

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Projekthintergrund

##### 3.1.1. *Kenndaten zum Untersuchungsgebiet*

###### Geographie

Gambia liegt zwischen den 13°04' und 13°05' N Längengraden und den 12°47' und 16°50' W Breitengraden. Es ist der kleinste Staat des afrikanischen Kontinents mit 11.295 km<sup>2</sup> Oberfläche, davon sind 10.689 km<sup>2</sup> Land. Es bildet zu beiden Seiten des Flusses Gambia einen schmalen Landstreifen, der etwa 475 km lang und 45 km breit ist. Das gesamte Staatsgebiet wird im Norden, Osten und Süden von Senegal umgeben. Im Westen grenzt Gambia in einer Ausdehnung von etwa 80 km an den Atlantischen Ozean.

Die Oberfläche des Landes ist dreiegliedert: Plateaus (nicht höher als 200 m), Savannenvegetation im Landesinneren und Mangrovenvegetation im Küstenbereich.

###### Klima

Gambia liegt in der agrarökologischen Sudano-Sahel Zone. Diese Zone variiert zwischen semi-arid (600 bis 1000 mm pro Jahr) im Inland bis subhumid (mehr als 1000 mm pro Jahr) an der Küste. Die Regenzeit, stärker an der Küste als im Innern ausgeprägt, dauert von Juni bis Oktober, mit einer Spitze im August. Die Trockenzeit dauert von Ende Oktober bis Ende Juni. Die Temperatur variiert zwischen 14°C und 40°C (Durchschnittstemperatur 27°C bei 70% Luftfeuchtigkeit).

###### Demographie

Laut FAOSTAT (2005) betrug die Bevölkerung Gambias im Jahr 2003 1,426 Millionen. Die jährliche Wachstumsrate lag im gleichen Jahr bei 2,7%. Eine Verdopplung der Bevölkerung wird schätzungsweise in 20 Jahren erfolgt sein. Die Bevölkerungsdichte ist die höchste in Afrika mit durchschnittlich 139 Einwohner pro km<sup>2</sup> (2002). 74% der Bevölkerung lebten im Jahr 2003 in ländlichen Gebieten.

### Soziale Struktur

*Mandinka* (42%) bilden die größte Bevölkerungsgruppe, neben *Fula* (18%), *Wolof* (16%), *Jola* (10%) und *Serehuli* (9%). Mehr als 85% der Bevölkerung sind Moslems, 11% sind Christen. Die Dorfgemeinschaften werden von einem gewählten Chief (*alkalo*) geleitet.

### Gesundheit

Die Lebenserwartung bei Geburt lag 2003 bei 57 Jahren und die Kindersterblichkeit (unter 5 Jahre) wird mit 246 pro 1000 Lebendgeburten angegeben (WHO, 2006). 21% der Kinder unter 5 Jahren sind unterernährt. 82% der Bevölkerung haben Zugang zu sauberem Wasser (UNICEF, 2006).

### Armut und Lebensmittelversorgung

Die Ernährung basiert auf Reis mit Fisch und Gemüse, ist aber meist nicht ausreichend. Durchschnittlich werden 2270 Kalorien pro Tag und pro Kopf eingenommen (2002). Nach Angaben der Weltbank waren im Jahr 2000 17,2% der Kinder unter fünf Jahren unterernährt. Das Pro-Kopf-Einkommen betrug 2003 US\$ 270. Das Bruttoinlandsprodukt lag 2004 bei 415 Millionen US\$ (WORLD BANK, 2006). Gambia gehört zu den ärmsten Ländern Afrikas, 64% der Bevölkerung leben unterhalb der Armutsgrenze (FAO, 2005).

### Rinderpopulation und Milchproduktion

Der Anteil der Landwirtschaft am Bruttoinlandsprodukt Gambias liegt bei 24,8%, davon kommen 19,5% von der Tierproduktion (FAO, 2005). Im Jahr 2002 wurden 327.000 Rinder gezählt.

Die Rinderhaltung in Gambia ist Teil eines gemischten Produktionssystems, bei dem die Tierhaltung neben dem Anbau von Nutzpflanzen durchgeführt wird. Es gibt hauptsächlich zwei Formen des Herdenmanagements:

1. Der Herdenbesitzer verwaltet die Herde und kümmert sich selbst um die Tiere. Dabei handelt es sich meistens um Personen, die der Gruppe der *Fula* angehören. Die Kühe werden in der Regel einmal täglich gemolken.

2. Herdenbesitzer, welche in diesem Fall meistens zur Gruppe der *Mandinka* gehören, geben die Verantwortung für die Herde in die Hände von Hirten, die meistens *Fula* sind. Diese Hirten bekommen im Gegenzug die Milch, welche die Herde produziert als (Teil-) Bezahlung. In diesem Fall werden die Kühe meist zweimal täglich gemolken.

