



**LfL**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

# Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses

Ergebnisse aus einem  
Forschungsprojekt



**Schriftenreihe**

ISSN 1611-4159

8

2010

"

"

"

## Impressum

J gtcwui gdgt<" Dc {gtkuej g"Ncpf gucpucn/hÅ "Ncpf y ktuej chw"NhN+"  
X<sup>3</sup>wkpi gt"UtcËg"5: .": 7576"Ht gkupi /Y glj gpugrj cp  
Kpvtpgv<"y y y OhNÖlc {gtpf g"

Tgf cmkqp<" Kpukww/hÅ "Rhrcp| gpuej wj "  
Ncpi g"Rqlpv32.": 7576"Ht gkupi /Y glj gpugrj cp"  
G/O ck<" Rhrcp| gpuej wj B NhNÖlc {gtpf g"  
Vgrhqp<" 2: 383'93/7873"

40wpxgt@pf gtvg"Cwhrci g<"Cwi wuv'4234"

F twem<" GU/F twem": 7578"Ht gkupi /VÅpvpgj cwugp"

Uej wj i gdÅj t<" 7.22"Gwtq"

Í "NhN"



# **Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses**

## **Ergebnisse aus einem Forschungsprojekt**

**Luitgardis Seigner, Regina Friedrich,  
Dorothee Kaemmerer, Peter Büttner,  
Georg Poschenrieder, Andreas Hermann,  
Andreas Gronauer**



# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung .....9</b>
<b>2</b>	<b>Ziele des Projekts .....11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....12</b>
3.1	Fermenterversuche .....12
3.2	Laborversuche im Batchverfahren .....14
3.3	Silivertische .....14
3.4	Nachweisverfahren .....15
3.5	Monitoring der Biogaspilotanlagen .....16
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....16</b>
4.1	Lebensfähigkeit der Pathogene im Durchflussfermenter und Batchverfahren .....17
4.1.1	Bakterielle Ringfäule ( <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> ) .....17
4.1.2	Schleimkrankheit ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ) .....18
4.1.3	Kartoffelkrebs ( <i>Synchytrium endobioticum</i> ) .....18
4.1.4	Kartoffel-Zystennematoden ( <i>Globodera pallida</i> , <i>G. rostochiensis</i> ) .....19
4.1.5	Ährenfusariose bei Getreide ( <i>Fusarium graminearum</i> ) .....19
4.1.6	Wurzelbärtigkeit (Rizomania) der Zuckerrübe (Beet necrotic yellow vein virus) und dessen Vektorpilz <i>Polymyxa betae</i> .....19
4.1.7	<i>Verticillium dahliae</i> und <i>Verticillium albo-atrum</i> .....22
4.1.7.1	Überdauerung von <i>Verticillium</i> -Myzel im Biogasfermenter .....22
4.1.7.2	Überdauerung von <i>Verticillium</i> an Hopfen im Silo bzw. Fermenter/Gärs substrat .....22
4.1.8	Tabakmosaik (Tabakmosaikvirus) .....24
4.1.9	Bakterielle Gräserwelke ( <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> ) .....24
4.2	Silivertische mit <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> und <i>Rhizoctonia solani</i> .....24
4.3	Übersichtstabelle zur Überdauerung der Phytopathogene .....25
4.4	Monitoring der Biogaspilotanlagen .....26
4.4.1	Methodik .....26
4.4.2	Monitoring-Ergebnisse .....26
<b>5</b>	<b>Diskussion .....27</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....30</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....31</b>
<b>8</b>	<b>Eigene Publikationen .....33</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....33</b>

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Phytohygienische Risikofaktoren bei der Biogasproduktion .....	10
Abb. 2: Schematische Darstellung der Projektarbeiten.....	10
Abb. 3: Übersicht über die Versuchsvarianten Fermenter-, Batch- und Silierversuche .....	12
Abb. 4: A) Komponenten eines Diffusionskeimträgers B) Zwei in einer Führungsschiene übereinander installierte Keimträger. C) Durchflussfermenter mit Vorrichtung zum Einsetzen der Keimträger .....	13
Abb. 5: Weckglassilos mit gehäckseltem Pflanzenmaterial; Filtertüte mit eingeschlossenem, pathogenhaltigem Pflanzenmaterial .....	14
Abb. 6: Übersicht über die angewandten Nachweismethoden.....	15
Abb. 8: Auberginenpflanze circa 2 Wochen nach künstlicher Infektion mit <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> .....	17
Abb. 7: Durchgeschnittene Kartoffelknolle mit Symptomen der Bakterielle Ringfäule .....	17
Abb. 9: Reinkultur von <i>Ralstonia solanacearum</i> auf SMSA- Semiselektivmedium.....	18
Abb. 10: Mit Kartoffelkrebs befallene Kartoffelknolle.....	18
Abb. 11: Zuckerrübenpflänzchen, die für den Biotest zum Nachweis der Virulenz des Rizomaniavirus und seines Vektors kultiviert wurden .....	19
Abb. 12: ELISA-Absorptionswerte für BNYVV gemessen an Wurzeln von Zuckerrübenpflänzchen direkt nach einer 1 bis 36 Tage andauernden Inkubation im Biogasfermenter bei 38 bzw. 55 °C.....	20
Abb. 13: ELISA-Absorptionswerte für BNYVV gemessen an Wurzeln von Zuckerrübenpflänzchen nach dem Biotest. ....	21
Abb. 14: Weckglassilos mit Hopfenhäckselgut; <i>Verticillium</i> -infizierte Hopfenstrünke wurden eingeschlossen in Filterbeuteln in die Weckglassilos eingebracht .....	22
Abb. 15: Abreiben der zu untersuchenden Probe auf Tabak-Testpflanzen; mit TMV infizierte Blätter von Testpflanzen .....	24
Abb. 16: Mit <i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> infizierte Weidelgräser .....	24
Abb. 17: Proben aus einer Silage auf Nähragar: starke Verpilzung bei Sauerstoffzufuhr bzw. keine Verpilzung bei Sauerstoffausschluss während der Silierung .....	26

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Zusammenstellung der Ergebnisse der <i>Verticillium</i> -Untersuchungen an Hopfen .....	23
Tab. 2: Zusammenfassung der bearbeiteten Phytopathogene, der Methoden und Ergebnisse .....	25



## 1 Einleitung

Die Biogastechnologie ist unter dem Aspekt der Nutzung erneuerbarer Energieträger (NawaRo-Kulturen) und des Klimaschutzes eine zukunftsweisende Technologie. Das Ausbringen der Gärrückstände auf landwirtschaftlich genutzte Flächen leistet zudem einen wichtigen Beitrag zur Schonung bestehender Ressourcen und Aufrechterhaltung natürlicher Kreislaufprozesse. Überdies ist aus ökologischer, aber auch ökonomischer Sicht die Möglichkeit bedeutsam, biologische Abfälle und Reststoffe, die in großen Mengen aus Landwirtschaft, Gartenbau und vor allen Dingen aus industrieller Verarbeitung und Produktion anfallen, für die Energieproduktion zu nutzen. So entstehen laut STEINMÖLLER et al. (2004) in Deutschland allein bei der industriellen Verarbeitung von Kartoffeln zu Stärke, Veredelungsprodukten und Alkohol jährlich zwischen 3 und 4 Millionen Tonnen Rückstände wie Schälreste, Gewebswasser und Schlempe. Zudem könnten nicht vermarktungsfähige, mit Schaderregern belastete Partien in Biogasanlagen gewinnbringend entsorgt werden. Dies wäre insbesondere im Hinblick auf die Verwertung von Partien, die mit Quarantäneschadorganismen (QSO) infiziert sind, von großem Vorteil. Die Entsorgung mit QSO belasteter Partien ist aufgrund von Quarantänevorschriften (z.B. Pflanzen-Quarantäne-Richtlinie 77/93/EWG vom 21.12.1976, konsolidierte Fassung 2000/29/EG vom 08.05.2000; Pflanzenbeschauverordnung in der Fassung vom 03.04.2000, Bundesgesetzblatt 2000, 337) problematisch, weil von der Entsorgung kein Verbreitungsrisiko für die Quarantäneschaderreger ausgehen darf. Zumeist besteht für derartige Befallspartien keine sinnvolle Verwendungsmöglichkeit.

Biologische Abfälle und zu entsorgenden Befallspartien entsprechen nicht der Forderung der Bioabfallverordnung (BioAbfV), des Düngemittelgesetzes (DüMG) und der Düngemittelverordnung (DüMV) nach phytohygienischer Unbedenklichkeit und sind deshalb als kritisch einzustufen. Dementsprechend müssen gemäß der BioAbfV zumindest bei Vergärung im mesothermen Bereich eine Vor- oder Nachpasteurisierung bei 70 °C oder eine Nachkompostierung durchgeführt werden (PHILIPP und PIETSCH, 2008). Grundsätzlich besteht aber nicht nur bei Befallspartien und Bioabfall, sondern bei jeglichem pflanzlichen Material, das in die Biogasanlage gelangt, die Gefahr, dass Pflanzenpathogene den Fermentationsprozess überleben und mit dem Gärrest großflächig auf Kulturflächen verteilt werden. Im Hinblick auf QSO wäre dies ein großes und nicht tolerierbares Risiko. Es könnte in der Folge zu einem raschen und verstärkten Befall der Pflanzen und damit zu einer Zunahme bestimmter Erregerpopulationen auf den Produktionsflächen kommen. Die betriebene Kreislaufwirtschaft, enge Fruchtfolgen bevorzugter und mit reduziertem Pflanzenschutzmitteleinsatz angebaute NawaRo-Kulturen sowie die gezielte Entsorgung von Befallspartien erhöhen hierbei das Gefährdungspotenzial (Abb. 1).

Speziell bei mesotherm betriebenen Biogasanlagen, die in einem Temperaturbereich von 35 bis 45 °C laufen, könnten die Temperaturen für eine Inaktivierung der Keime nicht ausreichen, so dass von diesen Anlagen möglicherweise eine erhöhte Gefahr ausgeht. Demzufolge erkennt die BioAbfV die Vergärung im mittleren Temperaturbereich nicht als hygienisierende Behandlung an und schreibt, wie oben ausgeführt, bei Vergärung von Bioabfällen in mesothermen Fermentern zusätzliche Maßnahmen vor. Das eventuell bestehende Problem der mangelnden Hygienisierung hat Auswirkungen auf den Großteil der in Bayern installierten Biogasanlagen, denn nach einer Studie des Instituts für Ländliche Strukturentwicklung, Betriebswirtschaft und Agrarinformatik (ILB) der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) (ANONYMUS 2007) werden immerhin ca. 75 % der bayerischen Anlagen mesotherm geführt.

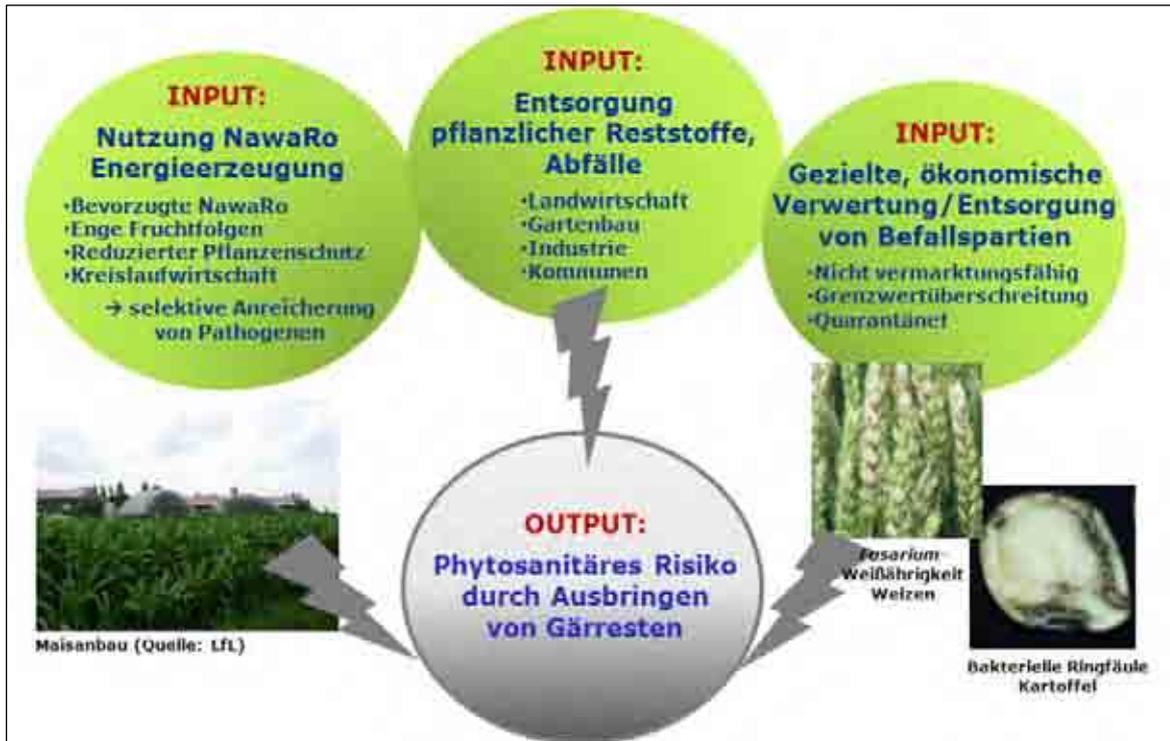


Abb. 1: Phytohygienische Risikofaktoren bei der Biogasproduktion

Vor diesem Hintergrund wurde an der LfL zur Abklärung mit dem Ausbringen von Gärresten verbundener Phytohygienierisiken das Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses im Rahmen dieses Projekts untersucht (Abb. 2).

