



**LfL**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft



**Verhalten von EHEC und  
krankheitserregenden Clostridien in  
Biogasanlagen  
Abschlussbericht**

Bianca Frösche  
Dr. Ute Messelhäuser  
Dr. Michael Lebuhn  
Prof. Dr. Christiane Höller



---

## **Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben**

# **Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen**

Auftraggeber: Bayerisches Staatsministerium für Ernährung,  
Landwirtschaft und Forsten  
Ludwigstr. 2  
86179 München

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und  
Verbraucherschutz  
Rosenkavalierplatz 2  
81925 München

Auftragsdatum: 01.11.2011

Auftrags-Nr. (LfL): N/11/30

Auftrags-Nr. (LGL): 47c-G7131-2011/19-8/11-28

Projektleitung LfL: Dr. Michael Lebuhn

Projektleitung LGL: Prof. Dr. Christiane Höller

Bearbeiter LfL: Bianca Fröschle (LfL)  
Elena Madge-Pimentel (LfL)

Bearbeiter LGL: Dr. Ute Messelhäuser  
Renate Zucker

Berichtsabschluss: 31.01.2015

Berichtsumfang: 129 Seiten

---

**Impressum:**

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)  
Lange Point 6  
85354 Freising-Weihenstephan  
Internet: <http://www.LfL.bayern.de>

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)  
Veterinärstraße 2  
85764 Oberschleißheim  
Internet: <http://www.lgl.bayern.de>

Redaktion: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft,  
Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen  
Lange Point 6, 85354 Freising  
E-Mail: [AQU@LfL.bayern.de](mailto:AQU@LfL.bayern.de)  
Tel.: 08161/71-3600

Januar 2015

AQU © LfL

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>13</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>17</b>
<b>Summary .....</b>	<b>19</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>21</b>
1.1 Beschreibung der untersuchten Erreger.....	21
1.1.1 Krankheitserregende <i>Escherichia coli</i> .....	21
1.1.2 <i>Clostridium botulinum</i> / Botulinum-Neurotoxin-bildende Clostridien .....	22
1.1.3 Weitere pathogene Clostridien .....	24
1.2 Stand des Wissens: Vorkommen der untersuchten Krankheitserreger in Biogasanlagen.....	25
1.2.1 Vorkommen und Verhalten von EHEC in Biogasanlagen.....	27
1.2.2 Vorkommen und Verhalten pathogener Clostridien in Biogasanlagen.....	27
1.3 Zielstellung .....	28
1.3.1 Screening in bayerischen Demonstrationsbiogasanlagen.....	28
1.3.2 Screening in veterinär-/abfallrechtlich überwachten Biogasanlagen .....	29
1.3.3 Keimträgerversuche in Labor-Biogasanlagen .....	29
1.3.4 Kalkulation der Erreger-Reduktion im Modell ein- und mehrstufiger ideal, gleichmäßig durchmischter Durchflussreaktoren .....	29
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.1 Prozessdaten und Substratzusammensetzung der untersuchten bayerischen Pilot-Biogasanlagen.....	31
2.1.1 Screening der gesamten Prozesskette ausgewählter Biogas-Anlagen.....	31
2.1.2 Screening weiterer Proben aus Biogasanlagen.....	32
2.2 Kultivierungsverfahren für Bakterien.....	33
2.2.1 Kultivierungsverfahren für STEC/ EHEC/ EPEC.....	33
2.2.2 Kultivierungsverfahren für <i>Clostridium botulinum</i> .....	35
2.2.3 Quantifizierung von EHEC bzw. <i>C. botulinum</i> über ein MPN-Verfahren....	36
2.2.4 Getrennter Nachweis von vegetativen Zellen und Sporen bei <i>C. botulinum</i> .....	37
2.2.5 Kultivierungsverfahren für weitere pathogene Clostridien .....	37
2.3 Aufbereitung der Kulturen für die qPCR.....	39
2.4 DNA-Extraktion.....	39
2.5 Nachweis der Bakterien durch qPCR .....	40
2.5.1 qPCR-Systeme zum Nachweis der Gruppe der STEC/ EHEC/ EPEC.....	40

2.5.1.1	Multiplex-qPCR-System zum Nachweis der Toxin-Gene ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> ), des Intimin-Gens ( <i>eae</i> ) und einer internen Amplifikationskontrolle ( <i>uidA</i> ) [LGL].....	40
2.5.1.2	Abwandlungen des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis der Toxin-Gene ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> ), des Intimin-Gens ( <i>eae</i> ) und einer internen Amplifikationskontrolle ( <i>uidA</i> ) [LfL].....	41
2.5.1.3	Singleplex-qPCR-System zum Nachweis von Enterohämolysin ( <i>Ehly</i> ) [LfL].....	41
2.5.2	qPCR-Systeme für <i>Clostridium botulinum</i> .....	47
2.5.2.1	Multiplex-qPCR-System zum Nachweis der Botulinum-Neurotoxin-Gene ( <i>bont</i> ), Typ A, B, C, D, E und F [LGL].....	47
2.5.2.2	Abwandlungen des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis der Botulinum-Neurotoxin-Gene ( <i>bont</i> ), Typ A, B, C, D, E und F [LfL] ..	47
2.5.2.3	Singleplex-qPCR-System zum Nachweis des Gens <i>ntnh</i> [LfL] .....	48
2.5.3	qPCR-Systeme für weitere pathogene Clostridien.....	49
2.5.3.1	Multiplex-qPCR-System zum Nachweis von <i>C. difficile</i> , <i>C. chauvoei</i> , <i>C. haemolyticum</i> und <i>C. septicum</i> [LGL].....	49
2.5.3.2	Singleplex-qPCR-System zum Nachweis von <i>C. difficile</i> (Triocephosphat-Isomerase; <i>tpi</i> ) [LfL].....	50
2.5.3.3	qPCR-System zum Nachweis von <i>C. novyi</i> [LGL].....	50
2.5.3.4	qPCR-System zum Nachweis von <i>C. perfringens</i> [LGL].....	51
2.6	Keimträgerversuche in Labor-Biogasanlagen .....	53
2.6.1	Betrieb der Labor-Biogasanlagen.....	53
2.6.2	Versuchsaufbau der Keimträgerversuche.....	54
2.6.3	Keimträgerversuche mit EHEC/ EPEC.....	55
2.6.4	Keimträgerversuche mit <i>Clostridium botulinum</i> .....	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>59</b>
3.1	Screening in bayerischen Demonstrationsbiogasanlagen.....	59
3.1.1	Untersuchungen zur Anwesenheit von STEC/ EHEC/ EPEC.....	59
3.1.1.1	Screening in unterschiedlichen Probenmatrices ausgewählter Biogasanlagen auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC [LfL + LGL] ..	59
3.1.1.1.1	Screening der gesamten Prozesskette ausgewählter Biogasanlagen auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC [LfL + LGL] .....	61
3.1.1.1.2	Screening von Einzelproben aus Biogasanlagen auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC [LfL + LGL] .....	63
3.1.1.2	Vergleich der Ergebnisse LfL - LGL des Screenings auf EHEC.....	64
3.1.1.3	Screening der Proben auf die Anwesenheit von EPEC [LfL].....	66
3.1.1.4	Verteilung der Genmarker <i>stx1</i> , <i>stx2</i> und <i>eae</i> in der Gesamtheit der untersuchten Proben (LfL) .....	67

---

3.1.2	Untersuchungen zur Anwesenheit von <i>C. botulinum</i> [LfL + LGL] .....	69
3.1.3	Untersuchungen zur Anwesenheit weiterer pathogener Clostridien .....	71
3.1.3.1	Screening der Proben aus Praxisanlagen auf die Anwesenheit von <i>C. perfringens</i> .....	72
3.1.3.2	Screening der Proben aus Praxisanlagen auf die Anwesenheit von <i>C. novyi</i> .....	72
3.1.3.3	Screening der Proben aus Praxisanlagen auf die Anwesenheit von <i>C. difficile</i> .....	73
3.1.3.4	Screening der Proben aus Praxisanlagen auf Anwesenheit von <i>C. haemolyticum</i> , <i>C. septicum</i> und <i>C. chauvoei</i> .....	73
3.2	Screening in veterinär-/abfallrechtlich überwachten Biogasanlagen.....	74
3.3	Keimträgerversuche in Labor-Biogasanlagen .....	74
3.3.1	Betriebsdaten der Labor-Biogasanlagen .....	74
3.3.1.1	Substrat-Variante M1 .....	74
3.3.1.2	Substrat-Variante T1 .....	77
3.3.1.3	Substrat-Variante T2 .....	79
3.3.2	Keimträgerversuche mit EPEC .....	79
3.3.2.1	Vorversuch: Anzucht des Inokulums für die Keimträgerversuche mit EPEC .....	79
3.3.2.2	Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei mesophiler Gärtemperatur (38°C).....	80
3.3.2.3	Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei thermophiler Gärtemperatur (55°C).....	83
3.3.2.4	Reduktion von EPEC (Stamm LGL 38122) in ein- und mehrstufigen ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktoren .....	84
3.3.3	Keimträgerversuche mit <i>Clostridium botulinum</i> .....	85
3.3.3.1	Vorversuche zur Methodik-Etablierung: Anzucht des Inokulums, quantitative Analyse und getrennter Nachweis von vegetativen Zellen und Sporen .....	85
3.3.3.1.1	Anzucht des Inokulums .....	85
3.3.3.1.2	Quantifizierung des Keimträgerinhalts.....	86
3.3.3.1.3	Vergleich der Quantifizierungsergebnisse aus TPGY-Kultur (Methode d), von EiL-Agar und von Blut-Agar.....	88
3.3.3.2	Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> (Stamm LGL E2625) bei mesophiler Gärtemperatur (38°C).....	89
3.3.3.2.1	Entwicklung der Gesamtkeimzahlen .....	90
3.3.3.2.2	Entwicklung der vegetativen Zellen und der Sporen.....	91
3.3.3.2.3	Gegenüberstellung der Keimreduktion und der Ammoniak-Gehalte .....	92

3.3.3.2.4	Vergleich mit den Ergebnissen der mesophilen Keimträgerversuche mit EPEC:.....	93
3.3.3.3	Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> (Stamm LGL E2625) bei thermophiler Gärtemperatur (55°C).....	93
3.3.3.3.1	Entwicklung der Gesamtkeimzahlen: .....	93
3.3.3.3.2	Entwicklung der vegetativen Zellen und der Sporen: .....	95
3.3.3.4	Reduktion von <i>C. botulinum</i> (Stamm LGL E2625) in ein- und mehrstufigen ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktoren..	95
3.3.3.5	Diskussion: Verhalten von <i>C. botulinum</i> (Stamm LGL E2625) im Biogasprozess.....	96
<b>4</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>97</b>
<b>5</b>	<b>Weiterführende Arbeiten .....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>115</b>
8.1	Anhang 1: Detaillierte Ergebnisse des Screenings .....	115
8.2	Anhang 2: Abstract Fröschle und Lebuhn (2014) .....	119
8.3	Anhang 3: Posterpräsentation Fröschle und Lebuhn (2014) .....	121
8.4	Anhang 4: Abstract Fröschle et al. (2014a) .....	122
8.5	Anhang 5: Abstract Fröschle et al. (2014b).....	125
8.6	Anhang 6: Posterpräsentation Fröschle et al. (2014).....	127
8.7	Anhang 7: Abstract Messelhäusser et al. (2014) .....	128



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Substratzusammensetzung der untersuchten Biogasanlagen .....	32
Abbildung 2 Kultivierungsablauf für STEC/ EHEC/ EPEC (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05).....	34
Abbildung 3 Kultivierungsverfahren für <i>C. botulinum</i> (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26:1988-12 bzw. DIN 10102:1988-06 (D) bzw. ISO/TS 17919:2013) .....	35
Abbildung 4: Übersicht über das kombinierte kulturelle und molekularbiologische Nachweisverfahren für verschiedene, potentiell human- und tierpathogene <i>Clostridium</i> spp.; * Fortführung nur bei positivem qPCR-Ergebnis .....	39
Abbildung 5: Fermenter im Labormaßstab .....	53
Abbildung 6: Aufbau (A, B) und Position (C) der Keimträger (A) und des Keimträgerrohrs (B) im Labor-Fermenter (C).....	55
Abbildung 7: EHEC-Nachweisraten – Überblick aller Screening-Ergebnisse (Prozessketten und Einzelproben) .....	60
Abbildung 8: EHEC-Nachweisraten im Screening der gesamten Prozessketten.....	61
Abbildung 9: Nachweis von EHEC in weiteren Einzelproben aus Biogasanlagen .....	64
Abbildung 10: Verhältnis der Einstufungen als EHEC und EPEC in den Substrat-, Gärgemisch- und Gärprodukt-Proben aus Biogasanlagen [LfL].....	66
Abbildung 11: Nachweisrate der einzelnen Genmarker in 112 untersuchten Proben [LfL] .....	68
Abbildung 12: Nachweisrate der Genmarker-Kombinationen aus <i>stx1</i> , <i>stx2</i> und <i>eae</i> in 112 untersuchten Proben [LfL].....	69
Abbildung 13: Häufigkeit des Nachweises der pathogenen <i>Clostridium</i> spp. und analysierte Probenanzahl (pSub: Substrat pflanzlicher Herkunft, tSub: Substrat tierischer Herkunft, FI: Fermenterinhalt aus dem Hauptfermenter, GP: Gärprodukt aus dem Fermenter nachgeschalteten Prozessstufen).....	70
Abbildung 14: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt der Fermenter E1, E2 und E3(Substrat-Variante M1; Phase 1: Feb. 2013 – Jun. 2013); blaue bzw. lila Felder: Keimträgerversuche mit EPEC bzw. <i>C. botulinum</i> .....	75
Abbildung 15: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt des Fermenters E3 (Substrat-Variante M1; Phase 2: Jul. 2013 – Dez. 2013); lila Felder: Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> .....	76
Abbildung 16: Gemessene Ammonium- und daraus berechnete Ammoniak-Stickstoffgehalte der Fermenter E1, E2 und E3 für die Substrat-Variante M1 .....	76
Abbildung 17: FOS/TAC und Säurekonzentrationen der Fermenter E1, E2 und E3 für die Substrat-Variante M1 .....	77