Über Nacht werden die Tiere einzeln an Pfosten auf einem Feld angebunden. Nach dem Melken am Morgen werden die Tiere losgebunden, um sie grasen zu lassen. Während der Regenzeit (Juli bis Oktober) wird die Herde von einem Hirten begleitet, um zu vermeiden, dass die Tiere die Felder der Bauern zerstören. Die Kälber grasen in der Nähe des Anbindeplatzes. Während der Trockenzeit (November bis Juni) laufen die Tiere frei herum, meist ohne einen Hirten. Abends kehren die Tiere zurück, um getränkt zu werden (AGYEMANG *et al.*, 1997). Vor jedem Melken wird zuerst dem Kalb erlaubt, kurz zu saugen, um den Milchfluss zu fördern. Danach wird es nahe an der Mutterkuh angebunden und die Kuh wird von Hand gemolken. Danach bekommt das Kalb die Residualmilch.

Das größte Problem der Tierhaltung in Gambia ist die saisonal unterschiedliche Verfügbarkeit von Wasser und Futter. Letzteres wird häufig durch Buschfeuer zerstört; dadurch entsteht ein großes Defizit gegen Ende der Trockenzeit. Aus diesen Gründen liegt die Hauptproduktionszeit in der Regenzeit.

Lokal produzierte Milch stammt fast ausschließlich von der lokalen N'Dama-Rasse, welche eine durchschnittliche Jahresproduktion von 175 kg erreichen (FAO, 2005). Die nationale Milchproduktion wurde für das Jahr 2002 auf 7.600 Tonnen geschätzt mit einer jährlichen Wachstumsrate von 2,5% (1990-2000) (FAO, 2005).

Der Milchpreis ab Hof variiert entsprechend der Saison und der Distanz zu den Märkten. Beispielsweise kostet ein Liter Milch im Inland ca. 0,28 € (2004), während in den urbanen Zentren an der Küste der Preis bei 0,57 € (2004) liegt. Zwischenhändler reisen beachtliche Strecken (bis 150 km), um Milch günstig einzukaufen.

Der jährliche Bedarf an Milchprodukten lag 2002 bei 26.200 Tonnen mit einer jährlichen Wachstumsrate von 11,2%. Ein Großteil des Milchbedarfs in Gambia und in anderen Ländern der Region wird durch Importe von Milchpulver und anderen Milchprodukten abgedeckt (Gambia: 27.385 Tonnen für 4 Millionen US\$; FAO, 2005). Lokal produzierte Milch wird zum häuslichen Verzehr oder zur Vermarktung im unmittelbaren Einzugsbereich des Erzeugers genutzt. Ein Problem dieser direkten Vermarktung ist die fehlende Qualitätskontrolle der angebotenen Milch. Ab Mitte bis Ende der Trockenzeit,

wenn die produzierte Milchmenge stark zurückgeht, wird die auf Märkten angebotene Milch häufig mit Wasser verdünnt, oder es handelt sich ausschließlich um rekonstituierte Milch.

## 3.2. Eigene Untersuchungen

### 3.2.1. *Stichprobenauswahl*

In vier Verwaltungseinheiten (*Divisions*) von Gambia wurde je ein Markt ausgesucht, welcher eine wichtige Rolle für das Gebiet spielt, insbesondere für die Vermarktung von Milch und Milchprodukten. Für die *Western Division* (WD) war das der Markt in Brikama, ein wichtiger Umschlagpunkt für Milch aus entfernten Produktionsgebieten zu den urbanen Ballungszentren der Küstenregion. In der *Lower River Division* (LRD) wurde Soma ausgewählt, ebenfalls ein wichtiger Markt, da auch viele senegalesische Händler regelmäßig dort anzutreffen sind. In der *Central River Division* (CRD) wurde Brikamaba gewählt. Dort findet der Markt nur einmal wöchentlich statt und ist typisch für die überwiegende Mehrheit der Wochenmärkte (*Lumos*) in Gambia. Schließlich noch der Markt in Basse für die *Upper River Division* (URD), welcher der wichtigste Markt in diesem Gebiet ist.

Alle anwesenden Milchverkäuferinnen auf den jeweiligen Märkten wurden mit Hilfe von strukturierten Fragebögen interviewt und stellten die Ausgangspopulation für die Befragung dar. Tatsächlich verkaufen ausschließlich Frauen fermentierte, aber auch rohe Milch auf den Märkten. Entsprechend ihrer Angaben wurden Produzenten und Zulieferer von Milch rückverfolgt und ebenfalls besucht und befragt. Die Personen wurden jeweils in Einzelinterviews mit Hilfe eines Übersetzers befragt. Aufgrund der gewonnenen Informationen wurde ein Diagramm zur Marktstruktur entwickelt, welches die Grundlage für die nachfolgende Probennahme war.

### 3.2.2. *Untersuchungszeitraum*

Die Interviews wurden von Mai bis Juni 2000 durchgeführt. Die Proben wurden zwischen August 2000 bis Juni 2001 genommen und analysiert.

### **3.2.3. *Kooperationsbereitschaft der teilnehmenden Milchproduzenten und -verkäufer***

Im Großen und Ganzen waren alle Teilnehmer der Studie sehr kooperativ. Nur bei den ersten Besuchen auf dem Markt in Brikama waren einzelne Milchverkäuferinnen skeptisch, doch nach mehreren Besuchen im Anschluss entstand ein sehr gutes, vertrauensvolles Verhältnis. Die Milchproduzenten waren von Anfang an sehr an der Studie interessiert und stets bereit, Proben von der Herdenmilch abzugeben.