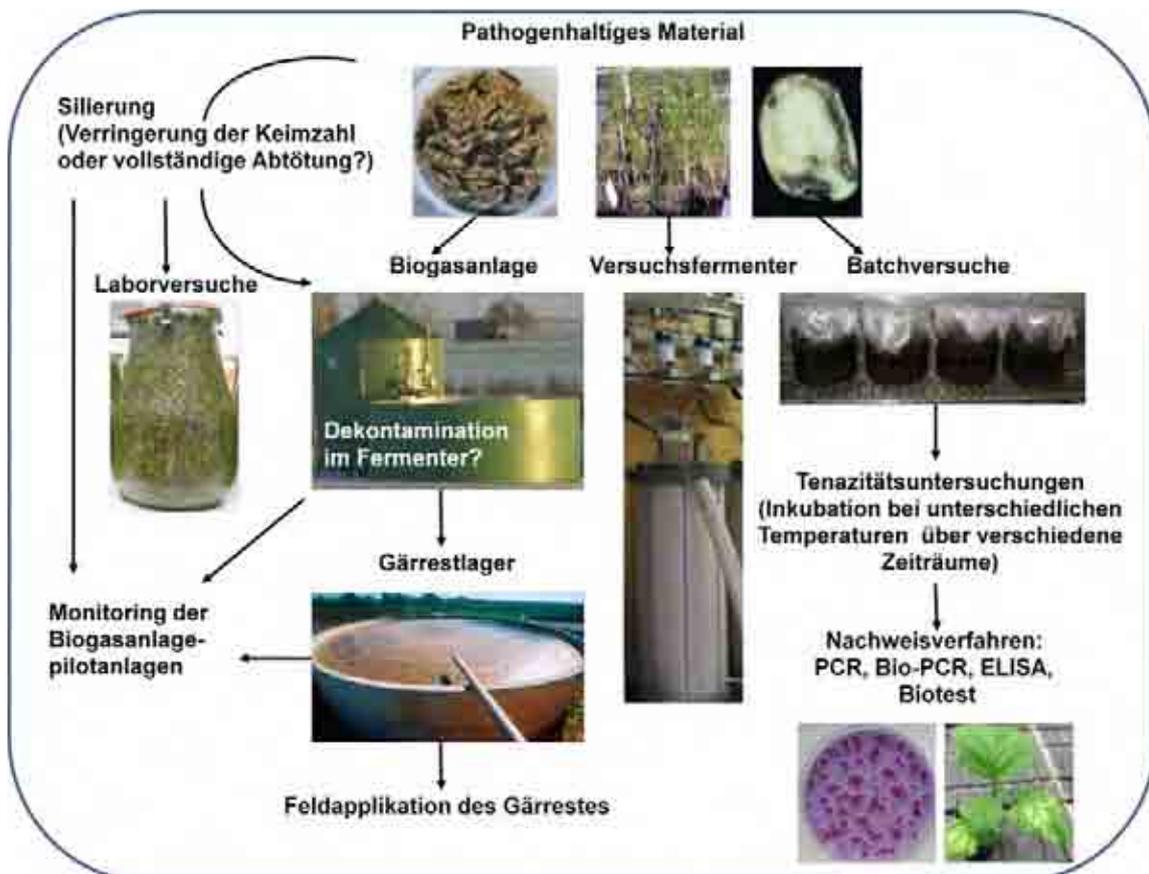


Abb. 2: Schematische Darstellung der Projektarbeiten

Die bearbeiteten Pathogene umfassten alle systematischen Pathogengruppen: Pilze, Bakterien, Viren und Nematoden.

Die Untersuchungen behandelten zum einen die Quarantänekrankheiten der Kartoffel wie die Bakterielle Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Cms), die Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum*, Rs), den Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*, Se) und die Kartoffelzystennematoden (*Globodera pallida*, Gp; *G. rostochiensis*, Gr). Zum anderen wurden aufgrund gehäufter Anfragen aus der Praxis folgende Nicht-Quarantäneschadorganismen berücksichtigt: *Verticillium dahliae* (Vd) und *V. albo-atrum* (Vaa), die Erreger von Welke bei einer Reihe bedeutsamer Kulturen, *Rhizoctonia solani*, Verursacher der Späten Rübenfäule bei Zuckerrübe und der Wurzeltöterkrankheit bei Kartoffel, *Sclerotinia sclerotiorum*, Auslöser von Fäulnis und Krebs z. B. bei Raps, Leguminosen, Sonnenblume, *Fusarium graminearum* (Fg), ein Pilz, der zur Weißährigkeit und Mykotoxinbildung bei Weizen führt, *Ustilago maydis* (Um), verantwortlich für den Maisbeulenbrand, sowie *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Xtg, Erreger der Bakteriellen Gräserwelke). Zudem wurde aus der Gruppe der Viren das Rizomaniavirus (Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV), das die Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe bedingt, und das als sehr persistent bekannte Tabakmosaikvirus (TMV) bearbeitet. Eine komplette Zusammenstellung aller untersuchten Pathogene zeigt

Hervorzuheben ist, dass das oben aufgeführte, untersuchte Erregerspektrum auch die in § 5 Abs. 2 der DüMV genannten pilzlichen Erreger enthielt. Es handelt sich hier speziell um Erreger mit widerstandsfähigen Dauerorganen wie *Synchytrium endobioticum*, *Sclerotinia*-Arten und *Rhizoctonia solani*. Eine Ausnahme dabei bildete lediglich *Plasmodiophora brassicae*, Erreger der Kohlhernie, der aufgrund nicht verfügbaren Untersuchungsmaterials nicht in unsere Studien mit einbezogen werden konnte.

Zusätzlich wurde zur Abschätzung des bestehenden phytosanitären Risikos von Juli 2007 bis September 2008 ein Monitoring in drei unterschiedlichen, bayerischen Biogasproduktionsbetrieben (2 mesophil, 1 thermophil) zur Untersuchung von Substraten, Fermenterhalten und Gärresten auf phytopathogene Pilze durchgeführt.

## 2 Ziele des Projekts

- 1) Abschätzung des Hygienisierungspotenzials des Biogasprozesses unter mesophilen und thermophilen Bedingungen
- 2) Evaluierung des phytosanitären Risikos, welches von der Ausbringung von Gärresten für die Pflanzenproduktion ausgeht
- 3) Erfassung des aktuell bestehenden phytosanitären Risikos durch ein in bayerischen Biogasproduktionsanlagen durchgeführtes Monitoring
- 4) Entwicklung von effizienten Methoden für den Nachweis der Schaderreger, ihrer Lebensfähigkeit und Virulenz in Gärsubstraten und Gärresten als Voraussetzung für die zu bearbeitende Fragestellung

### 3 Material und Methoden

Die Versuche wurden entweder als Fermenterversuche (siehe 3.1) oder als Batchversuche (siehe 3.2) durchgeführt. Zusätzlich wurden für einige Erreger Silierversuche angelegt (siehe 3.3). Die Pathogene wurden entweder in isolierter Form oder über infiziertes Pflanzenmaterial in die Versuche eingeschleust (Abb. 3). Nach definierten Inkubationszeiten wurde die Lebensfähigkeit der Pflanzenpathogene untersucht.

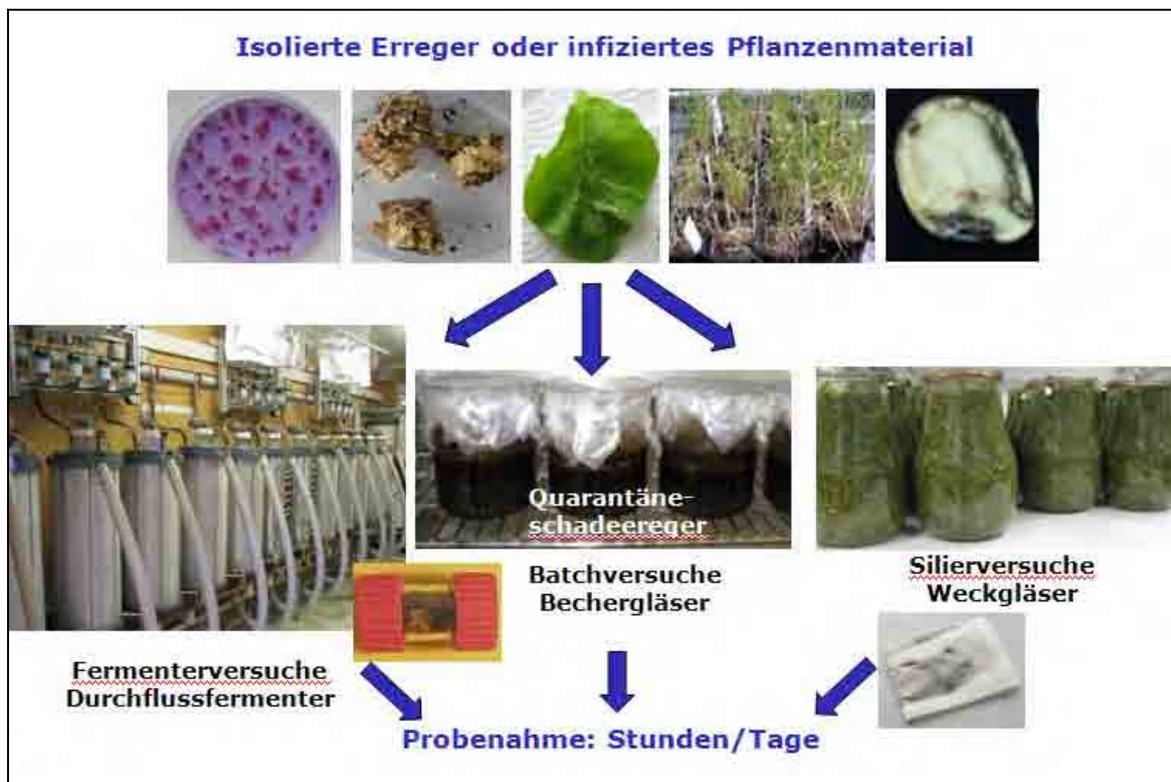


Abb. 3: Übersicht über die Versuchsvarianten Fermenter-, Batch- und Silierversuche

#### 3.1 Fermenterversuche

Zur Untersuchung der Überdauerungsfähigkeit verschiedener Schadorganismen im Biogasprozess wurde pathogenhaltiges Material im Biogasversuchsfermenter unter möglichst praxisnahen Bedingungen fermentiert. Hierfür wurden 36 l-Durchfluss-Versuchsfermenter am Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT) der LfL genutzt, die im mesophilen (ca. 38 °C) bzw. thermophilen (ca. 55 °C) Bereich betrieben wurden. Die Raumbelastung der Fermenter variierte zwischen 0,5 und 2,5 kg Trockenmasse pro Kubikmeter und Tag. Als Substrat dienten vorwiegend Gras- und Maissilage in verschiedenen Anteilen. In die Durchflussfermenter wurden jeweils zwei Keimträger mit einem Fassungsvermögen von ca. 10 ml mit dem zu untersuchenden pathogenhaltigen Material eingeschleust (Abb. 4). Die Pathogene wurden bei Pilzen als Myzel auf Nährmedium, als Sporen oder Sklerotien, im Falle von Nematoden als Zysten oder umgeben von ihrer Wirtspflanze, also im Pflanzengewebe („in planta“), eingebracht. Die Keimträger wurden unterschiedlich lange im Durchflussfermenter belassen und danach für die Analyse lebensfähiger Schaderreger entnommen (siehe Abb. 3).

