/ml	4 KBE/Platte 4,0 · 10 ² KBE/ml	4 KBE/Platte 4,0 · 10 ² KBE/ml	0	0
40	7 KBE/Platte 7,0 · 10 ¹ KBE/ml	10 KBE/Platte 1,0 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ² KBE/ml	0	0
41	44 KBE/Platte 4,4 · 10 ² KBE/ml	48 KBE/Platte 4,8 · 10 ² KBE/ml	10 KBE/Platte 1,0 · 10 ³ KBE/ml	11 KBE/Platte 1,1 · 10 ³ KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ³ KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ³ KBE/ml
42	29 KBE/Platte 2,9 · 10 ² KBE/ml	29 KBE/Platte 2,9 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ³ KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ³ KBE/ml
43	27 KBE/Platte 2,7 · 10 ² KBE/ml	28 KBE/Platte 2,8 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ² KBE/ml	2 KBE/Platte 2,0 · 10 ² KBE/ml	0	0
44	39 KBE/Platte 3,9 · 10 ² KBE/ml	44 KBE/Platte 4,4 · 10 ² KBE/ml	1 KBE/Platte 1,0 · 10 ² KBE/ml	1 KBE/Platte 1,0 · 10 ² KBE/ml	0	0
45	63 KBE/Platte 6,3 · 10 ² KBE/ml	69 KBE/Platte 6,9 · 10 ² KBE/ml	4 KBE/Platte 4,0 · 10 ² KBE/ml	4 KBE/Platte 4,0 · 10 ² KBE/ml	0	0

Tab. 4: Wirksamkeit der Mikrowellenbehandlung gegen *Enterobacter cloacae*

Versuchstag 1: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 1-15)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
500 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	500 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	50 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	50 KBE/Platte $5,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	4 KBE/Platte $4,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	13 KBE/Platte $1,3 \cdot 10^2$ KBE/ml	14 KBE/Platte $1,4 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
11	0	0	0	0	0	0
12	0	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0

Versuchstag 2: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Proben 16-30)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
620 KBE/Platte $6,2 \cdot 10^7$ KBE/ml	620 KBE/Platte $6,2 \cdot 10^7$ KBE/ml	56 KBE/Platte $5,6 \cdot 10^7$ KBE/ml	56 KBE/Platte $5,6 \cdot 10^7$ KBE/ml	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	8 KBE/Platte $8,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
16	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	37 KBE/Platte $3,7 \cdot 10^2$ KBE/ml	38 KBE/Platte $3,8 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	2 KBE/Platte $2,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
28	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	3 KBE/Platte $3,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0

Versuchstag 3: Ausgangs-Koloniezahl vor Mikrowellenbehandlung (Probe 31-45)

0,1 ml von Verdünnung 10^{-4}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-5}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-6}	
nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
843 KBE/Platte $8,43 \cdot 10^7$ KBE/ml	864 KBE/Platte $8,64 \cdot 10^7$ KBE/ml	81 KBE/Platte $8,1 \cdot 10^7$ KBE/ml	81 KBE/Platte $8,1 \cdot 10^7$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml	7 KBE/Platte $7,0 \cdot 10^7$ KBE/ml

Proben nach Mikrowellenbehandlung

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
31	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
32	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^1$ KBE/ml	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0

Probe	0,1 ml der Ausgangslösung		0,1 ml von Verdünnung 10^{-1}		0,1 ml von Verdünnung 10^{-2}	
	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 24 h	nach 48 h
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
45	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	11 KBE/Platte $1,1 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	1 KBE/Platte $1,0 \cdot 10^2$ KBE/ml	0	0

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 02.09.2014