### **3.2.4. *Erstbesuch und Erfassung der Primärdaten***

Um einen besseren Überblick über die Strukturen von Milchproduktion und -verkauf zu bekommen, wurden einzelne Akteure der Kette identifiziert und mit Hilfe von strukturierten Fragebögen interviewt. Zuerst wurden die Milchverkäuferinnen auf den vier Märkten besucht und befragt. Von besonderem Interesse war dabei, woher sie ihre Milch beziehen: von den Produzenten selbst oder von Zwischenhändlern, und welche Distanzen zum Markt zurückzulegen sind. Abgesehen von diesen logistischen Aspekten waren auch hygienische Fragen von Belang, wie die Art der Milchbehälter, deren Reinigung und ökonomische Hintergrundinformationen über Produktangebot, Preise und Nachfrage. Mit Hilfe dieser Informationen wurden die beliefernden Zwischenhändler und die Milchproduzenten identifiziert und ebenfalls mit Hilfe von strukturierten Fragebögen befragt. Die Produzenten gaben außer den Informationen zur Vermarktung der Milch noch Angaben zur Herdengröße, -struktur und Tiergesundheit. Details über die Fragebögen sind im Anhang enthalten.

Diese Vorgehensweise verfolgte die Vermarktungskette von Milch, ausgehend vom Markt, über die Zwischenhändler zu den Produzenten. Auf dieser Grundlagen der realen Milchvermarktungsstrukturen wurden die Proben unter natürlichen Bedingungen gesammelt. Die Milchverkäuferinnen, an ihrem Verkaufsort sitzend, benutzten ihre eigenen Behälter und Messlöffel, um eine kleine Menge Milch in ein steriles Probenglas zu füllen. Das gleiche galt für die Zwischenhändler. Die Milcherzeuger wurden bei ihrer Herde während des Melkens besucht, und erst nach Beenden des Melkens wurde eine Probe aus dem normal üblichen Sammelmilchbehälter genommen. Dieser Ansatz sollte es ermöglichen, die lokalen Bedingungen der Milchgewinnung und -vermarktung möglichst wirklichkeitsnah wiederzugeben.

### **3.2.5. Methode, Intervall und Anzahl der Probennahme**

Milchproben wurden auf unterschiedlichen Ebenen der Produktions- und Vermarktungskette genommen, angefangen mit Proben der Herdenmilch auf der Ebene der Produzenten über Proben der Sammelmilch auf der Ebene der Zwischenhändler bis zu den Endprodukten, die auf den Märkten den Konsumenten angeboten werden. Jede Milchverkäuferin wurde fünf Mal beprobt, korrespondierend mit Proben der beliefernden Zwischenhändler beziehungsweise Produzenten. Die ersten drei Probennahmen erfolgten im August, September und Oktober 2000. Während dieser Saison ist die Milchproduktion am höchsten, da es sich um die Mitte beziehungsweise das Ende der Regenzeit handelt und die Kühe ausreichend Futter finden. Die vierte Probennahme erfolgte im Dezember 2000, am Anfang der Trockenzeit, und die fünfte im Juni 2001 am Ende der Trockenzeit. Dieses Intervall ermöglichte die Untersuchung des Einflusses der Jahreszeit auf die Milchqualität. Auf den Märkten wurde von jeder beteiligten Marktverkäuferin mindestens eine Probe genommen. Besaßen die Verkäuferinnen verschiedene Eimer oder Produkte, so wurde von jedem eine Probe genommen. Bei den zuliefernden Zwischenhändlern wurde ebenfalls eine Probe pro Transportbehälter gesammelt. Bei den Milcherzeugern wurde pro Besuch eine Probe der Herdenmilch, gleich nach dem Melken, genommen.

### **3.2.6. Untersuchungen bei Probennahme**

Auf den Märkten wurde aus jedem Behälter mit Hilfe des üblicherweise benutzten Löffels aus Plastik oder Kürbis etwa 30 ml der Roh- beziehungsweise Sauermilch in ein steriles Glasröhrchen abgefüllt.

Auf dem Protokoll wurden folgende Daten festgehalten:

- Datum und Zeit der Probennahme
- Art der Probe
- Temperatur der Milchprobe
- pH-Wert der Milchprobe
- optische Reinheit der Milch im Behälter
- Konsistenz der Milch im Behälter

Das mit einem Plastikstopfen verschlossene Probenröhrchen wurde bis zur Ankunft im Labor in einer mit Kühlelementen versehenen Kühlbox aufbewahrt. Im Labor wurden die

Proben entweder direkt angesetzt oder maximal eine Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### **3.2.7. Untersuchungen im Labor**

Die bei der Untersuchung auf verschiedene Bakterien verwendeten Nährmedien wurden in der Nährmedienküche des Labors entsprechend den Vorgaben des Herstellers hergestellt. Die fertigen Nährmedien wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert und je nach Haltbarkeit innerhalb von zwei Wochen aufgebraucht.

Die Untersuchungen auf die verschiedenen Keimgruppen wurden nach den Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) durchgeführt, heute des Gesetzes zur Neuordnung des Lebensmittel- und des Futtermittelrechts (LFGB) (s.o.).