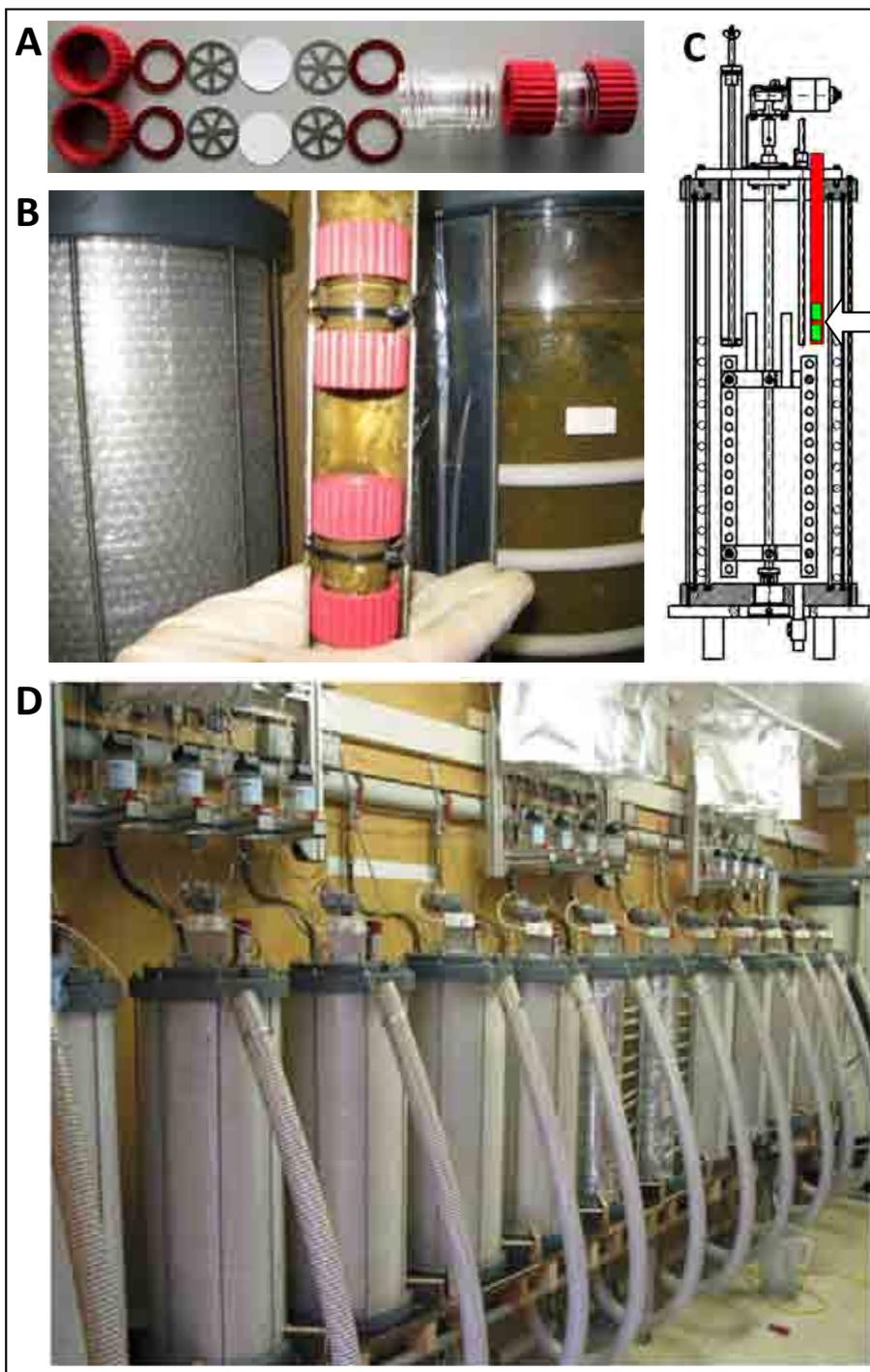


Abb. 4: A) Komponenten eines Diffusionskeimträgers (von links nach rechts); durchbohrte Deckel (rot), Dichtungsringe, Trägerplatte als Unterstützung für die Membran, Celluloseacetatmembran mit einer Porengröße von  $0.8 \mu\text{m}$  zur Rückhaltung der Pathogene, 10-ml-Duranglaszylinder zur Aufnahme des Probenmaterials. B) Zwei in einer Führungsschiene übereinander installierte Keimträger. C) Durchflussfermenter (schematisch) mit Vorrichtung zum Einsetzen der Keimträger (rot), zwei Keimträger (grün, mit Pfeil gekennzeichnet). D) Reihe von 36-l-Durchflussfermentern am Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT)

### 3.2 Laborversuche im Batchverfahren

Laborversuche, die als diskontinuierliche Batchversuche unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, dienten zur gezielten Untersuchung der Überdauerungsfähigkeit der Schadorganismen in Abhängigkeit von Temperatur und Milieu. Batchversuche kamen hauptsächlich für die Quarantäneschadorganismen (QSO) *Ralstonia solanacearum* und *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* zur Anwendung. Damit war sichergestellt, dass diese nicht über die bei den Versuchsfermentern anfallenden Gärreste ausgebracht und in die Umgebung entweichen konnten. Zudem erlaubte das Batchverfahren die Untersuchung größerer Pflanzenorgane (z. B. Kartoffelknollen). Für die Batchversuche wurden infiziertes Pflanzenmaterial oder isolierte Erreger in Laborbechergläsern oder kleineren Probengefäßen (z. B. Reaktionsgefäße) in Gärsubstrat oder Puffer bei definierten Temperaturen meist im Brutschrank oder im ebenfalls temperierbaren Thermomixer inkubiert. Danach wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Probenmaterial für die Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Pathogene entnommen (Abb. 3).

### 3.3 Silierversuche

Um den Einfluss der Silierung auf das Überleben von Pilzen vor der Biogasfermentation zu ermitteln, wurden Silierversuche am Institut für Pflanzenschutz (IPS) wie auch am Institut für Tierernährung (ITE) der LfL in Weckgläsern durchgeführt. Das pathogenhaltige Material wurde dabei in Filtertüten eingeschlossen und diese dann in die Weckglas-Silos eingebracht (Abb. 5). Nach unterschiedlich langer Silierdauer wurde das silierte Material auf Nährmedien ausgelegt und auf überlebende Pathogene untersucht. Bei einigen Experimenten wurden Proben aus dem silierten Material zusätzlich im Versuchsfermenter (siehe 3.1) bzw. Batchversuch (siehe 3.2) inkubiert, um die kombinierte Wirkung von Silierung und Fermentation im Biogasreaktor zu erfassen.



Abb. 5: großes Foto: Weckglassilos mit gehäckseltem Pflanzenmaterial; kleines Foto: Filtertüte mit eingeschlossenem, pathogenhaltigem Pflanzenmaterial

### 3.4 Nachweisverfahren

Zum Nachweis der Pathogene wurden verschiedene Methoden angewandt: mikroskopische, kulturtechnische, biologische, serologische und molekularbiologische Verfahren (Abb. 6, Tab. 2). Für den Nachweis der Erregervitalität, die nicht allein durch serologische oder molekularbiologische Verfahren bestimmt werden kann, wurden stets das Erregerwachstum auf Nährmedien und/oder die Fähigkeit, Wirtspflanzen zu infizieren, miteinbezogen. Im Einzelnen wurden folgende Techniken eingesetzt:

- Kulturverfahren auf Semiselektiv- und Selektiv-Medien für Pilze und Bakterien
- mikroskopische Auswertung nach Wachstum der Erreger, besonders Pilze, auf Nährmedium und Bestimmung aufgrund morphologischer Kriterien
- Immunfluoreszenz (IF)-Test für den Nachweis von *Ralstonia solanacearum*: (ANONYMUS, 2004a), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ANONYMUS, 2006); *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (POSCHENRIEDER, pers. Mitt.)
- Realtime PCR für *R. solanacearum* und *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (SEIGNER et al., 2007; KAEMMERER, 2009)
- Bio-PCR für lebensfähige *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (KAEMMERER, 2009), *R. solanacearum* (SEIGNER, unveröffentlicht)
- klassische, qualitative PCR für den Nachweis bestimmter Bakterien-, Pilz- und Nematodenarten (*R. solanacearum*: ANONYMUS, 2004a; *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*: ANONYMUS, 2006; *Verticillium dahliae*: ASPROMOUGKOS, 2002; *V. albo-atrum*: ANONYMUS, 2007; *X. translucens* pv. *graminis*: MAES et al., 1996; *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*: ANONYMUS, 2004b, KAEMMERER, unveröffentlicht; *Synchytrium endobioticum*: NIEPOLD und STACHEWICZ, 2004; VAN DEN BOOGERT et al., 2005)
- DAS-ELISA (CLARK und ADAMS, 1977) und Fangpflanzentest (SEIGNER, unveröffentlicht; FRIEDRICH et al., 2010) für den Nachweis virulenter Rizomaniaviren
- Biotest zum Nachweis vitaler bzw. pathogener Erreger: *R. solanacearum* (ANONYMUS, 2004a) und *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ANONYMUS, 2006), *S. endobioticum* (ANONYMUS, 2004c), *X. translucens* pv. *graminis* (FRIEDRICH, unveröffentlicht), *Globodera* spp. (ARNDT, 2007), Tabakmosaikvirus (SEIGNER, unveröffentlicht)
- Schlupftest für den Nachweis lebensfähiger *Globodera* spp. (ARNDT, 2007).



Abb. 6: Übersicht über die angewandten Nachweismethoden

### 3.5 Monitoring der Biogaspilotanlagen

Von Juli 2007 bis September 2008 wurde ein Monitoring in drei bayerischen Biogaspilotanlagen durchgeführt. Zwei dieser Praxisanlagen werden mesophil, eine thermophil betrieben. Monatlich wurden Proben aus den eingebrachten Substraten (Gras- und Maissilage, Futterrüben, Körnermais, Hähnchenkot, silierte und unsilierte Zuckerrüben, Getreide), den einzelnen Fermentern und dem Gärrestlager gezogen.

Derzeit wird das Monitoring an zwei anderen Biogasanlagen fortgeführt. Bei diesen Anlagen wird Gärsubstrat aus ökologischer Produktion verwendet, das möglicherweise stärker oder auch mit einem anderen Spektrum an Phytopathogenen belastet sein könnte.

Die einzelnen Proben wurden/werden mit konventionellen Verfahren auf phytopathogene Pilze untersucht und dabei auf semiselektive Nährböden ausgelegt bzw. ausplattiert. Nach ca. 2 Wochen wurde/wird das Wachstum der Pilze mikroskopisch ausgewertet und eine Identifizierung aufgrund morphologischer Parameter vorgenommen.

## 4 Ergebnisse

Die im Batchverfahren an einer Reihe von Erregern (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, *Globodera pallida*, *Globodera rostochiensis*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis*) durchgeführten Untersuchungen zur Analyse des Temperatur- und Milieueinflusses ergaben, dass erwartungsgemäß neben der Verweildauer die Temperatur ein kritischer Faktor bei der Überdauerung der Erreger im Biogasfermenter ist. Darüberhinaus wurde offensichtlich, dass die Temperatursensitivität vom umgebenden Milieu beeinflusst wird. Die Erreger starben in Gärsubstrat bei geringeren Temperaturen und zudem teilweise wesentlich schneller ab als in Puffer oder Wasser. Dort wirkte sich eine Inkubation erst bei 40-45 °C negativ auf die Lebensfähigkeit aus, in Gärsubstrat hingegen bereits ab 35-40 °C. Ab der kritischen Temperatur reduzierte – bei jeweils 10-minütiger Inkubation – eine Erhöhung um 4-8 °C in Wasser oder Puffer die Keimzahl um 90 %, in Gärsubstrat reichten dafür 2-6 °C. Des Weiteren wurde eindeutig festgestellt, dass umgebendes Pflanzenmaterial die Erreger vor den schädigenden Milieueinflüssen schützt.