Abbildung 18: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt der Fermenter BM1 und BM2 (Substrat-Variante T1); orangefarbene bzw. rote Kästen: Keimträgerversuche mit EPEC bzw. <i>C. botulinum</i> .....	78
Abbildung 19: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt der Fermenter E1 und E2 (Substrat-Variante T2); orangefarbene bzw. rote Kästen: Keimträgerversuche mit EPEC bzw. <i>C. botulinum</i> .....	79
Abbildung 20: Zellzahl zweier EPEC-Stämme nach 3 - 5 h Inkubationszeit durch Ausplattierung und Zählung auf MH- und Endo-Agar .....	80
Abbildung 21: Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei 38°C .....	81
Abbildung 22: Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei 55°C .....	83
Abbildung 23: Reduktion von EPEC (Stamm LGL 38122) in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) in einem ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktor.....	85
Abbildung 24: Vergleich der Quantifizierungsergebnisse im Keimträgerinhalt der Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 (n.b.: nicht bestimmt).....	87
Abbildung 25: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Kultivierungs-MPN aus der TPGY-Kultur und der Kultivierung auf EiL- und Blut-Agarplatten (1: KT38-240912, 2: KT38-120313, 3-8: KT38-100613; TPGY, EiL, Blut: s. 2.2.2, Abbildung 3).....	88
Abbildung 26: Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 bei 38°C – Gesamtkeimzahlen (vegetative Zellen + Sporen).....	90
Abbildung 27: Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 bei 38°C – Vegetative Zellen und Sporen.....	92
Abbildung 28: Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 bei 55°C – Gesamtkeimzahlen.....	93
Abbildung 29: Keimträgerversuche mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 bei 55°C – Vegetative Zellen und Sporen.....	94
Abbildung 30: Reduktion von <i>C. botulinum</i> (Stamm LGL E2625) in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) in einem ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktor.....	95

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physiologische Gruppen von <i>C. botulinum</i> .....	23
Tabelle 2: Übersicht über die veterinärmedizinisch relevanten <i>Clostridium</i> spp. (nach Selbitz, 2010).....	24
Tabelle 3: Prozessdaten zu den untersuchten Biogasanlagen.....	31
Tabelle 4: Substratspektrum und Probenherkunft der Einzelproben aus Biogasanlagen...	33
Tabelle 5: Rezeptur des modifizierten Tryptose-Soja-Bouillon (mTSB; nach: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05).....	34
Tabelle 6: Rezeptur des TPGY-Bouillon (nach: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26:1988-12 bzw. DIN 10102:1988-06 (D) bzw. ISO/TS 17919:2013).....	36
Tabelle 7: Bebrütung der weiteren <i>Clostridium</i> spp. ....	38
Tabelle 8: qPCR-Reaktionsbedingungen der Nachweissysteme für STEC/ EHEC/ EPEC und <i>C. botulinum</i> der LfL .....	43
Tabelle 9: qPCR-Nachweissysteme für STEC/ EHEC/ EPEC.....	44
Tabelle 10: qPCR-Nachweissysteme für <i>C. botulinum</i> (Teil I: Nachweis der Gene <i>ntnh</i> , <i>bont/A</i> , <i>bont/B</i> , <i>bont/E</i> und <i>bont/F</i> ).....	45
Tabelle 11: qPCR-Nachweissysteme für <i>C. botulinum</i> (Teil II: Nachweis der Gene <i>bont/C</i> und <i>bont/D</i> ).....	46
Tabelle 12: Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis von <i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. haemolyticum</i> und <i>C. difficile</i> .....	49
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des <i>tpi</i> -Gens von <i>C. difficile</i> .....	50
Tabelle 14: Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis und die Differenzierung von <i>C. novyi</i> .....	51
Tabelle 15: Sequenzen der Primer und Sonden zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i> (u. a. Messelhäuser et al., 2007b).....	52
Tabelle 16: Substrat-Varianten: Prozessparameter und Verhältnis von Grassilage zu Maissilage im Substratmix .....	54
Tabelle 17: TS-, oTS- und FFS-Gehalt der eingesetzten Substrate .....	54
Tabelle 18: Liste der Keimträger-Experimente mit EPEC LGL 38122.....	56
Tabelle 19: Liste der Keimträger-Experimente mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 .....	57
Tabelle 20: Einstufung der untersuchten Proben anhand der Toxine <i>stx1</i> und <i>stx2</i> und des Pathogenitätsfaktors <i>eae</i> . (Die Farbgebung wurde in den folgenden Abbildungen beibehalten.) .....	59
Tabelle 21: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse des Screenings auf EHEC in drei Prozessketten aus Praxisbiogasanlagen .....	63

Tabelle 22: Vergleich der EHEC-Einstufungen bei Doppelbestimmungen im Screening.	64
Tabelle 23: Vergleich der Ergebnisse für <i>stx1</i> bzw. <i>stx2</i> bei Doppelbestimmungen im Screening .....	66
Tabelle 24: Gemittelte Ergebnisse der Laborparameter für Substrat-Variante T1 und T2	78
Tabelle 25: Keimzahlen, Reduktion und Ammoniak-Stickstoffgehalte der Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 .....	82
Tabelle 26: Ergebnisse der Zählung des Wachstums von 100 µL Inokulum der Vorversuche auf EiL- bzw. Blut-Agar .....	86
Tabelle 27: Keimzahlen, Reduktion und Ammoniak-Stickstoffgehalte in den Keimträgerversuchen mit <i>C. botulinum</i> LGL E2625 .....	91

---

## Abkürzungsverzeichnis

AQU	Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
BGA	Biogasanlage
BHQ	Black Hole Quencher <sup>®</sup>
CCM	Corn-Cob-Mix
deg	degeneriert
D-Wert	Dezimale Reduktionszeit
E	Endlager
<i>Ehly</i>	Enterohämolysin-Gen
EHLy	Enterohämolysin-Agar
EiL	Eigelb-Laktose-Agar
Endo	Endo-Agar
F	(Haupt-) Fermenter
FFS	Flüchtige Fettsäuren
FI	Fermenterinhalt
FM	Frischmasse
FOS	Flüchtige organische Säuren
fw	forward
Ge	Getreide
GeSc	Getreideschrot
GMi	Geflügelmist
GP	Gärprodukt aus dem Fermenter nachgeschalteten Prozessstufen
GPS	Ganzpflanzensilage
GS	Grassilage
Gü	Gülle
HüMi	Geflügelmist, Hühnermist
IAC	internal amplification control, Interne Amplifikationskontrolle, auch „IPC“
ILT	Institut für Landtechnik und Tierhaltung
IPC	siehe „IAC“
KBE	Kolonie-bildende Einheiten (engl.: cfu)
KT	Keimträger
KT38	Keimträgerversuch bei mesophiler Gärtemperatur (38°C)
KT55	Keimträgerversuch bei thermophiler Gärtemperatur (55°C)

## Verzeichnis

---

LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
L <sub>N</sub>	Liter normiert
LPG	Landschaftspflegegrün, Langschaftspflegegras, Landschaftspflegegut
MH	Müller-Hinton-Agar
MPN	most probable number; die wahrscheinlichste Anzahl
MS	Maissilage
MSc	Maisschrot
mTPGY	modifiziertes TPGY-Flüssig-Nährmedium (s. TPGY)
mTSB	modifizierte Tryptose-Soja-Bouillon
mTSB+N	mTSB mit Novobiocin-Antibiotika-Zusatz
MQ	Ultra-Pure-Wasser aus dem Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System (Millipore <sup>TM</sup> , USA)
N	Nachgärer
NaWaRo	nachwachsende Rohstoffe
n.b.	nicht bestimmt
NH <sub>3</sub> -N	Ammoniak-Stickstoff [mg * kg <sup>-1</sup> ]
NH <sub>4</sub> -N	Ammonium-Stickstoff [mg * kg <sup>-1</sup> ]
oTS	organische Trockensubstanz
PB	Pilotbiogasanlage
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
pSub	Substrat pflanzlicher Herkunft
PuMi	Putenmist
qPCR	quantitative PCR
RB	organische Raumbelastung [kg <sub>oTS</sub> * [m <sup>3</sup> * d <sup>-1</sup> ]
rcf	relative centrifugal force
re	reverse
RiGü	Rindergülle
RiMi	Rindermist
S	Sonde
SGG	separierter und getrockneter Gärrest
SMAC	Sorbitol MacConkey-Agar
StMELF	Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
StMUV	Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
SwGü	Schweinegülle

T	Gärresttrocknung
TAC	total anorganic carbon; Gehalt an Carbonatpuffer (Pufferfähigkeit)
TPGY	Trypticase-Pepton-Glukose-Hefeextrakt-Flüssig-Nährmedium (engl.: Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Extract Broth)
TS	Trockensubstanz
tSub	Substrat tierischer Herkunft
VK	Vorkammer
ZS	Zellsuspension





## Zusammenfassung

Verschiedene Stämme von *Escherichia coli* und *Clostridium* spp. lösen ernstzunehmende Krankheitsbilder bei Mensch und Tier aus, die mitunter tödlich verlaufen können. Um den Kenntnisstand zum Vorkommen und Verhalten dieser Pathogene in Biogasanlagen zu erweitern, wurden in diesem Verbund-Projekt der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) und des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) zwei Fragestellungen bearbeitet: Zum einen sollte das Vorkommen von EHEC, EPEC, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* und *Clostridium perfringens* in der Prozesskette (Einsatzstoffe, Fermenterinhalt und Gärprodukte) einer Auswahl bayerischer Praxis-Biogasanlagen untersucht werden (Screening). Zum anderen sollte geprüft werden, wie sich die Keimzahlen künstlich eingebrachter, attenuierter Stämme von EHEC und *C. botulinum* in Laborbiogasanlagen entwickeln (Keimträgerexperimente). Der Nachweis der Keime erfolgte über eine kombinierte Methode aus kultureller Anreicherung und molekularbiologischer Detektion mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR).

Im Screening der Prozessketten wurden abhängig vom Organismus bis zu 163 Proben untersucht. Davon waren ca. 29% Substrate pflanzlicher Herkunft (z.B. Silagen), 11% Substrate tierischer Herkunft (z.B. Gülle, Mist), 27% Fermenterinhalt (Hauptgärer) und 33% Gärprodukte (Nachgärer, Endlager). EHEC konnten in allen untersuchten Prozessstufen nachgewiesen werden. Pflanzliche Substrate waren dabei relativ gering kontaminiert (8% der Proben). Tierische Substrate waren dagegen stark betroffen (53%), in etwas geringerem Ausmaß auch Fermenterinhalt (36%) und nachgeschaltete Prozessstufen (27%). *C. botulinum*, *C. haemolyticum*, *C. septicum* und *C. chauvoei* wurden in keiner der Proben nachgewiesen. *C. novyi* wurde in knapp 4% der Proben gefunden, vorwiegend in Fermenterinhalt und Gärprodukten. *C. perfringens* und *C. difficile* wurden in einer geringeren Anzahl von Proben untersucht. *C. perfringens* (Typ A) wurde in 3% und *C. difficile* in ca. 50% der Proben gefunden. Die Nachweisrate für *C. difficile* war in pflanzlichen Substraten gering, in tierischen Substraten, Fermenterinhalt und Gärprodukten dagegen hoch.

In Keimträgerversuchen bei 38°C wurde die Gesamtkeimzahl von *C. botulinum* (Sporen + vegetative Zellen) nach 63 d von anfänglich zwischen  $10^4$  und  $10^5$  MPN \* mL<sup>-1</sup> um 1,3 bis 2,8 Zehnerpotenzen reduziert. Dies entsprach einer Reduktion um 95,4% bis 99,8%. Eine Reduktion um 90% (D-Wert) wurde im Mittel innerhalb von  $34,6 \pm 11,2$  d erreicht. Im thermophilen Prozess betrug die Reduktion schon nach 3 d mindestens 99,7% (D-Wert:  $1,0 \pm 0,2$  d).

EPEC wurden im mesophilen Prozess innerhalb von  $23 \pm 1$  h in einem Versuch um knapp 2, in einem anderen um bis zu 6 Zehnerpotenzen reduziert (97,6 bis 99,9999%, D-Werte: 3,2 bis 14,9 h). Die unterschiedlich schnelle Inaktivierung der EPEC in den mesophilen Keimträgerversuchen könnte auf den unterschiedlich hohen Ammoniak-Konzentrationen im Gärgemisch beruhen. Höhere Ammoniak-Konzentrationen gingen mit schnelleren Keimzahlreduktionen einher. Bei 55°C konnten schon nach 30 min Exposition von anfänglich ca.  $10^8$  MPN \* mL<sup>-1</sup> keine EPEC mehr nachgewiesen werden. Die dezimale Reduktion war damit nach maximal 3,5 min erreicht.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten einen Eintrag von EHEC/EPEC in Biogasanlagen insbesondere durch tierische Substrate auf. In nicht unbedeutendem Maß konnte EHEC/EPEC auch in Fermenterhalten und Gärprodukten qualitativ nachgewiesen werden. In Keimträgerversuchen wurde demgegenüber eine Reduktion des als Indikator eingesetzten EPEC-Stamms im mesophilen und noch deutlich schneller im thermophilen Biogasprozess festgestellt.