Die Methodenstandards wurden zum Teil aufgrund spezifischer Bedürfnisse und Erfahrungen modifiziert. Die Abweichungen sind an den jeweiligen Stellen dargelegt.

Die verbliebenen Reste jeder Einzelprobe wurden bei –20°C in sterilen Kunststoffgefäßen für Nachuntersuchungen eingefroren.

Unabhängig von der nachzuweisenden Keimart wurden die Proben zu Beginn jeder Untersuchung durch sorgfältiges Schütteln durchmischt. Nach dem Beimpfen wurden alle Platten mit dem Deckel nach unten bebrütet.

Die in der Methodenbeschreibung angegebenen Verdünnungsstufen ergaben sich aus den in Vorversuchen anfallenden Ergebnissen. Dabei wurden die Verdünnungsstufen so gewählt, dass die zu erwartenden Keimzahlen auf den Platten im Bereich auswertbarer Zählergebnisse lagen.

Die Zusammensetzungen der zur Anwendung gekommenen Nährmedien und Reagenzien sind im Anhang zu finden.

#### *Aerobe Gesamtkeimzahl*

Die Untersuchung der aeroben Gesamtkeimzahl erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) (Nr. L 01.00-5: Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung der Keimzahl in Milch- und Milchprodukten (Referenzverfahren) bzw. ISO 4833:1991).

Von den einzelnen Rohmilchproben wurden dezimale Verdünnungsstufen durch Beimpfung von 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung (MERCK) mit jeweils 1 ml Rohmilch beziehungsweise 1 ml der vorherigen Verdünnungsstufe hergestellt. Im Doppelansatz wurden von den ausgewählten Verdünnungsstufen je 1 ml in eine leere Petrischale pipettiert. Aufgrund der zu erwartenden Keimzahlen wurden hier die Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  ausgewählt. Anschließend wurden die Petrischalen mit 12-15 ml des flüssigen und im Wasserbad auf etwa  $47^{\circ}\text{C}$  abgekühlten Plate-Count-Agar (MERCK) aufgefüllt sowie Probe beziehungsweise Verdünnungen und Nährboden gemischt. Die Zeit von der Herstellung der Verdünnung bis zur Beimpfung betrug nicht mehr als zehn Minuten. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten bei  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  für 48 h im Brutschrank bebrütet. Die Bebrütungszeit wurde kürzer gewählt als im oben genannten Referenzverfahren auf Grundlage eines Ringversuchs am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, wonach auch 48 h Bebrütungszeit ausreichend sind.

Nach 48 h wurde die Anzahl der Kolonien pro Platte gezählt, wobei jede Kolonie mit einem Farbstift markiert wurde. Laufkolonien wurden als eine Kolonie gezählt. Nur Platten, die zwischen 10 und 300 Kolonien aufwiesen, gelangten zur Auswertung.

Die Anzahl der Kolonien wurde durch das gewogene arithmetische Mittel bestimmt. Dabei wurde die Summe aller ausgezählten Kolonien durch die Summe der untersuchten Substratmengen dividiert. Die Anzahl der Mikroorganismen pro ml wird nach folgender Zahlenwertgleichung berechnet,

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

wobei

N Anzahl der koloniebildenden Einheiten je ml Rohmilch (gewogenes arithmetisches Mittel)

$\sum c$  Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Auswertung kamen (niedrigste und nächst höhere Verdünnungsstufe)

V Volumen inokulierter Probe in ml



- $n_1$  Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe  
 $n_2$  Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe  
 $d$  Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf  $n_1$  bezogene Verdünnungsstufe

Koloniezahlen werden nur mit einer Stelle nach dem Komma angegeben. Sie werden nach den mathematischen Rundungsregeln auf- und abgerundet und das Resultat als Zehnerpotenz angegeben.

Waren auf den mit der größten Probenmenge beimpften Platten weniger als zehn Kolonien vorhanden, so lautete das Ergebnis: „weniger als  $1,0 \times 10^2$  pro ml“.

### Coliforme Keime

Die Untersuchung auf coliforme Keime erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG (Nr. L 01.00-2: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis-Verfahren mit festen Nährmedium). Für die Untersuchung auf coliforme Keime wurden dezimale Verdünnungsreihen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  durch Beimpfen von 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung mit jeweils 1 ml der Probe beziehungsweise der vorhergehenden Verdünnungslösung hergestellt. Im Doppelansatz wurde von den ausgewählten Verdünnungsstufen je 1 ml in eine leere Petrischale pipettiert und anschließend mit 12-15 ml des auf etwa 47°C abgekühlten MACCONKEY-Agar (MERCK) aufgefüllt. Anschließend wurden Probe und Nährboden gemischt. Nach Erstarren des Agars wurde dieser mit etwa 5 ml desselben Agars überschichtet. Nach dem Erstarren wurden die Platten mit dem Deckel nach unten bei 30°C für 24 h im Brutschrank bebrütet. Nach dem Bebrüten wurden die typischen dunkelroten Kolonien (0,5 mm und größer) gezählt. Es kamen nur Platten zur Auswertung, deren Anzahl an Kolonien zwischen 10 und 150 lagen. Die Berechnung koloniebildender Einheiten erfolgte wie bei der aeroben Gesamtkeimzahl (siehe Seite 54).