Da die bei unseren Batchversuchen durchgeführte Inkubation im Gärsubstrat unter mesothermen Bedingungen zu einer Inaktivierung von bestimmten Pathogenen geführt hat (Tab. 2), ist grundsätzlich davon auszugehen, dass unter Praxisbedingungen die Lagerung des Gärrests einen zusätzlichen Beitrag zur Hygienisierung leistet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Erreger detailliert dargestellt.

## 4.1 Lebensfähigkeit der Pathogene im Durchflussfermenter und Batchverfahren

Bei unseren Untersuchungen lagen die Überlebenszeiten der Pathogene zumeist unter den für das jeweilige Substrat angegebenen theoretischen Verweilzeiten in der Biogasanlage. Die meisten Erreger starben innerhalb weniger Stunden bzw. Tage in Gärsubstrat bzw. im Fermenter ab (Tab. 2).

### 4.1.1 Bakterielle Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)

Für den Erreger der Bakteriellen Ringfäule der Kartoffel *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Abb. 7) wurde eine Realtime-Bio-PCR entwickelt, mit der die Untersuchung der Temperaturempfindlichkeit der Bakterien und die Feststellung ihrer Lebensfähigkeit in Gärproben ermöglicht wurde (KAEMMERER, 2009).



Abb. 7: Durchgeschnittene Kartoffelknolle mit Symptomen der Bakteriellen Ringfäule

In Vorversuchen führte eine 2-tägige Inkubation einer in Puffer suspendierten Bakterienreinkultur bei 39 °C bereits zur Abtötung (KAEMMERER, unveröffentlicht). Später wurde die Überlebensfähigkeit des Ringfäuleerregers in Gärsubstrat im Brutschrank (Batchversuch) untersucht. Wurden dabei nun ganze Knollen in Puffer bei 38 °C inkubiert, so überlebten die Bakterien mindestens 7 Tage lang. Dies unterstreicht eindeutig die Schutzwirkung der umgebenden Knolle auf die Bakterien. In Kartoffelstücken, in Gärsubstrat inkubiert, war das Pathogen ebenfalls noch am Versuchsende nach 7 Tagen vital. Unsere jüngsten Versuche über einen verlängerten Zeitraum mit ganzen Knollen in Gärsubstrat zeigten überraschenderweise, dass die Bakterien in ganzen Knollen selbst nach einer Inkubation von 100 Tagen (Versuchsende) im Batchversuch noch vital waren und Symptome im Biotest hervorriefen (Abb. 8).



Abb. 8: Auberginenpflanze circa 2 Wochen nach künstlicher Infektion mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Unter Berücksichtigung der in der Praxis üblichen Retentionszeiten könnte das bedeuten, dass zumindest bei Vergärung nicht zerkleinerter, ganzer Knollen unter Praxisbedingungen im Falle des Ringfäuleerregers eine vollständige Hygienisierung im Biogasfermenter nicht zu erwarten ist. Die vorliegenden Ergebnisse müssten für eine endgültige Risikoabschätzung jedoch noch weiter überprüft werden. Derzeit wird zumindest von einer Entsorgung infizierter ganzer Knollen in Biogasanlagen abgeraten.

#### 4.1.2 Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum*)

In Vorversuchen, in denen ganze Knollen in Wasser inkubiert worden waren, konnten nach 4-tägiger Inkubation bei 39 °C nur noch einzelne lebende Zellen isoliert werden. Daraufhin wurde auch das Überleben von *Ralstonia solanacearum* in Batchversuchen in Gärsubstrat untersucht. Die Bakterien konnten in Kartoffelstückchen eine 4-tägige Inkubation in Gärsubstrat lebend überstehen, hingegen war nach 7 Tagen, anders als bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, dem Ringfäuleerreger (siehe 4.1.1), kein Wachstum mehr feststellbar. Bei Inkubation ganzer Knollen in Gärsubstrat wurde nach 30 Tagen noch Wachstum von *R. solanacearum* auf SMSA-Medium festgestellt; darüber hinaus wurde im Biotest auf Aubergine gezeigt, dass der Erreger mindestens über 14 Tagen hinweg noch pathogen war. Ob ein längeres Überdauern möglich ist, müsste noch abgeklärt werden; Untersuchungen hierzu stehen noch aus. Im Gegensatz zum Gram-positiven Ringfäuleerreger scheint das Gram-negative Bakterium *R. solanacearum* empfindlicher gegenüber den Bedingungen im Gärsubstrat zu reagieren. Trotzdem erscheint es fraglich, ob die praxisüblichen Retentionszeiten im Fermenter im Falle von *R. solanacearum* für eine Hygienisierung ausreichen, zumal es sich hier um einen Quarantäneschadorganismus handelt und demzufolge „Nulltoleranz“ für diesen Erreger gilt.



Abb. 9: Reinkultur von *Ralstonia solanacearum* auf SMSA-Semiselektivmedium

#### 4.1.3 Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*)



Abb. 10: Mit Kartoffelkrebs befallene Kartoffelknolle

In ersten Batchversuchen mit Knollenwucherungen, verursacht durch den als sehr widerstandsfähig geltenden Kartoffelkrebserreger *Synchytrium endobioticum*, wurde in Gärsubstrat schon nach 1-stündiger Inkubation keine Infektiosität des Erregers im Biotest mehr festgestellt. In Fermenterversuchen bei 39 °C mit Knollenwucherungen, eingeschweißt in Gazebriefchen und so in Keimträger eingebracht, erwies sich das Pathogen bei der ersten Probenahme nach 4 Tage im Biotest (ANONYMUS, 2004c) als nicht mehr vital. Diese ersten auf eine relativ rasche Abtötung hindeutenden Ergebnisse gelten jedoch nur mit äußerstem Vorbehalt, da auch in der Positivkontrolle nur eine geringe Erregerpathogenität nachzuweisen war und der zur Feststellung der Vitalität angewandte Biotest demnach keine verlässlichen Aussagen zuließ. Weitere Verbesserungen des Testsystems waren deshalb zwingend notwendig. Zur Überwindung der methodischen Schwierigkeiten kamen DNA-basierte PCR-Verfahren zum Einsatz. Die Erreger-DNA konnte in den Krebswucherungen nach Inkubation im Fermenter bei 38 °C zwar auch nach 21 Tagen noch nachgewiesen werden, was allerdings nur auf die Präsenz des Erregers, nicht aber auf seine Vitalität schließen ließ. Eine Abschätzung der Überdauerungsfähigkeit von *S. endobioticum* war also weder über den Biotest noch über die DNA-basierte PCR möglich. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen die Überdauerungsfähigkeit des Kartoffelkrebserreger mikroskopisch ermittelt: wurden intakte Dauersori im mikroskopischen Präparat gefunden, so war davon auszugehen, dass diese optisch unversehrt erscheinenden Dauersori lebensfähig waren. Auf diesem Wege wurden im Batchverfahren sehr lange Überdauerungszeiten für den Kartoffelkrebserreger festgestellt: selbst nach 137 Tagen (Versuchsende) Inkubation im Gärsubstrat bei 38 °C waren

noch 99 % der Dauersori intakt. Eine Hygienisierung von Kartoffelpartien, die mit dem Quarantäneschaderrger *S. endobioticum* verseucht sind, scheint demnach in Biogasanlagen nicht möglich zu sein.

#### 4.1.4 Kartoffel-Zystennematoden (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*)

Für *Globodera pallida* und *G. rostochiensis* wurde ein GPDH-mRNA-basiertes RT-PCR-Verfahren als hochsensitive Methode zum Nachweis vitaler Nematodeneier, Nematodenlarven und -zysten entwickelt (KAEMMERER, unveröffentlicht), basierend auf Primern, die innerhalb eines Projekts des Departments of Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), UK, erarbeitet wurden (ANONYMUS). Dieses Verfahren wurde in Ergänzung zum Schlupftest (Biotest) angewandt. Nach 5-tägiger Inkubation von Zysten bei 39 °C in Puffer verlief der Schlupftest sowohl bei *G. pallida* als auch bei *G. rostochiensis* negativ. In einem 14-tägigen Fermenterversuch bei 39 °C erbrachte der Schlupftest bei *G. rostochiensis* bereits nach 4 Tagen negative Resultate. Nach 3 Tagen war keine mRNA und bei *G. pallida* weniger mRNA nachweisbar, was auf eine schnelle Abnahme der Vitalität schließen lässt. Es ist davon auszugehen, dass Kartoffelzystennematoden durch den Biogasprozess abgetötet werden, so dass diesbezüglich kein phytosanitäres Risiko besteht.

#### 4.1.5 Ährenfusariose bei Getreide (*Fusarium graminearum*)

Sporen von *Fusarium graminearum* zeigten bei 10-minütiger Inkubation in Puffer zwischen 45 °C und 55 °C eine lineare Abnahme ihrer Lebensfähigkeit. In Gärsubstrat wurden im Batchversuch bei 40 °C nach 10 Minuten erste Sporen abgetötet; die Abnahme der Zahl lebender Sporen erhöhte sich bis 55 °C um das 6-fache im Vergleich zur Puffer-Inkubation. *F. graminearum* zeigte nach Inkubation überwachsener Weizenkörner im Biogasfermenter bei 38 °C schon nach 1 Tag kein Wachstum mehr auf Nährmedium.

#### 4.1.6 Wurzelbärtigkeit (Rizomania) der Zuckerrübe (Beet necrotic yellow vein virus) und dessen Vektorpilz *Polymyxa betae*

Die Untersuchungen zur Persistenz des Rizomaniavirus (Beet necrotic yellow vein virus, BNYYV) und dessen Vektorpilzes *Polymyxa betae* erfolgten nach Inkubation infizierter Zuckerrübenwurzeln im Fermenter bei 38 °C und 55 °C mit ELISA. In einem weiteren Schritt wurden die Proben aus dem Fermenter dann zur Überprüfung der Virulenz von Virus und Vektor im Biotest (Abb. 11) und mit anschließendem ELISA untersucht (FRIEDRICH et al., 2010). Dabei zeigte sich, dass BNYYV nach Fermentation bei 38 °C bis zum Versuchsende nach 36 Tagen eindeutig nachweisbar war (Abb. 12), die Infektiosität hingegen nur über einen Zeitraum von 4 Tagen und zwar lediglich in der Hälfte der untersuchten Proben erhalten blieb; nach 8 Tagen konnten in keiner einzigen Probe mehr pathogene Rizomania-Viren festgestellt werden (Abb. 13). Im Gegensatz zur Inkubation bei 38 °C nahmen die Nachweisbarkeit und Virulenz des BNYYV bzw. des Vektors bei 55 °C viel schneller ab, so dass schon bei der ersten Probenahme nach 4 Tagen Biogasfermentation das Virus nicht mehr nachweisbar war und auch keine Pathogenität mehr festzustellen war. Dies deutet auf einen schnelleren Virusabbau bzw.



Abb. 11: Zuckerrübenpflänzchen, die für den Biotest zum Nachweis der Virulenz des Rizomaniavirus und seines Vektors kultiviert wurden

eine schnellere Inaktivierung des Vektorpilzes bei 55 °C hin und unterstreicht deutlich den Temperatureinfluss auf das Überleben der Erreger im Biogasfermenter.