Die untersuchten pathogenen *Clostridium* spp. kamen nicht oder nur in wenigen Proben aus Praxis-Biogasanlagen vor. *C. botulinum* war dabei nicht nachzuweisen. Der als nosokomialer Keim bekannte Erreger *C. difficile* wurde dagegen vergleichsweise häufig nachgewiesen. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Gerade die Abwesenheit von *C. botulinum* in der großen Anzahl untersuchter Proben aus Praxis-Biogasanlagen belegt die untergeordnete Bedeutung des Organismus in diesem Umfeld. Die Ergebnisse aus Keimträgerversuchen zeigen zudem, dass auch der durch die Fähigkeit zur Sporenbildung resistere *C. botulinum* durch den mesophilen und noch deutlicher durch den thermophilen Biogasprozess reduziert wird. Es konnten keine Hinweise auf eine Vermehrung in Biogasanlagen gefunden werden.

Demnach gilt für die Parameter EHEC und *C. botulinum*, dass die hygienische Qualität eines Gärprodukts gegenüber der Rohgülle/ Mist als verbessert einzuschätzen ist. Das Ausmaß der Hygienisierung ist abhängig vom betrachteten Organismus und den Gärbedingungen.

## Summary

Several strains of *Escherichia coli* and *Clostridium* spp. cause serious, occasionally lethal disease patterns in humans and animals. In order to enlarge the knowledge on the existence and behavior of these pathogens in biogas plants, this collaborative project of the Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL) and the Bavarian Health and Food Safety Authority (LGL) worked on two approaches: First, the incidence of EHEC, EPEC, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium novyi*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* and *Clostridium perfringens* was analyzed in the process chains (substrates, digester contents and digestion products) of selected Bavarian practice biogas plants (screening). Secondly, the development of the germ numbers of artificially spiked, attenuated strains of EHEC and *C. botulinum* in laboratory scale biogas digesters (sentinel chamber experiments) was investigated. The pathogens were detected by methods combining cultural enrichment with biomolecular analysis using quantitative Real-time PCR (qPCR).

Dependent on the organism up to 163 samples were analyzed during the screening of process chains. Among these, approx. 29% were plant substrates (e.g. silages), 11% animal substrates (e.g. manure, dung), 27% digester contents (main digesters) and 33% digestion products (second stage digesters, storage tanks). EHEC could be detected in all analyzed process steps. Plant substrates were only slightly contaminated (8% of the samples). In contrast, animal substrates were considerably infested (53%), digester contents (36%) and digestion products (27%) to a minor extent. *C. botulinum*, *C. haemolyticum*, *C. septicum* and *C. chauvoei* were not detected in any of the samples. *C. novyi* was found in nearly 4% of the samples, predominantly in digester contents and digestion products. A smaller number of samples was analyzed for *C. perfringens* and *C. difficile*. *C. perfringens* (type A) was found in 3% and *C. difficile* in approx. 50% of the samples. The detection rate of *C. difficile* was low in plant substrates but high in animal substrates, digester contents and digestion products.

In sentinel chamber experiments at 38°C, the germ number of *C. botulinum* (spores + vegetative cells) of initially  $10^4$  to  $10^5$  MPN \* mL<sup>-1</sup> was reduced by 1.3 to 2.8 orders of magnitude after 63 d corresponding to an inactivation rate of 95.4% to 99.8%. Reduction by 90% (D-value) was achieved within  $34.6 \pm 11.2$  d. In thermophilic processes *C. botulinum* was reduced by at least 99.7% already after 3 d (D-value:  $1.0 \pm 0.2$  d).

EPEC were inactivated by nearly 2 orders of magnitude within  $23 \pm 1$  h in one mesophilic sentinel chamber experiment and by up to 6 orders of magnitude in another (97.6 to 99.9999%, D-values: 3.2 to 14.9 h). The variable duration of inactivation of EPEC in mesophilic experiments might depend on varying ammonia concentrations of the digestates. Higher ammonia concentrations were accompanied by faster reduction of germ numbers. At 55°C, none of initially approx.  $10^8$  MPN \* mL<sup>-1</sup> EPEC could be detected already after 30 min of exposure, decimal reduction was accomplished within maximum 3.5 min.

The experimental results showed that EHEC/EPEC entered the biogas plants particularly by animal substrates. A considerable amount of EHEC/EPEC could qualitatively be detected in digester contents and digestion products. Nonetheless, a reduction of EPEC

numbers was measured in the mesophilic and considerably faster in the thermophilic sentinel chamber experiments.

The examined pathogenic *Clostridium* spp. were found in none of the samples or just in a small number. *C. difficile* represents an exception. This emerging nosocomial germ was detected comparatively frequently. More research remains to be conducted on this microorganism.

The absence of *C. botulinum* in the high number of practice biogas plant samples shows the minor relevance of this organism in this context in the typical case. Furthermore, the results of sentinel chamber experiments proved that *C. botulinum*, which is relatively resistant by the ability of spore formation, was reduced by mesophilic and thermophilic biogas processes. There was no evidence for an increase of *C. botulinum* in biogas plants.

It can be concluded for the parameters EHEC and *C. botulinum* that the sanitary quality of a digestion product is improved by biogas processes compared to untreated manure or dung. The degree of sanitation depends on the considered parameter and the digestion conditions.

# 1 Einleitung

## 1.1 Beschreibung der untersuchten Erreger

### 1.1.1 Krankheitserregende *Escherichia coli*

Die Bakterienspezies *Escherichia (E.) coli*, 1885 zum ersten Mal durch den Kinderarzt Escherich aus Stuhlproben von Säuglingen isoliert, zählt zu den gramnegativen, nicht sporenbildenden Stäbchenbakterien. Kapselbildung und peritriche Begeißelung finden sich bei den meisten Stämmen; es kommen aber auch unbegeißelte und damit unbewegliche Stämme vor (Karch et al., 1996). *E. coli* stellen keine besonderen Ansprüche an das Substrat und wachsen auf vielen gebräuchlichen Nährböden bei Temperaturen zwischen + 30°C und + 45°C.

Viele *E. coli*-Stämme besiedeln als Kommensalen den Darm von Mensch und Tier bereits wenige Stunden nach der Geburt und liefern dem Körper wichtige Stoffwechselprodukte, die zum Beispiel für die Blutgerinnung benötigt werden. Allerdings gehören nicht alle *E. coli* zu den für den Menschen ungefährlichen Bakterien. Bestimmte Erregerstämme führen zu einem breiten Spektrum von Erkrankungen, das von einer harmlosen Reisediarrhöe bis hin zu lebensgefährlichen Krankheitsbildern wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) reicht (Ammon et al., 2000). In Beziehung zu einigen O-Antigenen treten gehäuft plasmidkodierte Virulenzfaktoren, wie die Befähigung zur Hämolysin- oder Enterotoxinbildung, auf, die eine Unterteilung der Stämme in Subtypen ermöglicht. Nach heutigem Wissensstand sind folgende Subtypen bekannt:

- Enterotoxische *E. coli* (ETEC)
- Enteropathogene *E. coli* (EPEC)
- Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und
- Diffus adhärente *E. coli* (DAEC)

Unter diesen Pathovaren haben EHEC neben EPEC, die überwiegend bei Kindern unter zwei Jahren angetroffen werden (Heißenhuber et al., 2005), wahrscheinlich die weitaus größte Bedeutung (Nataro et al., 1998; Ammon et al., 2000).

### ***Enterohämorrhagische E. coli (EHEC)***

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) zählen in der Bundesrepublik Deutschland inzwischen neben Salmonellen und thermophilen *Campylobacter* spp. zu den häufigsten bakteriellen Enteritisserregern (Ammon et al., 2000), im Jahr 2013 wurden deutschlandweit 1621 EHEC-Erkrankungsfälle und 76 HUS-Fälle registriert (SurvStat, 2014). Zu den Eigenschaften dieser Bakterien rechnet man die Fähigkeit, Shiga-Toxin (auch als Shiga-like-Toxin oder Verotoxin bezeichnet) zu produzieren, weswegen sie Shiga-Toxin

bildende *E. coli* (STEC) oder Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet wurden. Die Symptome einer EHEC-Infektion beim Menschen können von einer akuten Enteritis über eine hämorrhagische Colitis bis hin zu häufig tödlich endenden postinfektiösen Syndromen, dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) mit oder ohne zerebrale Begleiterscheinungen, reichen (Karch et al., 1996). Betroffen von den oben genannten Komplikationen sind zumeist (Klein-)Kinder und ältere Menschen.

Als Hauptreservoir hat man Wiederkäuer, insbesondere Rinder, aber auch Schafe und Ziegen, identifiziert, die als symptomlose Ausscheider von STEC gelten (Bülte et al., 1990, Beutin et al., 1993, Baljer und Wieler, 1999). Eine Studie zu dem Vorkommen von STEC im Kot von Schlachtrindern ergab 1997 eine Nachweisrate von 47,6% (Richter et al., 1997). Da diesen Untersuchungen allerdings relativ geringe Tierzahlen zugrunde liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die Durchseuchungsrate in einzelnen Beständen auch erheblich höher, teilweise sogar bis 100%, liegt (Bülte, 2004). Eine Langzeituntersuchung der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten in vier deutschen landwirtschaftlichen Betrieben ergab eine STEC-Nachweisrate von 29 - 82% bei den beprobten Tieren (Geue et al., 2002). Die dort gewonnenen Isolate besaßen alle das genetische Potential typischer EHEC-Stämme. Ein Gefährdungspotential für den Menschen war daher gegeben (Geue et al., 2004).

### ***Enteropathogene E. coli (EPEC)***

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) sind weltweit als Auslöser von Säuglingsdiarrhö bekannt. Im Regelfall wird eine Erkrankung durch diesen Subtyp bei Kleinkindern und Säuglingen beobachtet. Die Bezeichnung „enteropathogene *Escherichia coli*“ stammt aus dem Jahr 1945, als der Pädiater John Bray in Großbritannien die erste pathogene *E. coli*-Variante bei an Durchfall erkrankten Kindern nachweisen konnte. Diese Erreger wurden damals im Unterschied zu den apathogenen *E. coli*-Stämmen, die aus Stuhlproben isoliert werden konnten, als „enteropathogene *Escherichia coli*“ bezeichnet (Bray 1945). Die heutige Charakterisierung von EPEC-Stämmen bezieht sich dagegen auf die Fähigkeit dieser Stämme, charakteristische „attaching and effacing“ (AE) Läsionen an der Darmschleimhaut hervorzurufen. Diese Fähigkeit ist durch das *eae*-Gen kodiert. Im Gegensatz zu STEC/EHEC-Stämmen besitzen EPEC-Stämme somit weder funktionelle *stx1*- noch *stx2*-Gene und sind damit nicht in der Lage, Shigatoxin 1 und/oder 2 zu bilden (Kaper, 1996).

### **1.1.2 *Clostridium botulinum*/ Botulinum-Neurotoxin-bildende Clostridien**

*Clostridium botulinum* zählt zu den sporenbildenden, obligat anaerob wachsenden, beweglichen, stäbchenförmigen Bakterien. Die Art ist ubiquitär, vor allem im Erdboden und Schlick verbreitet. Charakteristisch ist wie bei allen Clostridien-Spezies die Hitzeresistenz der Sporen (proteolytische Stämme: 121°C für ca. 3 Minuten, non-proteolytische Stämme: 90°C für ca. 10 Minuten). Die Spezies *C. botulinum* umfasst vier genetisch und physiologisch sehr unterschiedliche Gruppen, die zum Teil nur durch die Fähigkeit zur Bildung von Botulinum-Neurotoxin verbunden sind. Engere genetische Verwandtschaften als innerhalb der Spezies *C. botulinum* bestehen teilweise zwischen den einzelnen Gruppen und Vertreter anderer *Clostridium* spp. (z. B. *Clostridium sporogenes*), weswegen immer wieder über eine Änderung in der Nomenklatur nachgedacht wird. Andererseits existieren *Clostridium*-Isolate anderer Spezies, die ebenfalls in der Lage sind,

Botulinum-Toxin zu bilden. Man spricht deshalb in Wissenschaft und Forschung nicht mehr von der Spezies „*Clostridium botulinum*“, sondern fasst alle Bakterien, die sich durch ein entsprechendes Toxinbildungsvermögen auszeichnen, unter dem Begriff „Botulinum-Neurotoxin (BoNT)-produzierende Clostridien“ zusammen.

Botulinum-Toxin existiert in sieben verschiedenen antigenetischen Typen, die mit A bis G bezeichnet werden. Je nach gebildetem Toxintyp spricht man auch bei den Bakterien von BoNT A bis BoNT G. Tabelle 1 zeigt deren Zuordnung zu physiologischen Gruppen.

