

Wirksamkeitsprüfung Stalleinstreumittel

Datum: 06.02.2005

An: Auftraggeber : GF Herr Justesen, DZS Agrar Handels GmbH

CC: Frau Dr. Kassau, Herr Prah

Von: MQD MV mbH, Dr. habil. Block

AW: **Ergebnisbericht**

I. Aufgabenstellung:

Im Laborversuch sollte eine vergleichende Wirksamkeitsprüfung von fünf auf dem Markt befindlichen Stalleinstreumitteln vorgenommen werden. Dabei handelte es sich um folgende Produkte:

1. Stalosan F (pH-Wert: 3,66, Acidität: 173 mval NaOH/100 g)
2. Desinfloor (pH-Wert: 8,91, Alkalität: 8,5 mval H₂SO₄/100 g)
3. **Staldren (pH-Wert: 8,77, Alkalität: 12,6 mval H₂SO₄/100 g)**
4. Mistral (pH-Wert: 9,06, Alkalität: 23,9 mval H₂SO₄/100 g)
5. Superphosphat (pH-Wert: 3,23, Acidität: 239 mval NaOH/100 g)

Als Kontrolle wurde jeweils steriles destilliertes Wasser verwendet (Variante 0).

II. Versuchsanlage:

Für die Vergleichsuntersuchungen wurden folgende Teststämme (Bakteriensuspensionen) eingesetzt:

- A) Staph. aureus , DSM 2569 (ATCC 29213) (47)
- B) E. coli , DSM 1103 (ATCC 25922) (36)

In der **1.Versuchsserie** wurden auf CASO-Blutagarplatten jeweils 100 µl der Bakterien-suspensionen von A) und B) ausgespatelt und dann auf den Platten kreisrunde Filterpapierplättchen aufgelegt, die mit Wirkstofflösungen der Mittel 1 – 5 getränkt waren.

Es wurden folgende Stoffkonzentrationen geprüft: 0,5 %, 2 %, 5 %, 10 % in dest. Wasser.

Die Plättchen blieben a) 20 Minuten und b) dauerhaft auf den Platten. Als Nullprobe wurde steriles dest. Wasser verwendet. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C.

In der **2.Versuchsserie** wurden die zu prüfenden Produkte nach Ausspatelung der beiden Teststammuspensionen direkt auf die CASO-Blutagarplatten aufgebracht und leicht angedrückt (ca. 10 mm kreisrunde Auflage); die Bebrütung erfolgte wieder bei 37 °C.

Zur Prüfung des Blut-Effektes wurde diese Serie mit Müller/Hinton.Agar ohne Blut wiederholt.

In der **3.Versuchsserie** wurde die Versuchsanlage dahingehend geändert, dass zunächst jeweils 0,5 g der zu prüfenden Produkte 1-5 mit 2,0 ml Keimsuspension A) bzw. B) im sterilen Reagenzglas vermischt und dann bei Raumtemperatur stehend nach 20 Minuten, vier bzw. 24 Stunden beprobt wurden. Dazu wurden jeweils 100 µl der überstehenden Keimsuspension abgenommen und nach dem Spatelverfahren auf CASO-Blutagarplatten aufgebracht.

Wenn nach vier Stunden kein Keimwachstum mehr feststellbar war, wurde die 24 h-Variante nicht mehr ausgewertet. In dieser 3.Serie wurden als Positivkontrollen 6.) 500 µl Sterilium , 7.) 50 µl Sterilium sowie 8.) 10 µl Ameisensäure mit jeweils 2,0 ml Keimsuspension A) bzw. B) vermischt und ebenso nach 20 min, vier bzw. 24 Stunden beprobt. Als Kontrolle wurde 2,0 ml Keimsuspension ohne Zusatz mitgeführt.

III. Ergebnisse:

In der 1.Versuchsserie wurden unabhängig vom verwendeten Mittel und von der Mittelkonzentration nach 24 h keine Hemmwirkungen auf die beiden geprüften Testkeime gefunden. In allen Fällen waren die Keime direkt bis an die getränkten Filterpapierplättchen herangewachsen.

In der 2.Versuchsserie zeigten sich nach 24 h Bebrütung bei 37 °C bei den Einstreumitteln 2, und 4 (Desinfloor, Mistral) keinerlei Hemmwirkungen, d.h. die Testkeime A und B waren auch hier bis direkt an die Mittelhäufchen herangewachsen. Bei den Produkten 1 (Stalosan F) 3 (Staldren) und 5 (Superphosphat) wurden ca. 1 mm breite Hemmhöfe beobachtet, bis 8 mm Entfernung vom Produkt wiesen die Kolonien eine helle Verfärbung auf. Sie waren aber nach dem Überimpfen auf eine frische CASO-Blutagarplatte unbeeinträchtigt lebensfähig.

Bei der Wiederholung dieser Serie mit Müller/Hinton-Agar ohne Blut ergaben sich identische Ergebnisse.