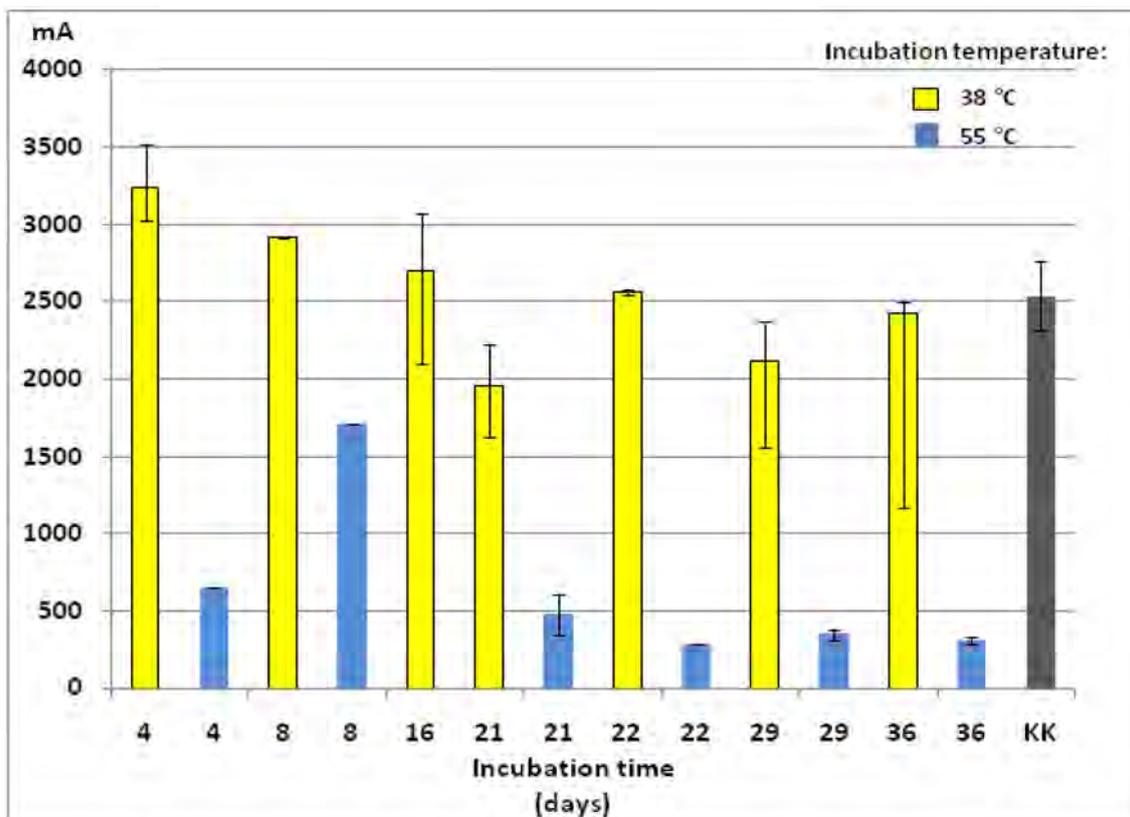


Abb. 12: ELISA-Absorptionswerte (mA) für BNYVV gemessen an Wurzeln von Zuckerrübenpflänzchen direkt nach einer 1 bis 36 Tage andauernden Inkubation im Biogasfermenter bei 38 bzw. 55 °C. Dargestellt sind Ergebnisse aus Versuch 1 (4-22 Tage) und Versuch 2 (21-36 Tage); insgesamt wurden 34 Proben analysiert. Mediane der ELISA-Werte ( $n = 1-5$  in Versuch 1,  $n = 1-4$  in Versuch 2) sind für jeden Probenahmezeitpunkt und beide Temperaturen angegeben. Maxima und Minima der Werte sind als vertikale Balken gezeichnet, mit Ausnahme von Tag 4/55 °C, Tag 8 und Tag 22/55 °C: hier stand jeweils nur ein Diffusionskeimträger (= 1 Probe) zur Verfügung. Für den Tag 16/55 °C liegt wegen eines technischen Defekts des entsprechenden Biogasfermenters kein Ergebnis vor. KK: Positivkontrolle für den ELISA (Abb. entnommen Friedrich et al, 2010)

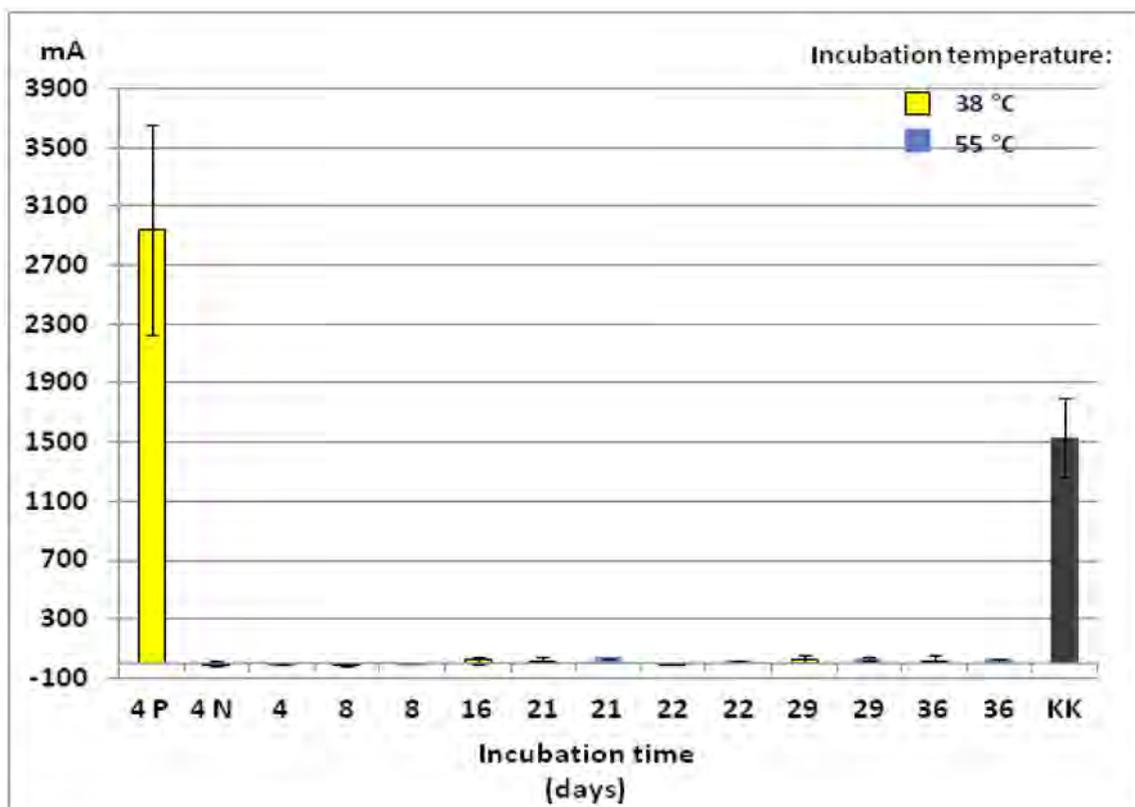


Abb. 13: ELISA-Absorptionswerte (mA) für BNYVV gemessen an Wurzeln von Zuckerrübenpflänzchen nach dem Biotest. Der Biotest wurde mit Zuckerrübenwurzeln durchgeführt, die vorher 1 bis 36 Tage im Biogasfermenter bei 38 bzw. 55 °C inkubiert worden waren. Dargestellt sind die Ergebnisse aus Versuch 1 (4-22 Tage) und Versuch 2 (21-36 Tage); insgesamt wurden 34 Proben analysiert. Die Angaben für Mediane, Maxima und Minima der ELISA-Werte sind vergleichbar mit Abb. 12. P: Mediane der positiven Proben; N: Mediane der negativen Proben; KK: Positivkontrolle für den Biotest (Abb. entnommen Friedrich et al., 2010)

#### 4.1.7 *Verticillium dahliae* und *Verticillium albo-atrum*

##### 4.1.7.1 Überdauerung von *Verticillium*-Myzel im Biogasfermenter

*Verticillium dahliae* und *V. albo-atrum* wurden als Myzel auf Agar im Fermenter bei 38 °C inkubiert. *V. dahliae* war bis zu 8 Tage lebensfähig, *V. albo-atrum* bis zu 13 Tagen. Während einer 7-tägigen Inkubation im Fermenter bei 55 °C konnte zu keinem Probenahmezeitpunkt weder bei *V. dahliae* noch bei *V. albo-atrum* Lebensfähigkeit nachgewiesen werden.

##### 4.1.7.2 Überdauerung von *Verticillium* an Hopfen im Silo bzw. Fermenter/Gärsubstrat

Mit *Verticillium*-belastete Hopfenreben stellen ein Risiko für die Hopfenproduktion dar, wenn sie wieder auf Produktionsflächen ausgebracht werden. Die Vergärung von Hopfen in Biogasanlagen könnte hier zu einer Lösung beitragen, sofern gesichert ist, dass auf diesem Weg eine Hygienisierung erreicht werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurden *Verticillium albo-atrum*-infizierte Hopfenstrünke entweder direkt in Diffusionskeimträgern in Biogasfermenter eingeschleust oder davor in Weckglassilos siliert (Abb. 14). Zu Versuchsbeginn wurden in den nicht silierten Hopfenstrünken eindeutig lebensfähige *Verticillien* nach Kultur auf Nährmedium gefunden. Auch nach 2-wöchiger Silierung wurde ein Überleben von *V. albo-atrum* festgestellt. Folgte der 2-wöchigen Silierung indes eine 4- oder 8-wöchige Biogasfermentation, so konnten keine lebensfähigen *Verticillien* mehr isoliert werden. Nach 8-wöchiger Inkubation in Gärsubstrat ohne vorherige Silierung war *V. albo-atrum* auf Nährmedium noch nachweisbar, wenn auch das Pilzwachstum in diesem Fall nur sehr schwach und auf je einen ausgelegten Strunk begrenzt war. Zu allen weiteren Probenahmezeitpunkten (Silierdauer 4-19 Wochen) wurden keine lebensfähigen *Verticillien* mehr gefunden, weder direkt nach der Silierung noch nach Inkubation im Fermenter (Tab. 1). Die nur in begrenztem Umfang durchgeführten Untersuchungen lassen keine detaillierten Aussagen zum Überdauern von *Verticillium* sp. zu, dennoch kann festgehalten werden, dass für eine erfolgreiche Hygienisierung von Hopfen eine mehrwöchige Silierung und Fermentation in der Biogasanlage zu kombinieren sind. Die Beantwortung der Frage, ob tatsächlich eine vollkommene Hygienisierung erreicht werden kann, wenn große Mengen an infizierten Hopfen in eine Biogasanlage gelangen, bleibt weiteren Studien vorbehalten. Hierbei ist zu bedenken, dass Hopfeninhaltsstoffe möglicherweise die mikrobiellen Stoffwechselprozesse in einem Fermenter negativ beeinflussen und so den Hygienisierungsprozessen abträglich sind.



Abb. 14: Weckglassilos mit Hopfenhäckselgut; *Verticillium*-infizierte Hopfenstrünke wurden eingeschlossen in Filterbeuteln (kleines Bild) in die Weckglassilos eingebracht

Tab. 1: Zusammenstellung der Ergebnisse der *Verticillium*-Untersuchungen an Hopfen

Silierdauer	Auslegen auf Nährmedium nach Silierung	Auslegen auf Nährmedium nach Inkubation im Fermenter/Gärsubstrat			
		4 Wochen Inkubation		8 Wochen Inkubation	
		Fermenter	Gärsubstrat	Fermenter	Gärsubstrat
<b>Woche 0</b>	Wachstum	n.d.	kein Wachstum	n.d.	geringes Wachstum
<b>Woche 2</b>	Wachstum	kein Wachstum	kein Wachstum	kein Wachstum	kein Wachstum
<b>Woche 4</b>	kein Wachstum	n.d.	kein Wachstum	n.d.	n.d.
<b>Woche 6</b>	kein Wachstum	kein Wachstum	n.d.	kein Wachstum (2 Wochen inkubiert)	n.d.
<b>Woche 9</b>	kein Wachstum	Silo 1 + 2: kein Wachstum	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Woche 11</b>	kein Wachstum	Silo 1 + 2: kein Wachstum (6 Wochen inkubiert)	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Woche 13</b>	kein Wachstum	kein Wachstum	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Woche 17</b>	kein Wachstum	kein Wachstum	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Woche 19</b>	kein Wachstum	kein Wachstum	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführte Analyse

Die Arbeiten zu *Verticillium* an Hopfen wurden zusätzlich von der Erzeugergemeinschaft Hopfen HVG e.G. finanziell gefördert.

#### 4.1.8 Tabakmosaik (Tabakmosaikvirus)

Das Tabakmosaikvirus (TMV) gehört zu den Tobamoviren, die bekanntermaßen sehr persistent sind. TMV wird deshalb auch als Testorganismus bei der direkten Prozessprüfung im Rahmen der Bioabfallverordnung eingesetzt. In unseren Untersuchungen wurden mit TMV infizierte Tabakblätter im Batchverfahren bei 38 °C bis zu 78 Tage inkubiert und danach sowohl die Anwesenheit des Virus mit ELISA als auch dessen Pathogenität im Biotest überprüft (Abb. 15). TMV wurde auch am Versuchsende nach 78 Tagen eindeutig nachgewiesen. Auch die Virulenz ging während der Inkubation im Gärsubstrat nicht verloren.