Tabelle 1: Physiologische Gruppen von *C. botulinum*

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
<b>Toxintypen</b>	A, B, F	B, E, F	C, D	G
<b>Proteolyse</b>	+	-	schwach	-
<b>Saccharolyse</b>	-	+	-	-
<b>Toxin Gen</b>	chromosomal	chromosomal	Bakteriophage	Plasmid
<b>Verwandtschaft zu</b>	<i>C. sporogenes</i> , <i>C. putrificum</i>	<i>C. butyricum</i> , <i>C. beijerinickii</i>	<i>C. haemolyticum</i> , <i>C. novyi</i> Typ A	<i>C. subterminale</i> , <i>C. haemolyticum</i>

Die derzeit als obligat humanpathogen eingestuft Botulinum-Toxine A, B, E und F sind einfach aufgebaute, zweikettige Polypeptide, die aus einer 100 kDa großen „schweren“ Kette und einer 50 kDa „leichten“ Kette bestehen und durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die leichte Kette ist eine Zink-haltige Endopeptidase, die zu einer Blockade der Acetylcholin-Ausschüttung und dadurch zu einer schlaffen Lähmung führt.

Intoxikationen mit *Clostridium botulinum*-Toxin gehören zu den seltenen lebensmittelassoziierten Intoxikationen; die Mortalität bei einer Erkrankung ist allerdings sehr hoch, da wenige Nanogramm bereits tödlich wirken. Menschliche Erkrankungsfälle sind von bisher bis auf Ausnahmefälle von den Toxintypen A, B, E und F beschrieben. In Deutschland wurden dem Robert-Koch-Institut 2013 6 humane *Clostridium botulinum*-Erkrankungen gemeldet, dies entspricht einer Inzidenz von 0,01 Fall/ 100.000 Einwohner, (SurvStat, 2014).

*C. botulinum* ist im Erdboden sowie im Bodensediment von Meeren und Seen weit verbreitet. *C. botulinum* Typ E findet sich vor allem in kontaminiertem Fisch oder Meerestieren, *C. botulinum* Typ A und B in Gemüse- oder Fleischprodukten (Anonymus, 2005). Da es sich bei den genannten Keimen um strikt anaerob wachsende Bakterien handelt, stellen vor allem nicht kommerziell hergestellte Konserven, wie z. B. Kesselkonserven, ein Risiko für den Verbraucher dar. Als besondere Form des Botulismus wird der so genannte „Säuglingsbotulismus“ beschrieben. Im Gegensatz zur Erkrankung von Erwachsenen, die typischerweise durch die Aufnahme des bereits toxinhaltigen Lebensmittels verursacht wird, können Sporen von *C. botulinum* im Darm von Säuglingen auskeimen und dort Toxin bilden (Midura, 1996). Ursache für den Säuglingsbotulismus ist häufig Honig, der als Naturprodukt *C. botulinum*-Sporen enthalten kann (Arnon et al., 1979, Midura et al., 1979; Fenicia et al., 1993; Balslev et al., 1997).

Auch veterinärmedizinisch kann *C. botulinum* von Bedeutung sein. Dabei sind vorrangig, aber nicht ausschließlich die Toxintypen C und D von Bedeutung. Das Auftreten des

akuten Botulismus wurde u.a. bei Rindern, Schafen, Vögeln und Pferden beschrieben (Selbitz, 2010).

Seit Mitte der 1990 Jahre wird von einer weiteren Krankheitserscheinung bei Rindern, dem sog. „chronischen“ oder „viszeralen“ Botulismus, berichtet. Dabei handelt es sich um ein wissenschaftlich nicht gesichertes Krankheitsbild, mit bislang nicht abschließend gekläarter Ursache. Diskutiert wird neben einem multifaktoriellen, klinischen Krankheitsgeschehen eine Toxicoinfektion mit *C. botulinum*, bei der es zu einer Besiedelung des Darmtraktes der Rinder mit anschließender Toxinproduktion kommen soll. Ein eindeutiger wissenschaftlicher Nachweis der Beteiligung von *C. botulinum* liegt bislang nicht vor (Selbitz, 2010; BfR, 2012, Bensmann, 2012).

### 1.1.3 Weitere pathogene Clostridien

Eine weitere Gruppe von Clostridien wird zwar als humanpathogen eingestuft, ob eine Übertragung über Lebensmittel allerdings entlang der Lebensmittelkette eine Rolle spielt und welche Symptomatik beim Menschen ggf. ausgelöst wird, ist derzeit unbekannt. Tatsache ist jedoch, dass *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. novyi* und *C. chauvoei* in der Veterinärmedizin bei einigen Tierarten (insbesondere Wiederkäuern) über das Futter aufgenommen werden und dann über Schleimhautläsionen entweder im Maulbereich oder im Magen-Darmtrakt in den Organismus eindringen und sich anschließend im Körper verteilen, vermehren und unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen können (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die veterinärmedizinisch relevanten *Clostridium* spp. (nach Selbitz, 2010)

Spezies	Gasödeminfektion	Enterotoxämie/ Enteritis	Neurotoxikose
<i>C. chauvoei</i>	Rauschbrand		
<i>C. septicum</i>	Pararauschbrand	Labmagen- pararauschbrand	
<i>C. novyi A</i>	malignes Ödem II		
<i>C. novyi B</i>	Deutscher Bradsot (nekrotisierende Hepatitis)		
<i>C. perfringens</i>	Gasbrand, Wundgasödeme	verschiedene Formen	
<i>C. botulinum</i>			Botulismus
<i>C. tetani</i>			Tetanus
<i>C. colinum</i>		quail disease (ulcerative Enteritis der Wachtel)	



Tabelle 2: (Fortsetzung) Übersicht über die veterinärmedizinisch relevanten *Clostridium* spp. (nach Selbiz, 2010)

Spezies	Gasödeminfektion	Enterotoxämie/ Enteritis	Neurotoxikose
<i>C. spiriforme</i>		Enterotoxämie des Kaninchens	
<i>C. difficile</i>		verschiedene Tierarten	
<i>C. piliforme</i>		Tyzzler's Disease	

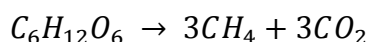
*C. difficile* wurde im Jahr 1935 aus dem Darm eines gesunden Säuglings isoliert und galt danach lange Zeit als Kommensale und Umweltkontaminante aber nicht primär als Krankheitserreger. Seit den 1970er Jahren setzte sich allerdings immer mehr die Erkenntnis durch, dass *C. difficile* Durchfallerkrankungen in Zusammenhang mit antibiotischer Behandlung verursachen kann. Inzwischen gilt *C. difficile* als bedeutendster Erreger nosokomialer Durchfallerkrankungen (Ackermann, 2004). Man schätzt, dass der Erreger für 15 – 20% der Fälle von antibiotikaassoziierter Diarrhoe (AAD) und für über 95% der Fälle von pseudomembranöser Kolitis verantwortlich ist (Bartlett, 2002). Allerdings wurden in den vergangenen Jahren auch vermehrt sog. „community-associated/acquired infections“ bei Personen beschrieben, bei denen vor Erkrankungseintritt weder eine antibiotische Behandlung noch ein Krankenhausaufenthalt stattgefunden hat. Aufgrund des Nachweises von *C. difficile*-Sporen auf allen Stufen entlang der Lebensmittelkette und damit in verschiedenen Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs sowie des oralen Übertragungsweges stellen mit *C. difficile* kontaminierte Lebensmittel eine mögliche Infektionsquelle für den Menschen dar (Gould und Limbago, 2010). Ein weiterer Hinweis darauf, dass *C. difficile* möglicherweise zu den lebensmittelübertragenen (fakultativ) pathogenen Mikroorganismen zählt, ist die Tatsache, dass die aus den unterschiedlichen Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs isolierten *C. difficile*-Stämme Ribotypen angehören, die regelmäßig auch bei menschlichen Erkrankungen beobachtet werden. Insofern ist es im Sinne des vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutzes essentiell zu wissen, über welche Wege toxinbildende *C. difficile*-Stämme ggf. in Lebensmittel eingetragen werden können. Es ist denkbar, dass die Düngung mit Gärresten aus Biogasanlagen einen Übertragungsweg darstellt. Auch bei Tieren besteht das Risiko einer Erkrankung durch *C. difficile* (Tabelle 2). Verschiedene Tierarten können betroffen sein (u.a. Rinder, Pferde, Schweine, Hunde, etc. Songer, 1996).

## 1.2 Stand des Wissens: Vorkommen der untersuchten Krankheitserreger in Biogasanlagen

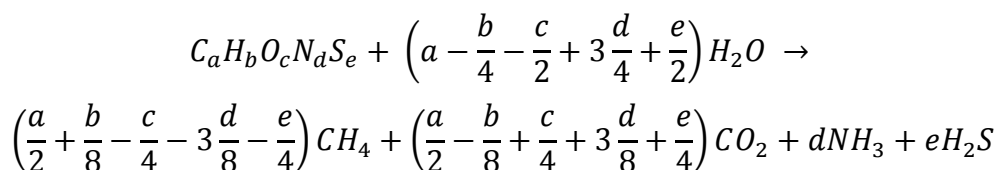
Einige Biogasanlagen dienen der Aufbereitung u. a. von Klärschlamm als Rückstand der aeroben Reinigungsschritte der Abwasserreinigung in den Belebtschlammbecken von Kläranlagen sowie zur Weiterbehandlung von Gülle oder Speiseabfällen. Klärschlämme sind wie auch Gülle oder Speiseabfälle reich an organischer Substanz und eignen sich daher gut zur Biogasgewinnung (Fritzsche, 1998; Fuchs, 2007). Des Weiteren kann in Biogasanlagen aber auch pflanzliches Substrat (z. B. nachwachsende Rohstoffe), das

explizit zur Biogasgewinnung angebaut wird, ggf. in Co-Vergärung mit zur Energiegewinnung genutzt werden. Das Substrat, das in Biogasanlagen verwendet wird, ist nicht keimfrei und kann je nach Zusammensetzung auch unterschiedliche pathogene Mikroorganismen enthalten. Insbesondere über Gülle können Erreger, die ubiquitär in der Umwelt verbreitet sind (wie z. B. sporenbildende Mikroorganismen), in die Biogasanlage eingetragen werden. Wissenschaftliche Studien zum Verhalten derartiger pathogener Mikroorganismen in Biogasanlagen liegen nur wenige vor, die meisten Arbeiten konzentrierten sich auf das Verhalten phytopathogener Mikroorganismen. Auch aufgrund der eingeschränkten Datenlage sind Biogasanlagen in der vergangenen Zeit immer wieder in den Fokus der Öffentlichkeit geraten. Es wird befürchtet, dass sich pathogene Mikroorganismen im Gärsubstrat der Biogasanlagen vermehren und es danach durch Ausbringung der Gärrückstände in der Umwelt zu einer Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier kommen könnte.

Biogas entsteht als Endprodukt eines komplexen, mehrstufigen, anaeroben Abbauprozesses organischer Substanz („anaerobe Mineralisation“). Dieser Prozess findet natürlicherweise in sumpfigem Boden und in Süßwassersedimenten statt, aber auch in Reisfeldern oder im Pansen von Wiederkäuern. Die Umsetzung von Glucose zu Biogas folgt der Summengleichung:



Die Umsetzung organischer Substanz zu Biogas erfolgt nach Boyle (1976) nach der allgemeinen Gleichung:



Diesem Abbau liegt eine komplexe, mehrstufige Prozesskaskade zu Grunde, die unter Sauerstoffabschluss (anaerob) ablaufen muss. Eine detaillierte Beschreibung hierzu findet sich z.B. in Bauer et al. (2009) oder im Prozessmodell Biogas (Schieder et al., 2010). Dabei werden die Polymere der organischen Ausgangssubstanz zunächst durch wohl meist bakterielle Enzymsysteme zu Oligo- und Monomeren hydrolysiert. Diese primären Abbauprodukte werden über zwei bis drei Stufen schließlich zu Methan und Kohlendioxid verstoffwechselt. Methanbildende Archaeen können lediglich Wasserstoff (H<sub>2</sub>), Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), manche auch Essigsäure (CH<sub>3</sub>-COOH) verwerten. Sie sind daher aufs engste mit den sekundären Gärern in Biofilmen vergesellschaftet, die aus primären Gärprodukten Wasserstoff, Kohlendioxid und Essigsäure erzeugen. Die Intermediate-oxidierenden Bakterien sind wiederum darauf angewiesen, dass der entstehende Wasserstoff von den methanogenen Archaeen verbraucht wird, da hohe H<sub>2</sub>-Konzentrationen zur Autoinhibition führen (Faulstich et al., 1995; Schink, 1997; Fritsche, 1998; Schink, 2006, Fuchs, 2007; Drča, 2007). Die Methanogenese kann im psychrophilen Temperaturbereich (< +25°C), im mesophilen Temperaturbereich (+30 - +40°C) oder im thermophilen Temperaturbereich (45-55°C) ablaufen. Je höher die Prozesstemperatur, umso schneller erfolgt die Biogasbildung und umso geringer ist typischerweise die Verweildauer des Substrats im Reaktor. In den meisten Biogasanlagen

---

wird im mesophilen Temperaturbereich zwischen +35 und +42°C gearbeitet (Drča, 2007; Faulstich, 1995; Fritsche, 1998; Anonymus, 2007; FNR, 2014).

### 1.2.1 Vorkommen und Verhalten von EHEC in Biogasanlagen

Gülle oder andere nicht zum Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (Material der Kat. 2 oder Kat. 3), die als Gärsubstrat in Biogasanlagen verwendet werden, können verschiedene Viren, Bakterien, Pilze und ggf. Dauerstadien von Endoparasiten (Wurmeier oder Zysten) in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, auch pathogene Mikroorganismen. Gerade nach dem EHEC-Ausbruch in Deutschland wurde häufig darüber spekuliert, inwieweit der Erreger in Biogasanlagen überleben bzw. sich dort ggf. auch vermehren und ein Krankheitsgeschehen auslösen kann.