### Nachweis von *E.coli*

Zur Bestätigung von *E.coli* wurden pro Probe fünf typische Kolonien in 10 ml Brillantgrün-Galle-Laktose-Nährmedium (BRILA) (MERCK) überimpft. In den Reagenzgläsern befanden sich zusätzlich Durham-Röhrchen zur Feststellung der Gasbildung. Die beimpfte BRILA-Bouillon wurde im Wasserbad bei 44°C für 24 h bebrütet. Nach dem Bebrüten wurden die Durham-Röhrchen in den Reagenzgläsern auf Gasbildung, verursacht durch den Laktose-Abbau, geprüft, wobei die Reaktion als positiv gewertet wurde, wenn die gebildete Gasblase mindestens ein Drittel des Durham-Röhrchen einnahm. Mit Hilfe einer vorher abgeflamte Öse wurden Reagenzgläser, gefüllt mit 10 ml Tryptonwasser, mit den als positiv bewerteten Proben beimpft. Das beimpfte Tryptonwasser wurde im Wasserbad bei 45°C für 24 h bebrütet. Nach dem Bebrüten wurden in jedes Reagenzglas 0,5 ml Indol-Reagenz pipettiert. Bei einer Rotfärbung in der alkoholischen Phase nach höchstens einer Minute wird die Probe als positiv für *E.coli* gewertet. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *E.coli* wurde aus der Anzahl koloniebildender Einheiten coliformer Keime und dem Anteil positiver Indol-Reaktionen berechnet.

### *Listeria monocytogenes*

Bei der Untersuchung auf *Listeria monocytogenes* wurde die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG unter Nr. L 00.00-22: „Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis und Bestimmung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln“- (1991) beziehungsweise EN/ ISO 11290-1 und 11290-2 1 angewandt.

Es fand nur eine qualitative Prüfung der Milch auf Listerien statt.

Zunächst wurden 1 ml Roh- beziehungsweise Sauermilch zu 9 ml einer halbkonzentrierten Anreicherungsbouillon (FRASER) hinzugeführt und bei 30°C im Brutschrank für 24 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurde 1 ml der halbkonzentrierten Anreicherungsbouillon in 10 ml vollkonzentrierte Anreicherungsbouillon (FRASER) übertragen und bei 37°C im Brutschrank für 48 h bebrütet. Anschließend wurden mit Hilfe einer abgeflamten Öse zwei selektive Nährböden (OXFORD und PALCAM Agar) aus der vollkonzentrierten Anreicherung beimpft und bei 37°C im Brutschrank für 48 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die beimpften Platten auf verdächtige Kolonien untersucht.

Listerien bilden auf OXFORD-Agar braungraue Kolonien mit einem Durchmesser von maximal 1,5 mm, die meist rund, flach gewölbt und zentral eingezogen sind und einem schwarzen Hof durch Äskulinspaltung bilden. Auf PALCAM-Agar erscheinen Listerien als grüngraue Kolonien mit schwarzem Hof von höchstens 2 mm Durchmesser, die gleichfalls meist rund, flach gewölbt und zentral eingezogen sind. Entfernt man die Kolonien von den Nährböden mit einer Öse, so bleibt im Medium eine kleine Vertiefung. Die Kolonien wurden zunächst mikroskopisch untersucht. Listerien zeigen im hängenden Tropfen eine typische taumelnde Bewegung. In der Färbung stellen sich Listerien als grampositive kurze Stäbchen dar. Die Fähigkeit der Listerien Katalase zu bilden, wurde im Objektträger test überprüft. Dazu wurde eine Listerien-Kolonie in einem Tropfen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , 3%ig) verrieben. Im positiven Fall wurde das Wasserstoffperoxid gespalten und der freigewordene Sauerstoff manifestierte sich durch die Ausbildung von Gasbläschen.

Für weitere biochemische Bestätigungsreaktionen wurden jeweils fünf verdächtige Kolonien von den beiden Selektivplatten auf Trypton-Soja-Agar mit Hefeextrakt (Tryptone-Soy-Yeast-Extract-Agar TSYEA) (MERCK) überimpft und bei 37°C für 24 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die Platten im Schrägdurchlicht nach HENRY betrachtet. Prinzip dieser Untersuchung ist, dass eine externe Lichtquelle einen Spiegel beleuchtet, so dass Licht in einem Winkel von 45° von unten auf die bewachsene Agarplatte trifft. Diese Platte wird mit einem Stereomikroskop betrachtet, wobei Listerien bläulich aufleuchten.

Hatte sich der Listerien-Verdacht soweit bestätigt, wurde je eine verdächtige Kolonie in jeweils 5 ml Trypton-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt (TSYEB ohne Supplement) überführt. Die Bouillon wurde bei 37°C für 4 h im Wasserbad bebrütet. Aus dieser Bouillon wurden die Nährmedien für den Beweglichkeitstest, den Nachweis der Kohlenhydratspaltung und das CAMP-Phänomen beimpft.