Abb. 15: Abreiben der zu untersuchenden Probe auf Tabak-Testpflanzen (oben); mit TMV infizierte Blätter von Testpflanzen (unten)



#### 4.1.9 Bakterielle Gräserwelke (*Xanthomonas translucens* pv. *graminis*)



Abb. 16: Mit *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* infizierte Weidelgräser

*Xanthomonas translucens* pv. *graminis* ist der Erreger der Bakteriellen Gräserwelke (Abb. 16). In Vorversuchen zeigte das Pathogen bereits nach 3-tägiger Inkubation bei 38 °C in Gärsubstrat (Batchversuch) kein Wachstum mehr auf Medium. Hingegen war *X. translucens* pv. *graminis* nach Inkubation von infiziertem Weidelgras im Fermenter bei 38 °C bis 50 Tage lebensfähig. Allerdings erwies sich der Erreger im Biotest auf Weidelgras nur innerhalb der ersten 6 Tage der Inkubation im Fermenter als infektiös. Dies dürfte allerdings eher auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen sein als auf den tatsächlichen Verlust der Virulenz.

#### 4.2 Silierversuche mit *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Rhizoctonia solani*

Um den Einfluss der Silierung auf das Überleben verschiedener phytopathogener Pilze zu untersuchen, wurde ein 90-tägiger Silierversuch bei 25 °C angelegt, in dem mit *Fusarium graminearum* überwachsene Weizenkörner wie auch Sklerotien (Dauerorgane) von *Sclerotinia sclerotiorum* und *Rhizoctonia solani* zusammen mit Mais in Weckgläsern siliert wurden. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach Wachstum auf Nährmedium. Dabei konnte nur bei *S. sclerotiorum* nach 2 Tagen geringes Wachstum festgestellt werden, bei *F. graminearum* und *Rh. solani* war kein Wachstum mehr nachweisbar.

Zu den Silierversuchen mit *Verticillium*-infiziertem Hopfen siehe 4.1.7.2

### 4.3 Übersichtstabelle zur Überdauerung der Phytopathogene

Tab. 2: Zusammenfassung der bearbeiteten Phytopathogene, der Methoden und Ergebnisse

Erreger	Krankheit	Kultur	Nachweismethode , Vitalitätsnachweis	untersuchtes Material	Lebensfähigkeit in Gärsubstrat bzw. Silage
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Bakterielle Ringfäule	Kartoffel, Tomate	PCR, Realtime-PCR, Wachstum auf NCP-88-Medium + Bio-PCR	ganze Knolle	mindestens 100 d bei 38 °C (Batchverfahren)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Schleimkrankheit	Kartoffel, Tomate	PCR, Realtime-PCR, Wachstum auf SMSA-Medium + Bio-PCR	ganze Knolle	mindestens 30 d bei 38 °C (Batchverfahren)
<i>Synchytrium endobioticum</i>	Kartoffelkrebs	Kartoffel	Mikroskopie, DNA-basierte PCR, Biotest	Krebswucherungen	nach 137 d: 99 % intakte Dauersori bei 38 °C (Batchverfahren)
<i>Globodera pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i>	Kartoffel-Zystennematoden	Kartoffel	PCR, Mikroskopie, Schlupffest, Fangpflanzentest, GPDH-mRNA-Nachweis	Zysten	4 d bei 38 °C (Durchflussfermenter)
<i>Microdochium nivale</i>	Schneeschimmel	Getreide, Gräser,	Mikroskopie, Wachstum auf Antibiotika-Medium	überwachsene Weizenkörner	8 h bei 38 °C (Durchflussfermenter)
<i>Fusarium graminearum</i>	Ährenfusariose, Taubährigkeit (Mykotoxinbildung)	Getreide, Gräser, Mais	Mikroskopie, PCR, Realtime-PCR, Wachstum auf Antibiotika-Medium	überwachsene Weizenkörner	1 d bei 38 °C (Durchflussfermenter); Silierversuch bei 25 °C: nach 2 d kein Überleben
Beet necrotic yellow vein virus, <i>Polymyxa betae</i>	Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe	Zuckerrübe	ELISA, Mikroskopie, ELISA nach Fangpflanzentest	Wurzeln	4 d bei 38 °C, nach 8 d bei 38 °C kein Überleben (Durchflussfermenter); nach 4 d bei 55 °C: kein Überleben (Durchflussfermenter)
<i>Verticillium dahliae</i> (Vd), <i>Verticillium albo-atrum</i> (Vaa)	<i>Verticillium</i> -Welke	Dikotylen, u. a. Solanaceen, Hopfen	Mikroskopie, Wachstum auf Biomalz-Agar, PCR	Myzel auf Agar, Hopfenreben	isoliertes Myzel: 8 d (Vd), 13 d (Vaa) bei 38 °C, bei 55 °C: kein Überleben (Durchflussfermenter); Hopfen - schwarzes Myzel: 8 Wochen Überleben im Gärsubstrat ohne vorherige Silierung; 2 Wochen Silierung und anschließende mindestens 4 Wochen Biogasfermentation: kein Überleben
<i>Ustilago maydis</i>	Maisbeulenbrand	Mais	Mikroskopie, Wachstum auf Antibiotika-Wasseragar	Sporen	1 d bei 38°C (Durchflussfermenter)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Fäule, Krebs	Raps, Leguminosen, Sonnenblume etc.	Mikroskopie, Wachstum auf Antibiotika-Biomalz-Medium	Sklerotien (Dauerkörper)	8 h bei 38 °C (Durchflussfermenter); Silierversuch bei 25 °C: 2 d
<i>Rhizoctonia solani</i>	Späte Rübenfäule, Wurzeltöterkrankheit	Zuckerrübe, Kartoffel, Mais	Mikroskopie, Wachstum auf Antibiotika-Medium	Sklerotien (Dauerkörper)	8 h bei 38 °C (Durchflussfermenter); Silierversuch 25 °C: kein Überleben nach 2d
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	Bakterielle Gräserwelke	Gräser	Wachstum auf XTS-Medium, PCR, Biotest	Weidelgras, isolierte Bakterien	Weidelgras: mindestens 50 d vital im Gärsubstrat bei 39 °C
<i>Tabakmosaikvirus</i>	Mosaikbildung	Solanaceen	Biotest und ELISA	infizierte Blätter	mindestens 71 d (Batchverfahren)

d = Tage, h = Stunden

## 4.4 Monitoring der Biogaspilotanlagen

Das im Juli 2007 bis September 2008 durchgeführte Monitoring in 3 bayerischen Biogaspilotanlagen (2 mesophil, 1 thermophil) konzentrierte sich auf die Pilze. Der Grund hierfür ist, dass Pilze die auf den Gärsubstraten dominierenden Schaderreger sind und deshalb bei der Untersuchung von Substraten, Fermenterhaltenen und Gärückständen aus Praxisanlagen am ehesten die Chance besteht, Pilze im Labor nachzuweisen.

Seit November 2009 wird das Monitoring an zwei anderen Biogasanlagen fortgeführt, bei denen Substrate aus ökologischer Produktion verwendet werden.

### 4.4.1 Methodik

Die Untersuchung der Proben aus den Praxisbiogasanlagen auf phytopathogene Pilze erfolgte mittels Plattentest (Malzextraktagar und Antibiotika-haltige Nährmedien) und einer Filtrationsmethode zum speziellen Nachweis von Brandsporen.

Folgende Biogassubstrate wurden untersucht: Silagen (Mais, Roggen, Weizen, Weidelgras, Gras, Zuckerrüben, Ganzpflanzensilage), Futterrüben, Körnermais, Getreide, Zuckerrüben, Hähnchenkot/-mist.

Neben den Silos wurden die Vorgruben (Hydrolyse-Stufe), Fermenter, Nachgärer und die Gärreste im Endlager beprobt.

### 4.4.2 Monitoring-Ergebnisse

Weder in Proben aus Substraten noch aus Fermentern und Gärrestlagern wurden phytopathogene Pilze in nennenswertem Umfang nachgewiesen. In geringem Maße wurden in Substratproben Arten von *Alternaria*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Tilletia* und *Ustilago* entdeckt. In erster Linie traten als reine Saprophyten und Schimmelpilze einzustufende Organismen auf (z.B. Hefen, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*). In den Fermenterproben war insgesamt ein deutlich geringeres Pilzwachstum als in Substratproben festzustellen. Dies gilt vor allem für die aus dem Nachgärer bzw. Endlager gezogenen Proben, in denen z. T. kein Pilzwachstum mehr zu verzeichnen war. Unterschiede zwischen meso- und thermophiler Fermenterführung wurden nicht beobachtet.

Auch das Monitoring der Biogasanlagen machte deutlich, dass eine vorhergehende Silierung wesentlich zur Hygienisierung beiträgt. Der Ausschluss von Sauerstoff ist dabei jedoch essentiell, um eine Verpilzung der Silage zu vermeiden (Abb. 17).



Abb. 17: Proben aus einer Silage auf Nähragar: starke Verpilzung bei Sauerstoffzufuhr (links) bzw. keine Verpilzung bei Sauerstoffausschluss (rechts) während der Silierung

Derzeit arbeitet die Arbeitsgruppe IPS 2a (Mykologie) in Kooperation mit dem ILT und Biogasanlagenbetreibern an einer Fortsetzung des Monitorings. Beprobt werden bis auf Weiteres zwei Biogasanlagen, die ökologisch erzeugte Gärsubstrate einsetzen. Die bisher erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ähnlich den Verhältnissen bei „konventionell“ betriebenen Anlagen durch den Silier- bzw. Fermentationsprozess eine deutliche Re-

duktion der pilzlichen Belastung erreicht wird. Dies gilt auch, wenn z.B. unsilierte, stärker mit Fusarien oder Schneeschimmel befallene Getreidekörner bzw. Getreideschrot in die Biogasanlagen gelangen. Nach der Fermentation sind diese Pathogene nicht mehr nachweisbar. Generell treten – wenn überhaupt – lediglich saprophytische Pilze auf, die keine Schäden an Pflanzen verursachen.

## 5 Diskussion

Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Biogasfermentation zu einer Reduktion der Keimbelastung und zu einer Hygienisierung der Gärsubstrate führt bzw. beiträgt. Dabei reichen unter den anaeroben Bedingungen im Biogasfermenter nicht nur rein thermophile Verhältnisse, sondern bereits Temperaturen um die 38 °C (mesophiler Bereich) aus, um eine Reihe bedeutsamer Pflanzenpathogene abzutöten. Allerdings muss dabei eine gewisse minimale Verweildauer im Fermenter gewährleistet sein.

Erwartungsgemäß beeinflussen nicht nur die Temperatur und die Verweildauer des Substrats im Fermenter, sondern auch das umgebende Milieu das Überdauerungsvermögen von Schaderregern. Diese drei Parameter sind, neben der Widerstandsfähigkeit des Erregers selbst, als kritische Größen für eine Hygienisierung in der Biogasanlage zu betrachten. Die Ergebnisse aus unseren Untersuchungen mit den Erregern der Bakteriellen Ringfäule und Schleimkrankheit der Kartoffel deuten darauf hin, dass eine Zerkleinerung des Pflanzenmaterials vor der Vergärung im Biogasfermenter für eine Hygienisierung förderlich ist. Zudem trägt eine vorherige Silierung unter optimalen Bedingungen zu einer wesentlichen Reduktion der Keimbelastung des Inputmaterials bei und unterstützt dadurch die weitere Hygienisierung im Biogasfermenter.

Es ist davon auszugehen, dass die Inaktivierung von Pathogenen während des Biogasprozesses nicht allein als Temperatureffekt zu bewerten ist, da es bereits im mesothermen Bereich zu einer Abtötung von Keimen kam. Vielmehr ist die Inaktivierung von Schaderregern vermutlich auf einen Synergismus schädigender Einflussgrößen zurückzuführen: erhöhte Temperatur, Anaerobiosis, mikrobieller Antagonismus und proteolytischer Abbau durch die Begleitflora, niedriger pH-Wert als Folge der Säureproduktion, schädliche Abbauprodukte und toxische Substanzen, die während der anaeroben Fermentation frei werden (BOLLEN und VOLKER, 1996; FRAUZ et al., 2006).