Wissenschaftliche Daten zum Vorkommen und zur Überlebensfähigkeit von STEC/VTEC in Biogasanlagen sind allerdings kaum vorhanden. In einer niedersächsischen Studie konnten in keiner von 105 Substrat- und Gärrestproben aus 15 Biogasanlagen EHEC nachgewiesen werden (Breves, 2012). Wenige weitere Literaturstellen, die hierzu verfügbar sind, beziehen sich häufig auf Versuche, die *in vitro* unter Laborbedingungen durchgeführt wurden (u. a. Sahlström et al., 2008). Gezielte Untersuchungen liegen zu anderen pathogenen Erregern, wie z. B. *Salmonella* Senftenberg vor, welcher auch als Hygieneindikator genutzt wird. Die Konzentration von *Salmonella* Senftenberg nimmt schon bei kurzer Verweildauer in einer Biogasanlage ab. Dies geschieht sehr effizient bei thermophilem Betrieb (55 - 60°C; Fröschle et al., 2012, Marín Pérez et al., 2012). Da STEC/VTEC bisherigen Untersuchungen zufolge empfindlicher gegenüber den Bedingungen in der anaeroben Vergärung in einer Biogasanlage sind als *S. Senftenberg*, geht man davon aus, dass es auch schneller zu einer Reduktion des Erregers im Verlauf des Biogasprozesses kommt (Hoferer, 2001; Godfree und Farrell, 2005, Wagner et al., 2009). Diese Vermutung sollte im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt oder widerlegt werden.

### 1.2.2 Vorkommen und Verhalten pathogener Clostridien in Biogasanlagen

Pathogene und apathogene Vertreter des Genus *Clostridium* sind im Gegensatz zu STEC/VTEC strikte Anaerobier. Unter bestimmten Bedingungen können sie sich im anaeroben Milieu rapide vermehren. Sie sind in der Lage, hitzeresistente Sporen zu bilden, wodurch sie einige Hygienisierungsmaßnahmen wie z.B. Pasteurisierung überstehen können. Da die Sporen potentiell human- und tierpathogener Vertreter des Genus *Clostridium* ubiquitär in der Umwelt verbreitet sind, muss auch mit einem entsprechenden Eintrag in den Biogasprozess gerechnet werden. Dies bestätigt auch eine Studie von Köhler (2011).

Daneben stellte die Diskussion um das wissenschaftlich nicht gesicherte Krankheitsbild des „chronischen“ oder „viszeralen“ Botulismus bei Rindern (s. 1.1.2) einen weiteren Anlass dar, Untersuchungen zu *C. botulinum* in Biogasanlagen anzustrengen. Als eine der möglichen Ursachen für dessen Auftreten wurde eine Kontamination von Futtermitteln mit Tierkadavern sowie eine Anreicherung von toxischen Clostridien in Gärprodukten von Biogasanlagen diskutiert (Bräunig, 2012a). In Medien wurden wiederholt Behauptungen geäußert, Biogasanlagen trügen zur Verbreitung von *C. botulinum* bei (z.B. Böhnelt und Gessler, 2010).

Die meisten der bisherigen Untersuchungen erbrachten dagegen keine konkreten Hinweise auf ein Vorkommen krankheitserregender Clostridien über den natürlichen Hintergrund hinaus oder auf eine Vermehrung in landwirtschaftlich genutzten Gärgemischen (Tebbe et al., 2007). Bei einer Studie aus dem Jahr 2011, bei der 105 Proben der Substrate und Gärprodukte aus 15 niedersächsischen Biogasanlagen untersucht wurden, konnte *C. botulinum* nicht nachgewiesen werden (Breves, 2011; Breves, 2012). Eine Studie im Jahr 2010 wies *C. botulinum* zwar vereinzelt in den Substraten, aber nur in Gärresten einer einzelnen Biogasanlage nach (Köhler, 2011). Im selben Labor wurden in einem weiteren Untersuchungszeitraum (1990 – 2012) 5 von 74 untersuchten Gärresten positiv auf *C. botulinum* getestet (Köhler, 2012). Das Auftreten konnte in den meisten Fällen mit dem Einsatz verdorbener Substrate (z.B. Silagen, Lebensmittel) in Verbindung gebracht werden.

Auch andere Studien kamen zu der Einschätzung, dass das Risiko einer Ausbringung des Keims mit dem Gärrest aus Biogasanlagen auf landwirtschaftliche Flächen geringer ist als bei der Ausbringung unbehandelten Materials (Gülle) (Bagge, 2010; Dohrmann et al., 2011; Eikmeyer et al., 2013). Bagge et al. (2010) konnten ebenfalls in Biogasanlagen, die pasteurisierte tierische Nebenprodukte aus Schlachtereien als Substrate einsetzen, keine pathogenen Clostridien nach der anaeroben Vergärung finden. Auch die Konzentration der *Clostridium* spp. ging während der in dieser Studie untersuchten Prozesse zurück. In einer Studie von Leuhn und Wilderer (2006) blieb die Konzentration von *C. perfringens* im Durchlaufen einer Pilotbiogasanlage mit kombiniert meso- und thermophiler Betriebsweise praktisch unverändert.

Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass wohl keine Vermehrung potentiell pathogener *Clostridium* spp. in Biogasanlagen stattfindet. Allerdings ist die Datenlage vor allem unter Berücksichtigung einer eventuellen inhomogenen Verteilung der Erreger im Probenmaterial noch nicht ausreichend, um ein abschließendes Urteil fällen zu können. Insgesamt ist der Kenntnisstand nach Einschätzung des BfR noch sehr lückenhaft und es besteht weiterhin Forschungsbedarf (Bräunig, 2012b).

### **1.3 Zielstellung**

Da der Kenntnisstand zum Vorkommen und insbesondere zum Verhalten von EHEC und pathogenen Clostridien in Biogasanlagen noch unzureichend war (s. 1.2), sollte im vorliegenden Projekt eine bessere Datengrundlage aufgebaut werden, die eine Einschätzung des Risikopotenzials bei der Vergärung eventuell auch kontaminierter Einsatzstoffe in Biogasanlagen für die Gesundheit von Mensch und Tier ermöglicht.

Dazu wurden die folgenden Ansätze verfolgt:

#### **1.3.1 Screening in bayerischen Demonstrationsbiogasanlagen**

Die Einsatzstoffe, Fermenterinhalt und Gärprodukte bayerischer Demonstrationsanlagen sollten repräsentativ auf Krankheitserreger (insbesondere auf EHEC und pathogene Clostridien) untersucht werden, um eine mögliche Verbreitung dieser Mikroorganismen in bayerischen Biogasanlagen zu analysieren. Die Untersuchungen sollten sich auf NaWaRo-Anlagen, teilweise mit Zusatz unterschiedlicher Gülle- /Mist-Anteile, erstrecken. Dabei sollte der Fokus auf Biogasanlagen mit vorwiegendem Einsatz von Grassilage liegen, da auch über den Eintrag von Bodenanteilen eine Kontamination möglich ist.

Die Probenahme oblag dem Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT) der LfL. Die Untersuchung der gezogenen Proben erfolgte parallel durch die Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen (AQU) der LfL und durch das LGL.

### **1.3.2 Screening in veterinär-/abfallrechtlich überwachten Biogasanlagen**

Screeninguntersuchungen, wie in 1.3.1 beschrieben, sollten auch für Einsatzstoffe, die Fermenterinhalt und die Gärprodukte von mit Schlachtabfällen bzw. Küchenabfällen/Speiseresten betriebenen K 2- bzw. K 3-Biogasanlagen durchgeführt werden. Die Probenahme oblag dem LGL.

### **1.3.3 Keimträgerversuche in Labor-Biogasanlagen**

In Labor-Biogasanlagen der LfL sollte das Verhalten im Fermenter in Abhängigkeit der Temperatur (38°C bzw. 55°C), der Zeitdauer und anderer Parameter wie z. B. dem Ammoniakgehalt untersucht werden. Dazu sollten apathogene Vertreter von EHEC und *C. botulinum* in Keimträgern in den Prozess eingebracht werden. Hierbei sollten insbesondere Erkenntnisse zur Hygienisierungsleistung des Biogasprozesses gewonnen werden, d.h. zum Potenzial, bestimmte kritische Krankheitserreger zu reduzieren.

### **1.3.4 Kalkulation der Erreger-Reduktion im Modell ein- und mehrstufiger ideal, gleichmäßig durchmischter Durchflussreaktoren**

Bei Vergärung keimhaltiger Substrate können auch in volldurchmischten Fermentern Kurzschlussströme auftreten, so dass die angegebene hydraulische Verweilzeit nur einen Anhaltspunkt zur tatsächlich erreichten, gesicherten Verweilzeit geben kann. Im Einzelfall kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass auch Erreger in Gärrückständen von Biogasanlagen vorhanden sind und im Wirtschaftsdünger ggf. auf Felder ausgebracht werden.

Anhand des Modells ein- und mehrstufiger ideal, gleichmäßig durchmischter Durchflussreaktoren wurde eine theoretisch zu erwartende Reduktion der Erreger unter Einbeziehung der in den Keimträgerversuchen ermittelten spezifischen dezimalen Reduktionszeiten kalkuliert.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Prozessdaten und Substratzusammensetzung der untersuchten bayerischen Pilot-Biogasanlagen

#### 2.1.1 Screening der gesamten Prozesskette ausgewählter Biogas-Anlagen

Zur Untersuchung der gesamten Prozesskette auf die Anwesenheit von EHEC und *C. botulinum* wurden 8 Praxis-Biogasanlagen ausgewählt. Der Schwerpunkt lag auf Anlagen, die einen hohen Anteil an Grassilage einsetzen. Diese wurden im Rahmen der Projekte

- Monitoring und Dokumentation von Praxis-Biogasanlagen, um die Marktübersicht zu bewahren (Ebertseder et al. 2012)
- Nutzung von Grünland zur Biogaserzeugung – Teilprojekt: Betriebs-Monitoring Biogasanlagen (Kissel et al., 2012; Kissel et al., 2013)

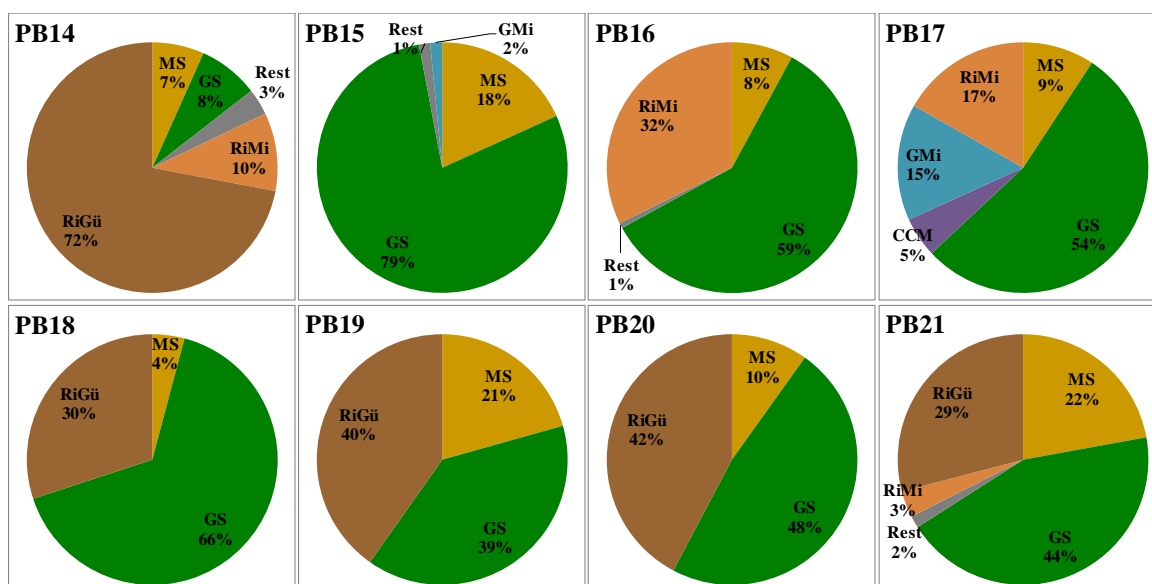
durch die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft am Institut für Landtechnik und Tierhaltung (LfL-ILT) kontinuierlich durch Monitoring verfahrenstechnischer, chemischer und physikalischer Kenngrößen (u.a. Temperatur, Gasanalyse, FOS/TAC, Ammonium-Stickstoffgehalt (NH<sub>4</sub>-N)) untersucht. Tabelle 3 gibt die Prozessparameter installierte elektrische Leistung, Anzahl der Prozessstufen, Temperaturbereich, Raumbelastung (RB) und Ammoniak-Stickstoff (NH<sub>3</sub>-N) der beprobten Biogasanlagen im Untersuchungszeitraum an. Der NH<sub>3</sub>-N-Gehalt wurde anhand des Messwertes für NH<sub>4</sub>-N in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert kalkuliert.