Die Ergebnisse der 3.Versuchsserie sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

A) Teststamm Staph. aureus

Behandlung	Wachstum nach 20 min	Wachstum nach 4 h	Wachstum nach 24 h
Kontrolle (0)	Rasen	Rasen	+
Stalosan F (1)	+++	/	n.u.
Desinfloor (2)	Rasen	Rasen	Rasen
Staldren (3)	+++	/	n.u.
Mistral (4)	Rasen	Rasen	+++
Superphosphat (5)	+++	/	n.u.
Sterilium (6)	+++	/	n.u.
Sterilium (7)	Rasen	+++	/
Ameisensäure(8)	/	/	n.u.

B) Teststamm E. coli

Behandlung	Wachstum nach 20 min	Wachstum nach 4 h	Wachstum nach 24 h
Kontrolle (0)	Rasen	Rasen	++
Stalosan F (1)	/	/	n.u.
Desinfloor (2)	Rasen	Rasen	Rasen
Staldren (3)	+++	/	n.u.
Mistral (4)	Rasen	+++	+
Superphosphat (5)	+	/	n.u.
Sterilium (6)	+++	/	n.u.
Sterilium (7)	Rasen	++	/
Ameisensäure (8)	/	/	n.u.

Bewertung des Wachstums: Rasen - massives Keimwachstum, keine Einzelkolonien sichtbar

+++ - > 300 Kolonien, Einzelkolonien sichtbar

++ - ca. 50 – 300 Einzelkolonien

+ - < 50 Kolonien

/ - kein Wachstum

n.u. - nicht untersucht, weil nach 4 h kein Wachstum mehr

Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu erkennen, dass beide Testkeime in der Kontrollvariante (0) nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C im Wachstum nachgelassen haben. Hier machte sich offensichtlich ein Nährstoffmangel bemerkbar.

Nicht so jedoch bei der Behandlung mit Desinfloor (2). Hier hielt das ungebremste Rasenwachstum unvermindert an und war, visuell beurteilt, noch massiver als bei der Kontrollvariante nach 20 Minuten bzw. vier Stunden. Desinfloor hält die beiden Testkeime offensichtlich länger am Leben, als es ohne jede Behandlung der Fall ist.

Das Produkt Mistral (4) zeigt gegenüber der Kontrolle nur bei E. coli eine gewisse Wirkung, bei Staph. aureus ist das Keimwachstum nach 24 Stunden sogar stärker als bei der Kontrolle gewesen.

Deutlich effektiver wirkte das Produkt Staldren (3), bei dem beide Testkeime nach 4 Stunden kein Wachstum mehr zeigten (vergleichbar mit Sterilium (6), (höhere Konzentrationsstufe).

Nur unwesentlich besser schneidet das Produkt Superphosphat (5) ab, bei dem nach 20 Minuten nur noch wenige E. coli – Kolonien (< 50) wuchsen.

Von den fünf zu prüfenden Stalleinstreumitteln hat das Produkt Stalosan F (2) bei dem Testkeim E. coli die schnellste Wachstumshemmung gezeigt, gegenüber dem Testkeim Staph. aureus wirkte es ebenso gut wie Staldren (3) bzw. Superphosphat (5).

Die Positivkontrolle Ameisensäure (8) verhinderte bei beiden Testkeimen nach 20 min jedes Wachstum.

IV. Diskussion

Unter erschwerten Bedingungen (Keime auf Blutagar mit idealen Wachstumsbedingungen) zeigten die alkalischen Mittel Desinfloor, und Mistral sowohl als Lösung, als auch als Feststoff aufgebracht, keine Hemmwirkungen auf die Testkeime Staph. aureus und E. coli. Bei den sauren Mitteln (Stalosan F, Superphosphat) wurden dagegen zumindest bei der Feststoffanwendung gewisse Hemmwirkungen erkennbar.

In einem separaten Versuch (Tropfplattenverfahren) ließ sich jedoch zeigen, dass Sterilium (unverdünnt, 25 µl), Wofasept (2%ig, 25 µl) und Ameisensäure (0,5%ig, 25 µl) unter solchen Bedingungen eindeutige Hemmwirkungen aufweisen. Als Kontrolle war hier Stalosan F mitgeführt worden, das wiederum einen kleinen Hemmhof zeigte.

Auf der Stallfläche können die geprüften Mittel zunächst nur in heterogener Phase auf die Keime wirken, bis durch Hinzukommen von Wasser auch eine Wirkung in homogener Phase möglich wird. Eine Diffusion der wirksamen Inhaltsstoffe scheint auf den Testplatten nicht (alkalische Mittel) oder nur wenig (saure Mittel) zu erfolgen, obwohl im Agar eigentlich genügend Wasser verfügbar ist. Das zeigen die anderen geprüften Desinfektionsmittel an.

Unter günstigeren Bedingungen (hohe Mittelkonzentration, homogene Phase) lassen sich differenziertere Wirkungen der geprüften Einstreumittel erkennen. Während Desinfloor das Keimwachstum sogar fördert und Mistral nur sehr geringe Wirkungen zeigt, hebt sich die keimhemmende Wirkung der anderen Mittel im Laborversuch aufsteigend in der Reihenfolge Staldren, Superphosphat, Stalosan F davon deutlich ab. Aus der Sicht dieser Ergebnisse ist die Sinnhaftigkeit des Einsatzes von Desinfloor und Mistral als keimreduzierende Stalleinstreumittel zumindest in Zweifel zu ziehen.

gez. Dr. habil. Block