Für den Nachweis der Kohlenhydratspaltung wurde aus jeder TSYE-Bouillon eine Öse Material in 10 ml Rhamnose- und Xylose- haltige Nährmedien übertragen, welche dann bis zu einer Woche bei 37°C bebrütet wurden. Eine Kohlenhydratspaltung zeigte sich durch einen Farbumschlag der Bouillon an, indem der Zuckerabbau zu einer pH-Senkung führte, was einen Farbumschlag der violetten Lösung nach gelb induzierte.

Mit einer Impfnadel wurde aus der TSYE-Bouillon eine Stichkultur in 5 ml des Beweglichkeitsagars angelegt. Der Agar wurde 48 bis 72 h bei 25°C bebrütet. Waren die

Bakterien beweglich, so zeigte sich ein schirmartiges Wachstum der Keime im Nährmedium.

Um die verdächtigen Keime auf das CAMP-Phänomen zu untersuchen, wurde aus den TSYE-Nährmedien jeweils eine Öse senkrecht gegen einen  $\beta$ -hämolyisierenden Staphylokokkenstamm auf eine Columbia-Agarplatte mit Schafblut ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h bebrütet. Verhielten sich die Keime CAMP-positiv, so bildete sich im Berührungsbereich der beiden Impfstreiche eine vollständige Hämolysezone aus. Tabelle 11 zeigt die biochemischen Reaktionen der verschiedenen *Listeria* spp.

**Tabelle 11: Reaktionen zur Identifizierung von *Listeria* spp.**

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> oder <i>murrayi</i>	<i>L.ivanovii</i>
Gramfärbung	+	+	+
Äskulinspaltung	+	+	+
Beweglichkeit	+	+	+
HENRY-Beleuchtung	+	+	+
Rhamnose-Spaltung	+	±	-
Xylose-Spaltung	-	-	+
CAMP-Test ( <i>S. aureus</i> )	+	-	-

### Salmonellen

Die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG unter Nr. L 00.00-20: „Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis von Salmonellen“ beziehungsweise ISO 6579:1993 kam für den Nachweis von Salmonellen zum Einsatz.

Von jeder Milchprobe wurden 1 ml in 9 ml gepuffertes Peptonwasser als Voranreicherung pipettiert und bei 37°C für 24 h bebrütet.

Für die Anreicherung wurden 1 ml aus jeder Voranreicherung in 10 ml Tetrathionat-Bouillon nach MÜLLER-KAUFFMANN und 0,1 ml aus jeder Voranreicherung in 10 ml Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV-Medium) pipettiert. Abweichend von der ISO- Methode, beziehungsweise der Methode nach § 35 LMBG, wurde wegen der Toxizität von Selenit die Selenit-Cystin-Bouillon

durch die Tetrathionat-Bouillon ersetzt. Diese Methode hat sich bei der Untersuchung von Geflügelfleisch und Milch bewährt (ATANASOVA *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 1997).

Die Tetrathionat-Lösung wurde bei 37°C für 24 h, das RV-Medium bei 42°C für 24 h bebrütet. Als nächster Schritt wurden aus den Anreicherungen jeweils zwei Selektivnährböden beimpft. Gemäss Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Nr. L 00.00-20 ist der Brillantgrün-Phenolrot-Agar (BPLS) nach EDEL und KAMPELMACHER als ein Selektivnährboden für die Salmonellen-Identifizierung vorgeschrieben. In dieser Untersuchung kam weiterhin der Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) als zweiter Selektiv-Nährboden zum Einsatz. Salmonellen vermögen Laktose nicht abzubauen und bewirken demnach keinen Farbumschlag der in den Nährmedien enthaltenen Indikatoren in den sauren Bereich. Beide Selektiv-Nährböden wurden bei 37°C für 24 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die Platten auf verdächtige Kolonien untersucht. Salmonellen wachsen auf BPLS-Agar als rötliche bis rote Kolonien, wobei auch der Nährboden eine rote Farbe annimmt. Auf XLD-Agar bilden Salmonellen Kolonien mit schwarzem Zentrum.

Von den verdächtigen Kolonien wurden jeweils fünf auf Nähragar übertragen und bei 37°C für 24 h bebrütet. Wiederum fünf Kolonien wurden anschließend auf Kligler- und Harnstoff-Schrägagar überimpft und bei 37°C für 24 h bebrütet. Salmonellen sind fähig, Glukose zu spalten, wodurch sich der Kligler-Agar von rot nach gelb umfärbt. Dabei wird meistens Gas produziert. In der Tiefe verfärbt sich bei vielen Salmonellenstämmen das Röhrchen durch die Produktion von Eisensulfid ins Schwarze. Im Bereich der Oberfläche des Schrägagars verändert sich die Farbe nicht.

#### Koagulase-positive Staphylokokken

Die bei der Untersuchung auf Staphylokokken angewandte Methode war durch die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG vorgegeben. Sie findet sich unter Nr. L 00.00-50: „Untersuchung von Lebensmitteln. Horizontales Verfahren für die Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies) in Lebensmitteln. Teil 1: Verfahren mit BAIRD-PARKER-Agar“ bzw. ISO/DIS 6888-1 (1999), validiert von DE BUYSER *et al.* (2003).