Tabelle 3: Prozessdaten zu den untersuchten Biogasanlagen

	PB14	PB15	PB16	PB17	PB18	PB19	PB20	PB21
Leistung [kWel.]	80	240	250	265	250	147	100	625
Prozessstufen	2	1	2	2	1	2	2	2
Temperatur * [°C]	39/ 38	42	42/ 37	44/ 52	42	48-50	42-43	45-46
NH <sub>3</sub> -N [ø mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup> ]	142	264	198	1246	256	292	761	173
RB** [ø kg oTS * m <sup>-3</sup> * d <sup>-1</sup> ]	2,3	4,8	5,4	4,1	3,1	1,4	1,5	4,0
Hydraul. Verweilzeit** [d]	53	63	48	72	63	130	107	44
Anzahl Beprobungen	1	1	1	3	4	4	4	4

\* Temperatur im Haupt-Fermenter/ im Nachgärer, \*\* in der ersten Prozessstufe (Haupt-Fermenter); FM: Frischmasse

Die Probenahme erstreckte sich i.d.R. auf alle Stufen der Prozesskette. Es wurden Proben der prozentual überwiegend eingesetzten Substrate (Abbildung 1), der Fermenterinhalt sowie der nachgeschalteten Prozessstufen (Nachgärer, Endlager) genommen. Die Proben wurden vom landwirtschaftlichen Betrieb zum Labor ungekühlt transportiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Rückstellproben wurden bei -20°C eingelagert.



CCM: Corn-Cob-Mix, GMi: Geflügelmist, GS: Grassilage, MS: Maissilage, RiGü: Rindergülle, RiMi: Rindermist;

Abbildung 1: Substratzusammensetzung der untersuchten Biogasanlagen

### 2.1.2 Screening weiterer Proben aus Biogasanlagen

Untersuchungen auf EHEC und *C. botulinum* wurden an 17 weiteren Proben durchgeführt. Dabei waren ein separierter und getrockneter Gärrest aus der Vergärung von Pferdemist (BGA1, Tabelle 4), 4 Fermenterinhalt und 12 Nachgärerinhalt aus Biogasanlagen enthalten, die nicht (BGA2 – BGA5) oder nur in der Vergangenheit (PB 8, PB14-PB16) durch das Monitoring von LfL-ILT begleitet wurden. Informationen zu Prozesstemperatur und Substratspektrum können Abbildung 4 und folgenden Projekt-Berichten entnommen werden:

- Wissenschaftliche Begleitung der Pilotbetriebe zur Biogasproduktion in Bayern (Effenberger et al., 2010; Bachmaier et al., 2011)
- Monitoring und Dokumentation von Praxis-Biogasanlagen, um die Marktübersicht zu bewahren (Ebertseder et al. 2012)

Weiterhin wurden Einzelproben untersucht, die aus aktuell laufenden Monitoring-Projekten des LfL-ILT stammten (PB17, 18, 21 – 25, s.a. Tabelle 4):

- Nutzung von Grünland zur Biogasproduktion – Teilprojekt: Betriebs-Monitoring Biogasanlagen (Kissel et al., 2012; Kissel et al., 2013)
- Monitoring von Biogasanlagen – Diversifizierung der Einsatzstoffe und Verfahrenstechnik (Streicher und Effenberger, 2013)



Tabelle 4: Substratspektrum und Probenherkunft der Einzelproben aus Biogasanlagen

Nr.	Kürzel	Einsatzstoffe	Prozess- temperatur [°C]	Probenahme- Datum	Proben- Herkunft
1	BGA1	MS, GS, GPS, RiGü, Pferdemist	F: 48, T: 70	29.11.2012	SGG
2	BGA2	MS, RiGü, SwGü, Weizen-/Maiskörner, GS	48	17.12.2012	N
3	PB17	s. Abbildung 1	s. Tabelle 3	17.12.2012	N
4	PB16	GS, RiMi, MS	41	17.12.2012	N
5	PB14	RiGü, RiMi, GS, MS	40	17.12.2012	N
6	PB15	GS, MS	42	17.12.2012	F
7	PB21	s. Abbildung 1	s. Tabelle 3	17.12.2012	N
8	BGA3	MS, RiGü, GS	48	17.12.2012	N
9	BGA4	SwGü	F: 53, N: 35	17.12.2012	F
10	BGA4	SwGü	F: 53, N: 35	17.12.2012	N
11	PB18	s. Abbildung 1	s. Tabelle 3	17.12.2012	F
12	PB8	MS, GS, GPS, RiGü, CCM	41	23.10.2013	N
13	PB22	RiGü, MS	53	23.10.2013	F
14	PB23	SwGü, MS	53	23.10.2013	N
15	PB24	Zuckerhirse, GS, Zuckerschnitzel, u.a.	42	23.10.2013	N
16	PB25	RiGü, MS, GS, Zuckerrüben, GeSc, GPS	40	23.10.2013	N
17	BGA5	MS, RiGü, GPS	52	23.10.2013	N

BGA: Biogasanlage, CCM: Corn-Cob-Mix, F: Haupt-Fermenter, GeSc: Getreide-Schrot, GPS: Ganzpflanzensilage, GS: Grassilage, MS: Maissilage, N: Nachgärer, PB: Pilotbiogasanlage, RiGü: Rindergülle, RiMi: Rindermist, SGG: separierter und getrockneter Gärrest, SwGü: Schweinegülle, T: Gärresttrocknung

## 2.2 Kultivierungsverfahren für Bakterien

### 2.2.1 Kultivierungsverfahren für STEC/ EHEC/ EPEC

Das Kultivierungsverfahren für Bakterien der Gruppe STEC/ EHEC/ EPEC wurde von der entsprechenden Methode des LGL übernommen und für die Anwendung an der LfL (z.B. Quantifizierung) erweitert und angepasst.

Der Kultivierungsablauf besteht aus 3 Abschnitten (Abbildung 2; in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05): einer Voranreicherung und einer Anreicherung in modifizierter Tryptose-Soja-Bouillon (mTSB, Tabelle 5) und einem Parallel-Ausstrich auf kommerziell erhältlichen Nährböden (Endo-Agar und Müller-Hinton-Agar).

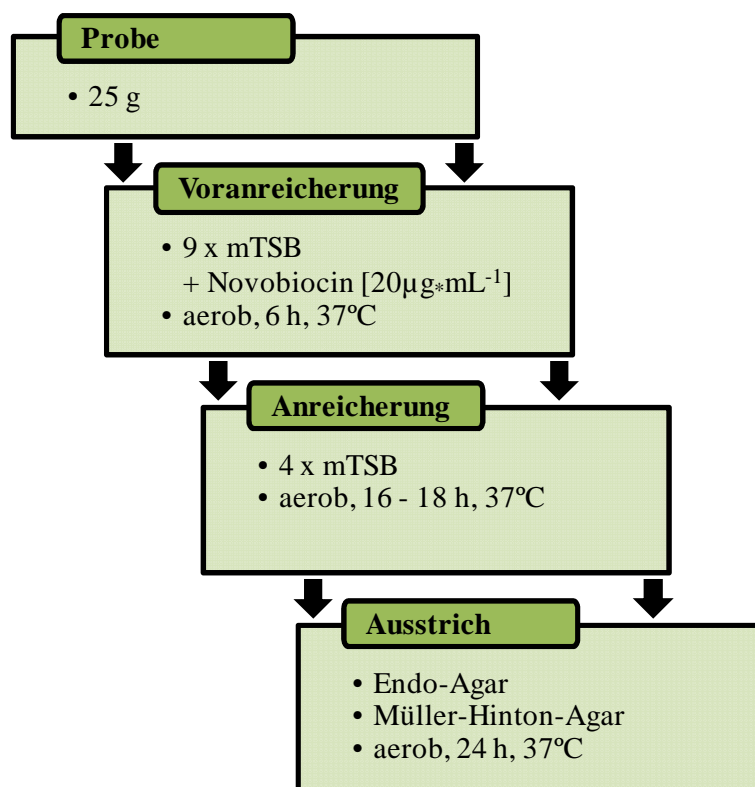


Abbildung 2 Kultivierungsablauf für STEC/ EHEC/ EPEC (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05)

Die Zutaten für den mTSB (Tabelle 5) wurden bei Raumtemperatur gelöst, der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt und die Lösung 15 min bei 121°C autoklaviert. Der Müller-Hinton-Agar (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) wurde nach Hersteller-Angaben zubereitet. Endo-Agar-Platten wurden als Fertig-Nährboden bezogen (Merck KGaA, Deutschland).

Tabelle 5: Rezeptur des modifizierten Tryptose-Soja-Bouillon (mTSB; nach: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05)

	Hersteller	Einwaage [g]
Tryptose Soja Bouillon	Merck KGaA, Deutschland	30,0
Gallensalz Nr. 3	Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc., USA	1,5
di-Kalium-Hydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland	1,5
deionisiertes Wasser		1000,0

Für die Voranreicherung wurden 225 µL Novobiocin-Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mg \* mL<sup>-1</sup> zu 225 mL mTSB zugegeben und 25 g Probe eingewogen (Abbildung 2). Die Inkubation erfolgte aerob für 6 h (± 1 h) bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (Schüttelfrequenz: 100 min<sup>-1</sup>).

Für die Anreicherung wurde 1 mL der inkubierten Voranreicherungskultur zu 4 mL frischem mTSB-Medium (ohne Novobiocin) gegeben. Die Anreicherungskultur wurde 16 – 18 h bei 37°C im Schüttelinkubator bei einer Schüttelfrequenz von 180 min<sup>-1</sup> inkubiert.

Aus den inkubierten Anreicherungen wurden mit der Impföse zwei Verdünnungsausstriche parallel auf Endo-Agar (Endo) und auf Müller-Hinton-Agar (MH) ausgeführt. Bei einzelnen Proben wurde zusätzlich auf Enterohämolysin (EHL)- und Sorbitol-MacConkey (SMAC)-Agar ausgestrichen, um das Kultivierungsergebnis mit den routinemäßig eingesetzten Agar-Platten abzugleichen. Die Inkubation der Agar-Platten erfolgte bei 37°C für 24h.

### 2.2.2 Kultivierungsverfahren für *Clostridium botulinum*

Zur Kultivierung von *C. botulinum* wurde die Methode des Projektpartners LGL übernommen (Abbildung 3, in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26:1988-12 bzw. DIN 10102:1988-06 (D) bzw. ISO/TS 17919:2013) und für die Anwendung an der LfL (z.B. Quantifizierung) erweitert und angepasst.

Der Kultivierungsablauf gliedert sich in 2 Stufen: Anreicherung in Flüssig-Medium (TPGY, Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Extract Broth, Tabelle 6) und Parallelausstrich auf Eigelb-Laktose-(EiL)-Agar (Heipha Dr. Müller GmbH, Deutschland) und Blut-Agar (Merck KGaA, Deutschland).

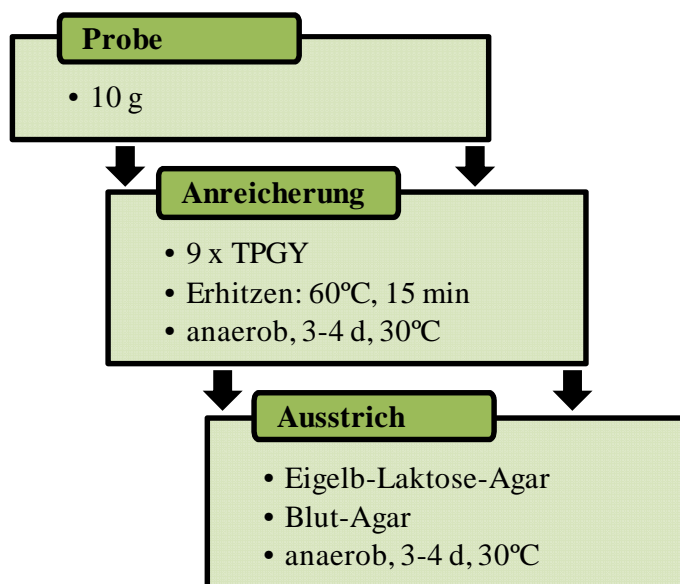


Abbildung 3 Kultivierungsverfahren für *C. botulinum* (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26:1988-12 bzw. DIN 10102:1988-06 (D) bzw. ISO/TS 17919:2013)

Tabelle 6: Rezeptur des TPGY-Bouillon (nach: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26:1988-12 bzw. DIN 10102:1988-06 (D) bzw. ISO/TS 17919:2013)

	Hersteller	Einwaage [g]
Pepton aus Casein	Merck KGaA, Deutschland; Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	50,0
Pepton aus Fleisch	Merck KGaA, Deutschland	5,0
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG Merck KGaA, Deutschland	20,0
Glucose	Merck KGaA, Deutschland	4,0
Natrium-Thioglycolat	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	1,0
deionisiertes Wasser		1000,0

Die Zutaten des TPGY-Bouillon (Tabelle 6) wurden bei Raumtemperatur gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M Natrium-Hydroxid-Lösung auf 7,0 eingestellt. Das Medium wurde 15 min bei 121°C autoklaviert. EiL-Agar und Blut-Agar wurden als Fertig-Nährboden bezogen.

Für die Anreicherungskultur wurden 10 g Probenmaterial zu 90 mL TPGY-Medium eingewogen. Die Kulturen wurden mit einem Hitze-Schritt (60°C, 15 min) zur Anregung des Auskeimens sporulierter Zellen behandelt und danach in Anaerob-Kultur-Behältern (System AnaeroJar™, Oxoid oder BD GasPak™ EZ, Becton-Dickinson Diagnostics) unter Nutzung von Anaerob-Generator-Paketen bei 30°C für 3 - 4 d inkubiert. Die inkubierten Kulturen wurden mit der Impföse in einem Verdünnungsausstrich parallel auf EiL- und Blut-Agar aufgebracht und für weitere 3 - 4 d anaerob bei 30°C inkubiert.