Die Inaktivierung von Schadorganismen im mesothermen Bereich ist von besonderer Relevanz für die meisten bayerischen Biogasanlagenbetreiber. So kam eine im Jahr 2006 durchgeführte Studie des Instituts für Ländliche Strukturentwicklung, Betriebswirtschaft und Agrarinformatik (ILB) der LfL zu der Aussage, dass der Großteil, nämlich circa 75 % aller Biogasanlagen in Bayern, bei Temperaturen im mesothermen Bereich zwischen 36 und 45 °C betrieben werden. Nur 10 % der Anlagen laufen zwischen 46 und 50 °C, lediglich 10 % unter echten thermophilen Bedingungen zwischen 51 und 60 °C. Einschränkend ist jedoch darauf hinzuweisen, dass in der Praxis mesotherme Anlagen den Temperaturbereich zwischen 30 und 42 °C (ANONYMUS, 2007) umfassen; da unsere Studien bei Temperaturen um 38 °C durchgeführt wurden, können für mesotherme Anlagen, die im unteren Temperaturbereich laufen, keine Schlüsse hinsichtlich einer Hygienisierung gezogen werden.

Für den Großteil der bearbeiteten Pathogene wurden bei 38 °C Überdauerungszeiten zwischen 8 Stunden und 7 Tagen ermittelt. Hervorzuheben sind hierbei besonders die nur kurze Zeit überlebenden Kartoffelzystennematoden *Globodera pallida* und *G. rostochiensis*, die beide als Quarantäneschaderreger eingestuft sind, und die in der Dün-

gemittelverordnung (DüMV) gelisteten Pilze *Sclerotinia sclerotiorum* und *Rhizoctonia solani*. Selbst bei mesothermen Versuchsbedingungen liegen unseren Untersuchungen zufolge die Überlebenszeiten bei den meisten Erregern unter den für Substrate angegebenen durchschnittlichen theoretischen Verweilzeiten in Biogasanlagen. Diese werden für thermophil betriebene Anlagen mit 15-20 Tagen und speziell für mesotherm geführte Biogasanlagen mit 30-40 Tagen beziffert (ANONYMUS, 2007). Unsere Erkenntnisse bestätigen die wenigen, für anaerobe Fermentation in der Literatur vorliegenden kurzen Überdauerungszeiten. Beispielsweise erbrachten Untersuchungen der Universität Hohenheim (FRAUZ et al., 2006) ähnliche Erkenntnisse: *Fusarium culmorum*, ein Pilz an Getreide, wird im Biogasfermenter sowohl bei 37 °C als auch bei 53 °C schon nach 12 Stunden inaktiviert. Für diese innerhalb weniger Stunden oder Tage abgetöteten Erreger kann die Biogasfermentation als Hygienisierungsmaßnahme angesehen werden.

Bemerkenswert ist, dass zwar ein Großteil, aber nicht alle von uns untersuchten Erreger während der Biogasfermentation innerhalb kurzer Zeit inaktiviert wurden. Die Überdauerungsfähigkeit der Pathogene ist demnach differenziert zu beurteilen. Bestimmte Schadorganismen sind in der Lage, den anaeroben Fermentationsprozess über einen längeren Zeitraum zu überstehen, so z. B. der Quarantäneschadorganismus (QSO) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Erreger der Bakteriellen Ringfäule der Kartoffel. Nachdem schon WIEDEMANN und ENDERLEIN (2005) in ihren Studien zur „Phytohygiene von Kartoffelabfällen“ ein immerhin 4-wöchiges Überdauern des Ringfäuleerregers bei mesothermer Fermenterführung belegen konnten, zeigten unsere Untersuchungen, dass dieser in ganzen Knollen mindestens 100 Tage im Gärsubstrat unter Beibehaltung seiner Virulenz überleben kann. Dagegen fanden LIEBE et al. (2010) für *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* eine vergleichsweise kurze Überdauerungszeit: der Erreger überlebte zwar eine 6- und 24-stündige Fermenterinkubation, war aber bereits nach 138 Stunden nicht mehr lebensfähig. Möglicherweise spielen bei der Überdauerung des Ringfäuleerregers der Grad der Zerkleinerung der Kartoffelknollen wie auch die Fermentationsbedingungen selbst eine wesentliche Rolle. Diese Fragestellung gilt es noch weiter abzuklären. Ungewiss ist ferner, ob *Ralstonia solanacearum*, ein QSO, der die Schleimkrankheit der Kartoffel verursacht, in mesothermen Anlagen sicher abgetötet wird, da auch hier ein relativ langes Überleben von 30 Tagen in ganzen Knollen im Gärsubstrat festzustellen war. Des Weiteren zählt der Kartoffelkrebserreger zu diesen „robusten“ Erregern: seine Dauersori waren selbst nach einer 139 Tage dauernden Inkubation im Gärsubstrat unter mesothermen Bedingungen noch intakt. Als weitere Beispiele für persistente Erreger können *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*, Auslöser der Bakteriellen Gräserwelke, *Verticillium albo-atrum*, Verursacher der Hopfenwelke, angeführt werden sowie das Tabakmosaikvirus, ein Vertreter der thermoresistenten Viren, welche in § 5 Abs. 2 DüMV genannt sind. Diese Erreger überdauerten im mesothermen Temperaturbereich im Gärsubstrat mindestens 35-70 Tage. Betrachtet man die in der Praxis üblichen Verweilzeiten von Gärsubstraten im Fermenter, so besteht beim Ausbringen des Gärrests auf Produktionsflächen für diese über längere Zeit persistierenden Pathogene durchaus ein Verschleppungsrisiko. Dieses ist insbesondere im Falle der QSO, für die „Nulltoleranz“ gilt, von praktischer Relevanz. Da die Gefahr für eine „Aufschaukelung“ von Krankheiten auf den entsprechenden Produktionsflächen jedoch grundsätzlich nicht allein vom Ausbringen belasteter Gärreste abhängt, sondern auch von der Fruchtfolge, der Persistenz eines Erregers im Boden und vor allen Dingen auch davon, ob ein Erreger tatsächlich über den Boden Infektionen auszulösen vermag, kann eine endgültige Abschätzung des phytopathogenen Risikos nur erregerbezogen unter Berücksichtigung aller genannten Einflussgrößen erfolgen.

Besteht ein tatsächliches phytosanitäres Risiko, so gibt die Bioabfallverordnung konkrete Hinweise zu Hygienisierungsmaßnahmen: Einhaltung einer Mindesttemperatur von 55 °C über einen zusammenhängenden Zeitraum von 24 Stunden sowie eine hydraulische Verweilzeit von mindestens 20 Tagen. Bei niedrigeren Betriebstemperaturen oder kürzerer Verweilzeit ist für eine Hygienisierung entweder eine thermische Vorbehandlung oder Nachbehandlung des Materials (Erhitzung auf 70 °C; 1 Stunde) bzw. eine aerobe Nachrotte (Kompostierung) erforderlich. Eine Kompostierung mit anschließender aerober Nachrotte scheint im Gegensatz zur Biogasfermentation auch hinsichtlich thermoresistenter Viren eine (gewisse) Entseuchung zu bewirken (IDELMANN 2005).

### **Biogasanlagen-Monitoring**

Einen alternativen Ansatz zur Abschätzung des von Biogasanlagen ausgehenden phytosanitären Risikos bieten Monitoring-Programme. Im Rahmen des von uns durchgeführten Biogasanlagen-Monitorings wurden aus einer Reihe von Pilotbetrieben im Rahmen des "Aktionsprogramms Biogas in Bayern" zunächst für den Zeitraum von Juli 2007 bis September 2008 drei Biogaspilotanlagen ausgewählt. Da weder in den Inputmaterialien noch in den Gärresten dieser Pilotanlagen – unabhängig davon, in welchem Temperaturbereich sie betrieben wurden – phytopathogene Pilze in nennenswertem Umfang gefunden wurden, scheint zumindest im Hinblick auf die Verbreitung von Pilzkrankheiten in der Praxis keine Gefahr zu bestehen.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse aus dem derzeit laufenden Monitoring von zwei Biogasanlagen, die mit ökologisch erzeugten Gärsubstraten betrieben werden, deuten auf ähnliche Verhältnisse hin, wie sie für „konventionell“ betriebene Anlagen beschrieben wurden.

### **Bewertung der Projektergebnisse**

Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass die Vergärung im Biogasreaktor zu einer Reduktion der Keimbelastung des Gärsubstrats führt. Eine vollständige Beurteilung des Hygienisierungspotenzials des Biogasprozesses aufgrund der vorliegenden Projektergebnisse ist jedoch nicht möglich, da Aussagen lediglich für das im Rahmen des Projekts bearbeitete Erregerspektrum getroffen werden können. Zum Teil sind auch dabei noch Fragen offen, da in den Fermenterversuchen die in Praxisbiogasanlagen herrschenden Fermentationsbedingungen zwar bestmöglich simuliert wurden, eine Übertragung auf „echte“ Praxisverhältnisse aber nur bedingt möglich ist. Die Ergebnisse aus unseren Batchversuchen gelten mit Vorbehalt, da davon auszugehen ist, dass bei der Inkubation im Gärsubstrat keine mit der Vergärung im Biogasreaktor vergleichbare Fermentation stattgefunden hat. Allerdings bilden die Batchversuche zumindest das „Worst-Case-Szenario“ einer schlecht verlaufenden Fermentation in einem Biogasfermenter ab und lassen somit sehr wohl Rückschlüsse auf Phytohygienierisiken bei unzureichender Vergärung zu. Gerade im Hinblick auf QSO, für die „Nulltoleranz“ gilt, ist das Verschleppungsrisiko auch für nicht optimal ablaufende Vergärungsprozesse abzuschätzen, so dass dieses „Worst-Case-Szenario“ durchaus praktische Bedeutung besitzt.

Um die bisherigen Ergebnisse untermauern bzw. die Aussagen verallgemeinern zu können, sind zusätzliche Untersuchungen mit z. B. veränderten Gärsubstraten und Substratgemischen, anderen Raumbelastungen der Fermenter, ausgedehnten Temperaturbereichen und weiteren Pathogenen notwendig. Zudem könnte eine Fortsetzung des Monitorings in der Praxis betriebener Biogasanlagen einen bedeutsamen Beitrag zur Abschätzung des von der Gärrestausrückführung ausgehenden Phytohygienierisikos leisten. Für eine umfassende Risikobeurteilung wäre dabei eine Ausdehnung des Monitorings auf weitere Anlagen und

Anlagentypen mit unterschiedlichsten Inputmaterialien über einen verlängerten Zeitraum unter Einbeziehung pflanzen-, tier- und humanpathogener Keime anzustreben.

## 6 Zusammenfassung

Die Biogastechnologie hat sowohl in ökologischer Hinsicht durch die Nutzung erneuerbarer Energieträger als auch in ökonomischer Hinsicht durch die Verwertung biologischer Reststoffe und Abfälle aus Landwirtschaft, Gartenbau und Industrie große Bedeutung. Zudem könnten hochgradig mit Phytopathogenen infizierte und damit nicht mehr vermarktungsfähige Befallspartien nutzbringend in Biogasanlagen entsorgt werden, wenn eine Verschleppung der Erreger über Gärrückstände ausgeschlossen werden kann. Daher wurde im Rahmen dieses Projektes das Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses evaluiert, um das phytosanitäre Risiko durch das Ausbringen von Gärresten und die damit verbundene Gefahr der „Aufschaukelung“ der Konzentration bestimmter Erreger auf den Produktionsflächen abschätzen zu können. Zu diesem Zweck wurden zunächst effiziente Methoden für den Nachweis und die Feststellung der Lebensfähigkeit und Pathogenität verschiedener Schaderreger in Gärsubstraten und Gärresten entwickelt. Die Untersuchungen erfolgten an den Quarantäneschadern der Kartoffel *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Erreger der Bakteriellen Ringfäule), *Ralstonia solanacearum* (Erreger der Schleimkrankheit), *Synchytrium endobioticum* (Kartoffelkrebserreger) und den Kartoffelzystennematoden (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*). Aufgrund gehäufte Anfragen aus der Praxis wurden weitere Nicht-Quarantäneschadorganismen in das Projekt aufgenommen. Diese umfassten u. a. die Welkepilze *Verticillium dahliae* und *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, den mykotoxinbildenden Pilz *Fusarium graminearum*, den Erreger der Bakteriellen Gräserwelke *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*, das Rizomaniavirus der Zuckerrübe und das temperaturresistente Tabakmosaikvirus. Zusätzlich wurde von Juli 2007 bis September 2008 ein Monitoring dreier unterschiedlicher, bayerischer Biogaspilotbetriebe zur Untersuchung von Substraten, Fermenterhalten und Gärresten auf phytopathogene Pilze durchgeführt.