Weil HARVEY und GILMOUR (1985) sowie OTSUKA *et al.* (1992) darauf hinwiesen, dass die positive Eigelbreaktion bei Verwendung von BAIRD-PARKER-Agar als

alleiniges Kriterium für die Identifizierung von Koagulase-positiven Staphylokokken nicht ausreicht, wurden in der hier vorliegenden Untersuchung entsprechend der Methode nach § 35 LMBG auch die Eigelb-negativen Kolonien, sofern sie morphologisch wie Staphylokokken aussahen, als sogenannte atypische Kolonien zur Bestätigung mit herangezogen.

Zum quantitativen Nachweis Koagulase-positiver Staphylokokken wurden zunächst dezimale Verdünnungsreihen hergestellt, indem 1 ml Roh- beziehungsweise Sauermilch zu 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung gegeben wurde. Für die weiteren Verdünnungsstufen wurden jeweils 1 ml der vorhergehenden Verdünnungsstufe in 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung pipettiert. Aus den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  wurden jeweils 0,1 ml auf je zwei Eigelb-Tellurit-Glycin-Pyruvat-Agarplatten (ETGPA) nach BAIRD-PARKER pipettiert und sofort mit abgeflammtten Drigalski-Spateln verteilt. Die beimpften Platten wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 48 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die Platten auf das Vorhandensein Koagulase-positiver Staphylokokken überprüft. Typische Kolonien erscheinen auf BAIRD-PARKER-Agar schwarz durch Tellurit-Spaltung, glänzend und besitzen einen weißen Rand, den eine durchsichtige Zone umgibt (positive Eigelbreaktion). Hierfür ist die von den Staphylokokken gebildete Lecithinase, eine Phospholipase, verantwortlich. Sie baut das im Agar enthaltene Eigelb ab.

Als atypische Kolonien gelten auf BAIRD-PARKER-Agar schwarze Kolonien ohne Eigelbreaktion. Die typischen und die atypischen Kolonien wurden getrennt auf beiden Platten einer Verdünnungsstufe gezählt, wobei allerdings nur Platten mit einer Koloniezahl von insgesamt bis zu 150 in die Auswertung kamen.

Zur Bestätigung wurden von den ausgewerteten Platten - sofern möglich - fünf typische und fünf atypische Kolonien in Kulturröhrchen mit 5 ml Hirn-Herz-Bouillon überimpft. Diese wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 24 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurden aus der Hirn-Herz-Bouillon 0,1 ml mit 0,3 ml Humanplasma in ein Kulturröhrchen gegeben und für 4-6 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Humanplasma wurde anstelle von Kaninchenplasma gewählt, da letzteres in Gambia praktisch nicht zur Verfügung stand. Ältere Publikationen beschreiben die Verwendung von Humanplasma zur Durchführung des Koagulase-Tests (CRISLEY *et al.*, 1965; GUPTA *et al.*, 1978). Wenn die Flüssigkeit in dem Kulturröhrchen zu mindestens drei Viertel koagulierte, galt die Probe als Koagulase-positiv. Im negativen Fall wurde für weitere 6 h bebrütet und erneut ausgewertet. Stets wurde ein positiver Stamm als Kontrolle mitgeführt.

Das Endergebnis wurde entsprechend der unter 3.2.7 aufgeführten Formel (siehe Seite 54) als gewogenes arithmetisches Mittel errechnet. Für die Angabe des ermittelten Ergebnisses wurden, wie üblich, nur die ersten zwei Dezimalstellen herangezogen und das Ergebnis als Zehnerpotenz angegeben (vgl. Seite 54).

Weiterführende Untersuchungen zur Abgrenzung von *Staphylococcus aureus* gegenüber anderen Koagulase-positiven Staphylokokken anhand des Stoffwechselverhaltens bei der Verwendung verschiedener Zucker sind in der Amtlichen Methode nicht vorgesehen.

### Bacillus cereus

Zum Nachweis von *Bacillus cereus* wurde gemäss ISO 7932: 1993 (E) der Mannit-Eigelb-Polymyxin-Agar (MYP) nach MOSSEL *et al.* (1967) verwendet. Der Nachweis beruht auf zwei biochemischen Reaktionen: der Eigelbreaktion und der fehlenden Mannitspaltung.

Zunächst wurde eine Verdünnung hergestellt, indem 1 ml Roh- beziehungsweise Sauermilch zu 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung pipettiert wurde. Aus der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  wurde 0,1 ml auf eine Mannit-Eigelb-Polymyxin-Agar-Platte pipettiert und sofort mit einem abgeflamten Drigalski-Spatel verteilt. Die beimpften Platten wurden bei 30°C für 24 h bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die Platten auf verdächtige Kolonien untersucht. Auf dem MYP-Agar sind die Kolonien von *Bacillus cereus* rosa- bis purpurfarben, rau und trocken.

### H<sub>2</sub>S-reduzierende Clostridien

Zum Nachweis H<sub>2</sub>S-reduzierender Clostridien wurde TSC-Agar gemäss ISO 7937-1985 verwendet. Zunächst wurde wieder eine Verdünnung hergestellt, indem 1 ml Roh- beziehungsweise Sauermilch zu 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung pipettiert wurde. Aus der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  wurde 1 ml in eine leere Petrischale pipettiert und mit 12-15 ml flüssigem TSC-Agar übergossen. Verdünnung und Agar wurden gründlich miteinander vermischt. Nach Erstarren des Agar wurden nochmals 5 ml des TSC-Agars aufgegossen. Die Platten wurden unter anaeroben Bedingungen bei 37°C für 24 h bebrütet. Nach Bebrütung wurden die Platten auf verdächtige Kolonien überprüft. Durch die Fähigkeit zur Spaltung von Eisensulfid (H<sub>2</sub>S) erscheinen H<sub>2</sub>S-spaltende Clostridien als schwarze Kolonien.