### 2.2.3 Quantifizierung von EHEC bzw. *C. botulinum* über ein MPN-Verfahren

Zur Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen EHEC- bzw. *C. botulinum*-Zellen wurde eine Most Probable Number (MPN)-Methode angewendet. Im Unterschied zur in 2.2.1 bzw. 2.2.2 beschriebenen Kultivierung, wurde die Probe hierzu nicht unverdünnt, sondern in 1:10-Verdünnungen in mTSB mit Novobiocin (20 mg \* mL<sup>-1</sup>) bzw. TPGY eingesetzt. Die Anzahl der Verdünnungsstufen wurde nach der erwarteten Zellzahl ausgewählt, wie hoch die lag, und betrug maximal 10 (unverdünnt bis 10<sup>-9</sup>). Jede Verdünnungsstufe wurde in Replikate (3 bis 5) zu je 10 mL aufgeteilt. Jedes Replikat jeder Verdünnungsstufe durchlief Teile des bzw. den gesamten Kultivierungsablauf (s. 2.2.1 bzw. 2.2.2) und wurde nach der Inkubation der einzelnen Kultivierungsschritte mittels qPCR untersucht (s. 2.5).

Die qPCR diente hierbei als Instrument zur qualitativen Bewertung der Ansätze als positiv (wachstumsfähige Keime vorhanden) bzw. negativ (keine wachstumsfähigen Keime enthalten). Aus diesen Ergebnissen wurde die MPN über ein frei erhältliches MPN-Kalkulations-Excel-Spreadsheet der Freien Universität Berlin ermittelt (Jarvis et al., 2010).

Diese Methodik kam bei der Quantifizierung im Rahmen der Keimträgerversuche zum Einsatz (s. 2.6.3 bzw. 2.6.4).

Am LGL wurde zudem eine MPN-Quantifizierung von *C. difficile*/ *C. novyi* im Rahmen des Praxisanlagen-Screenings durchgeführt (s. 2.2.5).

#### **2.2.4 Getrennter Nachweis von vegetativen Zellen und Sporen bei *C. botulinum***

Eine Differenzierung von vegetativen Zellen und Sporen bei *C. botulinum* erfolgte durch die Aufteilung der Voranreicherungskultur in zwei Aliquote. Vor der Inkubation wurde das eine Aliquot („S“) der TPGY-Kultur für 15 min auf 60°C erhitzt (s.a. 2.2.2), während das andere Aliquot unbehandelt blieb („V“). Der Hitze-Schritt tötet vegetative Zellen ab und regt die Sporen-Keimung an. Beim S-Ansatz wird in dieser Betrachtungsweise davon ausgegangen, dass nur die Sporen nachgewiesen werden. Beim V-Ansatz dagegen wird davon ausgegangen, dass die vegetativen Zellen Wachstum zeigen, während die Sporen aber weitgehend im sporulierten Zustand verharren. Bei dieser idealisierten Vorstellung werden die wahren Werte der beiden Anteile möglicherweise überschätzt, z.B. wenn manche Sporen auch im V-Ansatz auskeimen. Die Differenzierung kann daher nur als grobe Näherung betrachtet werden.

Bei quantitativen Analysen (s. 2.2.3), die im Rahmen dieses Projekts bei den Keimträgerversuchen (s. 2.6.4) von Bedeutung waren, wurde die Gesamtkeimzahl als die Summe von Sporen und vegetativen Zellen ermittelt.

#### **2.2.5 Kultivierungsverfahren für weitere pathogene Clostridien**

Unter dem Überbegriff „weitere pathogene Clostridien“ wurden folgende Vertreter untersucht: *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum* und *Clostridium septicum*. Mit Ausnahme von *C. difficile* wurden Untersuchungen auf diese Clostridien nur am LGL durchgeführt.

Für den Nachweis weiterer potentiell pathogener *Clostridium* spp. wurde auf die Methodik zurückgegriffen, die im Rahmen eines Vorgängerprojektes am LGL (47d-G7131-2009/20-08) für den Nachweis derartiger Erreger in unterschiedlichen Probenmaterialien entwickelt wurde. Da auch geringe Konzentrationen von *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* und *C. septicum* nachgewiesen werden sollten, wurde ein Anreicherungsverfahren eingesetzt.

Die Anreicherung erfolgte analog der Anreicherung von *C. botulinum* (s. 2.2.2) mit 10 g Probenmaterial in 90 mL TPGY-Bouillon (Tabelle 6). Die Ansätze wurden bei 37°C mit einer etwas verlängerten Inkubationszeit der TPGY-Kultur von 4 d (für *C. novyi*, *C. septicum*) bzw. 7 d (für *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*) inkubiert. Anschließend erfolgte ein Ausstrich auf Blut-Agar (Herstellung am LGL) bzw. Selektiv-Agar (bioMérieux SA, Frankreich), der analog der Flüssigkultur inkubiert wurde (Tabelle 7; Ziegler, 2013).

Tabelle 7: Bebrütung der weiteren *Clostridium* spp.

<i>Clostridium</i> spp.	Bebrütung [d]	Selektiv-Agar	Hersteller
<i>C. perfringens</i>	1	Eigelb-Laktose Agar TSC-Agar	Heipha Dr. Müller GmbH, Deutschland
<i>C. difficile</i>	4	CDIF-Agar SCS-Agar	bioMérieux, SA, Frankreich bioMérieux, SA, Frankreich
<i>C. novyi</i>	4	SCS	bioMérieux, SA, Frankreich
<i>C. septicum</i>	4	SCS	bioMérieux, SA, Frankreich
<i>C. chauvoei</i>	7	SCS	bioMérieux, SA, Frankreich
<i>C. haemolyticum</i>	7	SCS	bioMérieux, SA, Frankreich

Für den schwierig zu isolierenden *C. difficile* wurde ein leicht abgewandeltes Verfahren verwendet. Die Anreicherungskultur in TPGY-Bouillon (Tabelle 6) wurde nach dem Erhitzungsschritt (s. 2.2.2) durch Zugabe von 1 g Taurocholsäure-Natriumsalz (Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) und 36 µL C.D.M.N.-Selektivsupplement (*C. difficile* Moxalactam-Norfloxacin, Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) modifiziert (mTPGY; Ziegler, 2013). Nach 4 - 5 d anaerober Inkubation bei 37°C wurde sie auf CDIF-Agar und SCS-Agar ausgestrichen (Tabelle 7).

Abbildung 4 gibt einen Überblick über den kombinierten kulturellen und molekularbiologischen Nachweis der übrigen potentiell human- und tierpathogenen *Clostridium* spp.. Im Anschluss an einen positiven kulturellen Nachweis erfolgte eine Quantifizierung mittels eines Most-Probable-Number (MPN)-Verfahrens. Dieser Nachweis eignet sich gerade bei den teilweise nur schwer kultivierbaren Vertretern der *Clostridium* spp. besser für eine Keimzahlbestimmung als ein Oberflächenverfahren. Als Medium wurde auch hierfür entweder TPGY-Bouillon (*C. novyi*) oder TPGY-Bouillon, supplementiert mit Antibiotikazusätzen und Natrium-Taurocholat (*C. difficile*) verwendet.

Der kulturelle Nachweis von *Clostridium perfringens* erfolgte anders als der Nachweis der übrigen potentiell human- und tierpathogenen *Clostridium* spp. nicht qualitativ, sondern quantitativ in Anlehnung an die ISO 14189:2013-11 unter Verwendung von TSC-Agar bzw. bei einigen Proben unter Verwendung von Eigelb-Lactose-Agar (Tabelle 7). Sofern vorhanden wurden die gewonnenen Isolate mittels real-time-PCR bestätigt und weiter differenziert (s.2.5.3.4).

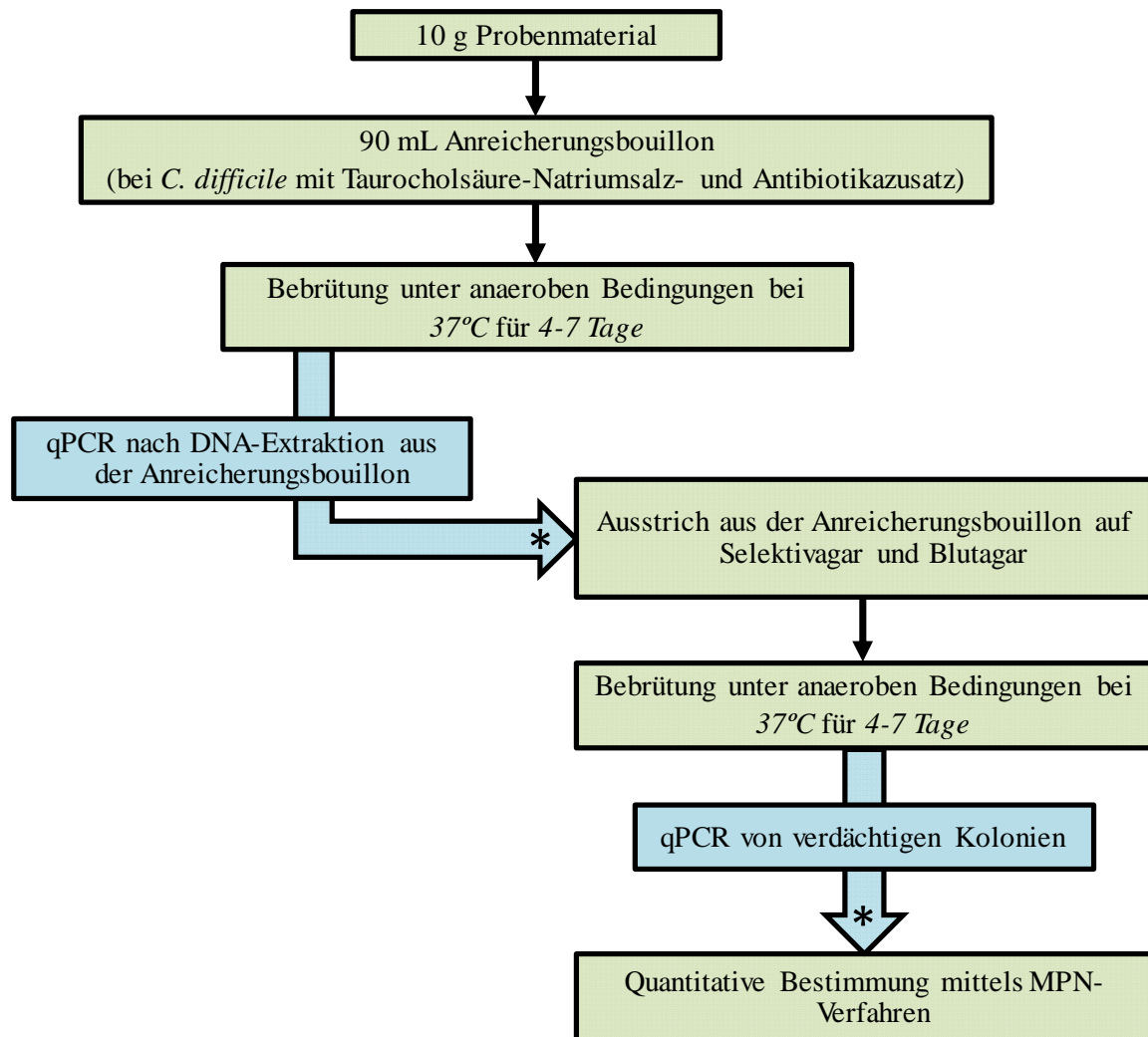


Abbildung 4: Übersicht über das kombinierte kulturelle und molekularbiologische Nachweisverfahren für verschiedene, potentiell human- und tierpathogenen *Clostridium* spp.; \* Fortführung nur bei positivem qPCR-Ergebnis

### 2.3 Aufbereitung der Kulturen für die qPCR

Als Vorlage (Template) dienen Zellsuspensionen (ZS), die aus den Kultivierungsschritten der inkubierten Voranreicherung, Anreicherung oder des Ausstrichs gewonnen wurden (s. 2.2). Die Kulturen aus der Voranreicherung oder Anreicherung wurden hierzu abzentrifugiert und in einem äquivalenten Volumen Ultra-Pure-Wasser (MQ) aus dem Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System (Millipore™, USA) aufgenommen. ZS von Ausstrichen wurden durch Aufnahmen von Zellmaterial in eine geeignete Menge MQ erhalten. Die ZS wurden durch Hitze (95°C, 5 min) inaktiviert und bis zu ihrem Einsatz in die qPCR bei -20°C gelagert.

### 2.4 DNA-Extraktion

An LfL-AQU wurde aus TPGY-Anreicherungskulturen eine DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Deutschland) durchgeführt, wenn eine

qPCR zur internen Amplifikationskontrolle (IAC, s. 2.5.1.1 bzw. 2.5.2.3) aus der erhitzten ZS (1:10-Verdünnung) inhibiert war.

Dazu wurden 1,8 mL der TPGY-Anreicherungskultur in einem Reaktionsgefäß 5 - 10 min bei 14.000 rcf abzentrifugiert. 1,6 mL vom Überstand wurden verworfen, so dass ein Volumen von ca. 200 µL im Reaktionsgefäß verblieb. Das Pellet wurde resuspendiert und entweder direkt für die DNA-Extraktion eingesetzt oder für 5 min auf 95°C erhitzt und auf -20°C bis zur DNA-Extraktion gelagert.

Die DNA Extraktion mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Deutschland) folgte dem Protokoll für Stuhl-Proben nach Hersteller-Angaben („Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“). Der Lyse-Schritt wurde - wie für Gram-positive Bakterien vorgeschlagen - bei 95°C ausgeführt.

Am LGL wurden die Anreicherungen und ZS routinemäßig mittels QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Deutschland) unter Verwendung eines DNA-Extraktionsautomaten (Qiacube, Qiagen GmbH, Deutschland) extrahiert. Eine thermische Lyse wurde nur bei der Untersuchung von Isolaten durchgeführt.