Unsere Ergebnisse belegen, dass die Biogasfermentation selbst bei mesothermen Temperaturbedingungen ( $\geq 38$  °C) zu einer Hygienisierung der Inputmaterialien beiträgt. Außerdem zeigte sich, dass neben der Temperatur und der Verweilzeit des Substrats im Biogasfermenter erwartungsgemäß das umgebende Milieu die Überlebensfähigkeit der Schadorganismen beeinflusst. Erreger in Pflanzenmaterial überlebten länger als isolierte Erreger. Durch eine Zerkleinerung des infizierten Pflanzenmaterials konnte eine schnellere Inaktivierung der Keime erreicht werden. Eine der Biogasfermentation vorausgehende Silierung unter Optimalbedingungen wirkte sich vorteilhaft auf die Hygienisierung aus. Die Überlebensdauer der Pathogene lag zumeist unter den für Biogasanlagen angegebenen theoretischen Substratverweilzeiten im Fermenter. Der größte Teil der bisher untersuchten Erreger starb innerhalb weniger Stunden bzw. Tage in Gärsubstrat bzw. im Fermenter ab. Dies galt insbesondere auch für zwei untersuchte Quarantäneschadorganismen, nämlich die Kartoffelzystennematoden *Globodera pallida* und *G. rostochiensis*, sowie für die in der Düngemittelverordnung genannten Pilze *Sclerotinia sclerotiorum* und *Rhizoctonia solani*. Als kritisch erwiesen sich indes die Quarantäneschaderreger *Synchytrium endobioticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* sowie *Verticillium albo-atrum*, *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* und das Tabakmosaikvirus, die mehrere Wochen bis Monate überdauerten.

Im Monitoring der Biogasilotbetriebe konnten bislang weder in Substraten noch in Fermentern oder Gärresten phytopathogene Pilze in nennenswertem Umfang nachgewiesen werden.

### Fazit

Die Vergärung im Biogasreaktor führt zu einer Reduktion der Keimbelastung des Gärsubstrats. Die Gefahr, dass ein Schaderreger überlebt, hängt vom Erreger selbst, den Fermentationsbedingungen, der Temperaturführung und Verweilzeit des Gärsubstrats im Biogasreaktor ab: Je höher die Temperatur und je länger die Verweilzeit, desto geringer das Risiko der Überdauerung. Eine Reihe von weit verbreiteten Schaderregern wird selbst bei mesothermer Vergärung innerhalb weniger Stunden oder Tage abgetötet. Wenn praxisübliche Verweilzeiten von wenigstens 30-40 Tagen bei Fermentertemperaturen von mindestens 38 °C eingehalten werden, so besteht bei diesen Erregern kein phytosanitäres Risiko.

Zu den überdauerungsfähigen Keimen, die ein Phytohygienierisiko darstellen und bei denen eine zusätzliche Hygienisierungsmaßnahme notwendig ist bzw. sein kann, zählen nach heutigem Wissen die Erreger der Hopfenwelke und der Bakteriellen Gräserwelke wie auch thermoresistente Viren. Sehr kritisch zu bewerten sind Partien, die mit Quarantäneschadorganismen kontaminiert sind, insbesondere weil für diese Schaderreger „Nulltoleranz“ gilt. Die Maßnahmen für die Entsorgung dieser Partien werden in jedem Fall vom amtlichen Pflanzenschutzdienst vorgeschrieben und kontrolliert. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann aus unserer Sicht für die Erreger des Kartoffelkrebses, der Bakteriellen Ringfäule wie auch der Schleimkrankheit der Kartoffel die mesotherme Biogasfermentation nicht als Maßnahme zur Hygienisierung angesehen werden.

## 7 Summary

The biogas technology is of great ecological and economical importance by using renewable resources for energy production and by offering the chance for recycling biological residues and waste from agriculture, horticulture and industry. The possible disposal of highly infected, non marketable field crops and plant material provides an additional advantage, if any spread of pathogens with the fermentation residue can be excluded. Therefore the hygienisation potential of the biogas process was evaluated within this project to assess the risk resulting from the deployment of fermentation residues and the possible enrichment of pathogens on production sites. For this purpose, efficient methods to detect the relevant pathogens and especially to prove their viability and pathogenicity in fermentation substrates and residues were developed. The investigations comprised the quarantine diseases of potato, like bacterial ring rot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), potato brown rot (*Ralstonia solanacearum*), potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) and potato cyst nematodes (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*). Because of increasing requests from practice, non-quarantine pathogens were included in our project. These covered e. g. *Verticillium* wilt (*V. dahliae*, *V. albo-atrum*), *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, the mycotoxin producing fungus *Fusarium graminearum*, the bacterial wilt in forage grasses caused by *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*, rhizomania virus of sugar beet and the thermoresistant Tobacco mosaic virus. In addition, a monitoring of three different Bavarian biogas plants was conducted from July 2007 to September 2008 to analyse substrates, contents of biogas fermenters and fermentation residues for phytopathogenic fungi.

Our results demonstrate clearly that biogas fermentation contributes to hygienisation of the input material even under mesophilic conditions ( $\geq 38$  °C). Besides temperature and

retention time of the input material in the fermenter, the surrounding milieu represents a major impact factor for the survival of the pathogens in the biogas reactor. Pathogens situated in plant material showed a longer persistence compared to pathogens isolated from surrounding host tissue. Chopping and shredding of infested plant material lead to enhanced pathogen inactivation. Ensilaging prior to biogas fermentation favoured the hygienisation process. In most cases, the survival time of pathogens was shorter than the theoretical retention time for substrate in the fermenter. Most of the pathogens incubated in fermentation substrate or in the fermenter died within a few hours or days. This was also true for two quarantine pests, i.e. the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*, and even for the fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* which are listed in the “German Düngemittelverordnung”. In contrast to this, *Synchytrium endobioticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*, *Verticillium albo-atrum* and Tobacco mosaic virus showed survival times exceeding several weeks or months.

Within the monitoring of biogas plants, phytopathogenic fungi could not be detected in considerable amount, neither in substrates nor in fermenter contents or fermentation residues.

### Conclusions

Biogas fermentation leads to a reduction of pathogen contamination of the input material. The risk for pathogen survival depends from the pathogen itself, fermentation conditions and temperature as well as substrate retention time in the fermenter: the higher temperature and the longer retention time, the lower the risk. A range of important pathogens is inactivated even under mesothermal fermentation conditions within a few hours or days. For these pathogens, keeping retention times being common practice, i.e. a minimum of 30-40 days at fermentation temperatures equal or higher than 38 °C there is no phytohygienic risk.

Pathogens provoking a phytosanitary risk which require or may require further hygienization measures are *Verticillium* wilt of hops, bacterial wilt of grasses and thermoresistant viruses. A special risk is associated with plant material contaminated with quarantine organisms, especially because there is a “zero tolerance” for these pathogens. In all these cases, disposal measures are regulated and controlled by the official plant health bodies. At the moment for *Synchytrium endobioticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum*, the causing agents of potato wart, bacterial ring and brown rot of potato, mesothermal biogas fermentation is not to be considered as a hygienisation measure.

## 8 Eigene Publikationen

Folgende Publikationen wurden im Rahmen des vorgelegten Projektes angefertigt:

FRIEDRICH, R., D. KAEMMERER, P. BÜTTNER, L. SEIGNER, 2009: Evaluierung des Hygienisierungspotenzials des Biogasprozesses im Hinblick auf phytopathogene Schadereger. In: Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, Erding 02.-04.12.09, ISSN 1611-4159, Tagungsband 2, 255-266

FRIEDRICH, R., D. KAEMMERER, L. SEIGNER, 2010: Manche Erreger bleiben lange vital. Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt 18, 28-31

FRIEDRICH, R., KAEMMERER, D., SEIGNER, L. (2010): Investigation of the persistence of Beet necrotic yellow vein virus in rootlets of sugar beet during biogas fermentation. J. Plant Dis. Protect. 117(4), 150–155

KAEMMERER, D. (2008): Schneller Tod im Fermenter. Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt 8, 46-47

KAEMMERER, D. (2009): Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in digester material after heat treatment by TaqMan®BIO-PCR. J. Plant Dis. Protect. 116(1), 10–16

## 9 Literaturverzeichnis

ANONYMUS: Development of a robust assay to estimate the viability of potato cyst nematodes *Globodera* spp., URL:

[http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=HP0143\\_3834\\_FRP.doc](http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=HP0143_3834_FRP.doc) [Stand: September 2010]

ANONYMUS (2004a): *Ralstonia solanacearum*. EPPO Bulletin 34, 173 –178

ANONYMUS (2004b): *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin 34, 155 –157

ANONYMUS (2004c): *Synchytrium endobioticum*. EPPO Bulletin 34, 213-218

ANONYMUS (2006): *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. EPPO Bulletin 36, 99-109

ANONYMUS (2007): *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. EPPO Bulletin 37, 528-535

ANONYMUS, 2007: Biogashandbuch Bayern – Materialienband - Kap. 1.1-1.5, Bayer. Landesamt für Umwelt (eds.), Stand Juli 2007, Augsburg, URL:

<http://www.lfu.bayern.de/abfall/fachinformationen/biogashandbuch/index.htm>, [Stand: September 2010]

ARNDT, M. (2007): Vergleich von Nachweismethoden für Kartoffelzystennematoden (*Globodera* spp.) im Hinblick auf eine Qualitätssicherung von Diagnosen geregelter Schadorganismen. Gesunde Pflanzen 59(2), 67-70

ASPROMOUGKOS I. (2002): Quantifizierung der DNA von *Verticillium dahliae* in planta mittels kompetitiver PCR und HPLC. Diss., Giessen

- BOLLEN, G. J., D. VOLKER, 1996: Phytohygienic aspects of composting. In: de Bertoldi, M., P. Sequi, B. Lemmes, T. Papi: The science of composting 1, 223-246. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34, 475-483
- FRAUZ, B. (2006): Untersuchung zur Inaktivierung von Fusariensporen und zur Reduzierung von Deoxynivalenol in Weizen bei dessen Vergärung in landwirtschaftlichen Flüssig- und Trockenfermentierungsanlagen. Abschlussbericht zum Projekt mit Förderkennzeichen 22015903. URL: <http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/berichte/22015903.pdf> [Stand: September 2010]
- IDELMANN, M. (2005): Hygienisierung von Kompost. Dissertation Universität Kassel, Fachbereich Bauingenieurwesen
- LIEBE, S., MÜLLER, P., BANDTE, M., HEIERMANN, M., BÜTTNER C. (2010): Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in der anaeroben Vergärung. Julius-Kühn-Archiv 428, 289-290
- MAES M., GARBEVA P., KAMOEN O. (1996): Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. Techniques 86(1), 63-69
- NIEPOLD F., STACHEWICZ H. (2004): PCR-detection of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.. Zeitschr. für Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz 111(4), 313-321
- PHILIPP W., PIETSCH, M. (2008): Phyto- und Seuchenhygiene bei der Biogaseerzeugung. Mais 3(35), 95-97
- SEIGNER, L., KAEMMERER, D, KAPPEN, M (2007): Realtime-PCR zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* - Grundlagen, Methode und praktische Hinweise. Gesunde Pflanzen 59, 101-106
- STEINMÖLLER, S., BÜTTNER, C., MÜLLER, P., BECKERS F. (2004): Bewertung des Risikos der Verschleppung von Quarantäne-Schadorganismen mit Abfällen aus kartoffelverarbeitenden Betrieben und praktische Bedeutung. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft 396, 343
- VAN DEN BOOGERT P.H.J.F., VAN GENT-PELZER M.P.E., BONANTS P.J.M., DE BOER S.H., WANDER J.G.N., LEVESQUE C.A., VAN L G.C.M., BAAYEN R.P. (2005): Development of PCR-based detection methods for the quarantine phytopathogen *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease. Europ. Journal of Plant Pathol. 113, 47-57
- WIEDEMANN W., ENDERLEIN, O. (2005): Zur Phytohygiene von Kartoffelabfällen. Kartoffelbau 9/10/2005 (56. Jg.), 400-402