Zur Bestätigung wurden verdächtige Kolonien auf TSC-Agar ohne TSC-Supplement und auf Columbia-Schafblutagar überimpft. Die Platten wurden anaerob bei 37°C für 24 h Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung erscheinen H<sub>2</sub>S-spaltende Clostridien auch auf dem TSC-Agar ohne TSC-Supplement als schwarze Kolonien und zeigen auf dem Columbia-Schafblutagar eine Hämolyse, welche sich unter aeroben Bedingungen durch Oxidation grünlich verfärbt.

### Hefen und Schimmelpilze

Von den einzelnen Sauermilchproben wurden dezimale Verdünnungsstufen durch Beimpfung von 9 ml Maximale Wiederbelebungslösung (MERCK) mit jeweils 1 ml Sauermilch beziehungsweise 1 ml der vorherigen Verdünnungsstufe hergestellt. Im Doppelansatz wurden von den ausgewählten Verdünnungsstufen je 1 ml in eine leere Petrischale pipettiert. Aufgrund der zu erwartenden Keimzahlen wurden hier die Verdünnungsstufen 10<sup>-4</sup> und 10<sup>-5</sup> ausgewählt. Anschließend wurden die Petrischalen mit 12-15 ml des flüssigen und im Wasserbad auf etwa 47°C abgekühlten Hefeextrakt-Glukose-Chloramphenicol-Agar (YGC) (MERCK) aufgefüllt sowie Probe beziehungsweise Verdünnungen und Nährboden gemischt. Die Zeit von der Herstellung der Verdünnung bis zur Beimpfung betrug nicht mehr als zehn Minuten. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten bei 30°C ± 1°C für 48 h im Brutschrank bebrütet. Nach 48 h wurde die Anzahl der Kolonien pro Platte gezählt, wobei jede Kolonie mit einem Farbstift markiert wurde. Hierbei gelangten nur Platten zur Auswertung, die zwischen 10 und 150 Kolonien aufwiesen. Die Anzahl der Kolonien wurde durch das gewogene arithmetische Mittel bestimmt (Formel siehe Seite 54).



Auswertung

Die Studie sollte zwei Aspekte ansprechen: a) die potenzielle Gefährdung durch den Konsum lokaler Milch und Milchprodukte und b) das Potenzial der Rohmilch hinsichtlich einer Weiterverarbeitung. Deshalb erfolgte der Vergleich der Ergebnisse mit internationalen Standards. Diese Standards sollen sicherstellen, dass Milch gesundheitlich unbedenklich und zur Weiterverarbeitung in verschiedene Milchprodukte geeignet ist. Zwei Standards wurden dafür herangezogen: Standards der Europäischen Union (Council Directive 92/46/EEC) für Staphylokokken, Salmonellen und Listerien und kenianische Standards (Kenyan Bureau of Standards (KEBS), Kenyan Standard 05-04, 1996) für die mesophile Gesamtkeimzahl und coliforme Bakterien.

Tabelle 12 enthält Details über die zum Vergleich herangezogenen Standards.

**Tabelle 12: Übersicht über angewandte Standards**

	EU Council Directive 92/46/EEC	KEBS
Keimzahl/ml bei +30°C	= 100.000	= 2.000.000
Coliforme Keime/ml bei +30°C	m= 0, M= 5, n=5, c= 2 (Guideline)	= 50.000
<i>Staphylococcus aureus</i> /ml	m= 500, M= 2.000, n= 5, c=2	
<i>Salmonella</i> spp. in 25 ml	Negativ in 25 ml, n=5, c=0	
<i>Listeria monocytogenes</i> in 1 ml	Negativ in 1 ml, n=5, c=0	

n= Anzahl der zu untersuchenden Proben, die von einer Produktionseinheit zu entnehmen sind  
c= Zahl der Proben, die Werte zwischen „m“ und „M“ aufweisen dürfen  
m= Richtwert, bis zu dem alle Ergebnisse als zufriedenstellend anzusehen sind  
M= Keimzahlgrenze, die von keiner Probe überschritten werden darf

Einzelergebnisse wurden zu Gruppen zusammengefasst, entsprechend der Keimzahlen, aufsteigend in Zehnerpotenzen. Subgruppen wurden für auszählbare Kolonien (genannt „a“) und nicht auszählbare Kolonien (genannt „b“) gebildet, wobei als auszählbar gilt, wenn nicht weniger als 10 und nicht mehr als 150 (bei Gesamtkeimzahl 300) Kolonien auf dem zu untersuchenden Nährboden gewachsen sind. In Gruppe 1 wurden alle Ergebnisse zusammengefasst mit Keimzahlen innerhalb gesetzter Standards. Alle anderen Gruppen liegen über den gesetzten Standardwerten.