## 2.5 Nachweis der Bakterien durch qPCR

Die für den Nachweis von STEC/ EHEC/ EPEC und pathogenen Clostridien am LGL etablierten qPCR-Systeme werden dort im Routinebetrieb eingesetzt (Kennzeichnung in den folgenden Überschriften: [LGL]). An der LfL wurden die entsprechenden Systeme im Projekt „Entwicklung eines Schnellscreenings auf Pathogene in landwirtschaftlich relevanten Substraten“ (K/11/08) z.T. neu entwickelt und evaluiert oder von den Systemen des LGL abgeleitet und ggf. optimiert (Kennzeichnung in den folgenden Überschriften: [LfL]). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Systeme kurz dargestellt.

### 2.5.1 qPCR-Systeme zum Nachweis der Gruppe der STEC/ EHEC/ EPEC

#### 2.5.1.1 Multiplex-qPCR-System zum Nachweis der Toxin-Gene (*stx1*, *stx2*), des Intimin-Gens (*eae*) und einer internen Amplifikationskontrolle (*uidA*) [LGL]

Am LGL wurde zum Nachweis von STEC ein Multiplex-qPCR-System nach Pavlovic et al. (2010) verwendet, das auch in der Routinediagnostik zum Nachweis von *stx1*, *stx2* und *eae* aus unterschiedlichen Matrices in der Veterinär- und Humandiagnostik (u. a. Rinderkotproben, humane Stuhlproben, Lebensmittel tierischen und pflanzlichen Ursprungs, Trinkwasser) eingesetzt wird (s. Tabelle 9 nach Sharma et al., 1999 und Pavlovic et al., 2010). Die real-time-PCR-Untersuchungen wurden mit einem LightCycler<sup>®</sup> 480-System (Roche Diagnostics, Germany) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen einschließlich des verwendeten Temperatur-Zeitprofils sind bei Pavlovic et al. (2010) beschrieben.

Das Detektionslimit des beschriebenen real-time-PCR-System nach Pavlovic et al. (2010) ist insbesondere auf dem verwendeten real-time-PCR-Cycler sehr niedrig, so dass aus den Erfahrungen im Bereich der Veterinär- und Lebensmitteldiagnostik bei hohen Ct-Werten keine Isolation des Erregers mehr möglich ist. Deshalb wurde auch bei den vorliegenden Experimenten bei Signalen ab einem Ct-Wert von  $\geq 38$  ein Cut-off gesetzt, d. h. ab diesem



Ct-Wert wurde am LGL kein Versuch einer Keimisolierung mittels DNA-Kolonieblot-hybridisierung unternommen und die Proben als negativ gewertet.

#### 2.5.1.2 Abwandlungen des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis der Toxin-Gene (*stx1*, *stx2*), des Intimin-Gens (*eae*) und einer internen Amplifikationskontrolle (*uidA*) [LfL]

Im Unterschied zu dem in 2.5.1.1 beschriebenen Ansatz nach Pavlovic et al. (2010) wurde an der LfL ein modifizierter Forward-Primer „mVS1“ eingesetzt. Tabelle 9 zeigt die Primer der vier qPCR-Nachweissysteme für *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA*, die zusammen in einem Multiplex-qPCR-Ansatz eingesetzt werden können.

Für eine qPCR-Reaktion (25 µL) wurden 1-fach konzentrierter qPCR-Puffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, jeweils 400 nM Primer und Sonden der Systeme für *stx1*, *stx2* und *eae*, jeweils 100 nM Primer und Sonde des Systems für *uidA*, 1 U Platinum Taq-Polymerase, 1 µL ZS *E. coli* DSM 4509 und 2,5 µL Template eingesetzt (s.a. Tabelle 8). Das Temperaturprogramm setzte sich aus einer initialen Denaturierung von 2 min bei 94°C und 45 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei 94°C gefolgt von 60 s Annealing und Extension bei 58°C zusammen.

Als Positivkontrolle wurde eine durch Hitze (95°C, 5 min) inaktivierte Zellsuspension des EHEC-Stammes LGL 6901 (Serotyp O157/H<sup>-</sup>) verwendet, der vom Projektpartner LGL aus einer Umweltprobe isoliert wurde und die vier nachzuweisenden Gene besitzt.

Als Template dienten ZS, die aus den inkubierten Kulturen der Anreicherung (s. 2.2.1) mittels der in 2.3 beschriebenen Methode gewonnen wurden.

Das Multiplex-qPCR-System von Pavlovic et al. (2010) wurde für die Analyse von Stuhlproben etabliert. Die integrierte IAC weist das *E. coli*- und *Shigella* spp.-spezifische Gen *uidA* der β-Glucuronidase nach, das in Stuhlproben stets vorhanden ist. Da in diesem Projekt auch andere Probenmatrices untersucht werden sollten (z.B. Maissilage), die u.U. keine *E. coli*-Bakterien enthielten, wurde *E. coli* DSM 4509 als Template für die interne Amplifikationskontrolle (IAC) zugesetzt. So erzielten auch Kulturen ohne natürliches *E. coli*-Vorkommen ein positives *uidA*-qPCR-Signal, sofern die IAC nicht inhibiert war.

#### 2.5.1.3 Singleplex-qPCR-System zum Nachweis von Enterohämolysin (*Ehly*) [LfL]

In Tabelle 9 sind die Primer des qPCR-Nachweissystems für das Gen *Ehly* (in der Literatur z.T. auch als *ehx*, *hly*, *E-hly*, *e-hlyA* bezeichnet) gelistet. Für eine qPCR-Reaktion (25 µL) wurden 1-fach konzentrierter qPCR-Puffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, jeweils 400 nM Primer, 200 nM Sonde, 0,75 U Platinum Taq-Polymerase und 2,5 µL Template eingesetzt. Die verwendeten Reagenzien sowie die qPCR-Bedingungen aller in diesem Projekt verwendeten qPCR-Systeme von LfL-AQU sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Das Temperaturprogramm setzte sich aus einer initialen Denaturierung von 2 min bei 94°C und 40 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei 94°C gefolgt von 60 s kombiniertem Annealing/ Extension bei 64°C zusammen.

Als Positivkontrolle wurde eine durch Hitze (95°C, 5 min) inaktivierte Zellsuspension des EPEC-Stammes LGL 38122 verwendet, der vom Projektpartner LGL aus einer Umweltprobe isoliert wurde und das Gen *Ehly* besitzt (s. 2.6.3).

Als Template dienten ZS, die aus den Kultivierungsschritten der inkubierten Voranreicherung, Anreicherung oder des Ausstrichs gewonnen wurden (s. 2.2.1). Diese wurden der in 2.3 beschriebenen Vorbehandlung unterzogen.

Das Ehly-qPCR-System wurde an der LfL ebenso für eine nachgelagerte IAC zur Abklärung einer PCR-Inhibierung bei *C. botulinum*-TPGY-Kulturen (s. 2.5.2.3) verwendet. Hierzu wurden 2,5 µL der auch als Positivkontrolle eingesetzten, Hitzeinaktivierten Zellsuspension des EPEC-Stammes LGL 38122 als Template in einer 10<sup>4</sup>-Verdünnung verwendet. Dadurch wurden 506 Kopien des Gens *Ehly* in den qPCR-Ansatz eingebracht. Zusätzlich wurden 2,5 µL einer 1:10-Verdünnung der gewaschenen TPGY-Voranreicherungskultur hinzu pipettiert, die auf qPCR-Inhibition getestet werden sollte.

Tabelle 8: qPCR-Reaktionsbedingungen der Nachweissysteme für STEC/ EHEC/ EPEC und *C. botulinum* der LfL

Organismus	EHEC/EPEC			<i>C. botulinum</i>
Nachweis der Gene	<i>stx1, stx2, eae</i>	<i>uid A</i>	<i>Ehly</i>	<i>ntn H</i>

Reagenz	Hersteller	Konzentration				Einheit
10x PCR-Puffer - ohne MgCl <sub>2</sub>	InvitrogenTM, Inc., USA	1x				-
MgCl <sub>2</sub>	InvitrogenTM, Inc., USA	6				mM
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	200				μM
Primer, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	400	100	400	600	nM
Sonde, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	400	100	200	400	nM
Platinum-Taq-Polymerase	InvitrogenTM, Inc., USA	1		0,75	0,75	U * (25 μL) <sup>-1</sup>

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur				Einheit
Initiale Denaturierung	2 min	94				°C
Denaturierung	15 s	94				°C
Annealing + Extension	60 s	58	64	55		°C
Zyklenanzahl	-	45	40			-

Tabelle 9: qPCR-Nachweissysteme für STEC/ EHEC/ EPEC

Bezeichnung	Amplikon [bp]	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T <sub>m</sub> [°C]	Quelle
stx1-VS1-F	87	CAT AGT GGA ACC TCA CG ACG CAG T	24	54,2	64,4	Sharma et al. (1999)
stx1-mVS1-F	87	CAT AGY GGA ACC TCA CTG ACG CAG T	25	min. 52,0 max. 56,0	min. 64,6 max. 66,3	LfL - dieses Projekt (modifiziert nach Sharma et al. (1999))
stx1-VS2-R		TTT GCC GAA AAC GTA AAG CTT CA	23	39,1	57,1	Sharma et al. (1999)
stx1-VS3-S		<b>FAM</b> - TGT GGC AAG AGC GAT GTT ACG GTT TG - <b>BBQ</b>	26	50,0	64,8	Sharma et al. (1999)
stx2_for4	114	GTT TCC ATG ACA ACG GAC AGC AG	23	52,2	62,4	Pavlovic et al. (2010)
stx2_rev2		GTG ACG ACT GAT TTG CAT TCC GG	23	52,2	62,4	Pavlovic et al. (2010)
stx2_rev2f		ACG CCC AAT CTG CAT CCC T	19	57,9	58,8	Pavlovic et al. (2010)
stx2_t_p1		<b>TEX</b> - CAA CGT GTC GCA GCG CTG GAA C - <b>BBQ</b>	22	63,6	65,8	Pavlovic et al. (2010)
stx2_t_p2		<b>TEX</b> - ACA GCG AAT CGC AGA TCT GGA AC - <b>BBQ</b>	23	52,2	62,4	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_for1	107	TCG TGT CTG CTA AAA CCG CGG AG	23	56,5	64,2	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_rev1		TTG TCT TAT CAG CCT TAA TCT CAG	24	37,5	57,6	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_p1		<b>YAK</b> - TTG TTG ATC AAA CCA AGG CCA GCA - <b>BBQ</b>	24	45,8	61,0	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_p2		<b>YAK</b> - TTG TTG ATC AAA GCA AGG CTA GTA - <b>BBQ</b>	24	37,5	57,6	Pavlovic et al. (2010)
uidA-784F	82	GTG TGA TAT CTA CCC GCT TCG C	22	54,5	62,1	Frahm und Obst (2003)
uidA-866R		AGA ACG GTT TGT GGT TAA TCA GGA	24	41,7	59,3	Frahm und Obst (2003)
uidA-S-EC807		<b>LC670</b> - TCG GCA TCC GGT CAG TGG CAG T - <b>BBQ</b>	22	63,6	65,8	Frahm und Obst (2003)
Ehly-F	227	AAT AAT CTG GGA AAA GCC GGA ACA GT	26	42,3	61,6	LfL - dieses Projekt
Ehly-R		AAA TGA GCC AAG CTG GTT AAG CTG	24	45,8	61,0	LfL - dieses Projekt
Ehly-S		<b>FAM</b> - TTC TCA GCA ATT CAT CAA GAG CCA TGC C - <b>BHQ-1</b>	28	46,4	65,1	LfL - dieses Projekt

BBQ: BlackBerry<sup>®</sup> Quencer, BHQ-1: Black Hole Quencer<sup>®</sup> 1, FAM: 6-Carboxyfluorescein, LC670: LightCycler<sup>®</sup> Red 670, TEX: Texas Red<sup>®</sup>, YAK: Yakima Yellow<sup>®</sup>

Tabelle 10: qPCR-Nachweissysteme für *C. botulinum* (Teil I: Nachweis der Gene *ntnh*, *bont/A*, *bont/B*, *bont/E* und *bont/F*)

Bezeichnung	Amplikon [bp]	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T <sub>m</sub> [°C]	Quelle
ntnH-9a-F	219	AAT TTC WCT TAT YAR TAA AAA AGA HAA THT AA	32	min. 9,4 max. 21,9	min. 52,8 max. 58,0	LfL - dieses Projekt
ntnH-2c-R		GCC ATA CAA ATY ARW TCR AAA TAY TG	26	min. 23,1 max. 38,5	min. 53,8 max. 60,1	LfL - dieses Projekt
ntnH-2d-S		<b>FAM</b> - TAG ATC ART GGT GGA CWS AAT ATT ATA G - <b>BHQ-1</b>	28	min. 32,1 max. 35,7	min. 59,3 max. 60,7	LfL - dieses Projekt
CBOT A fw	112	TCT TAC GCG AAA TGG TTA TGG	21	42,9	55,9	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT A re		TGC CTG CAC CTA AAA GAG GA	20	50,0	57,3	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT A S		<b>HEX</b> - TGG TTT TGA GGA GTC ACT TGA A - <b>BHQ-1</b>	22	40,9	56,5	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT B fw	119	GGA GAA GTG GAG CGA AAA A	19	47,4	54,5	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT B deg fw	120	AGG AGA AGT GGA GCG RAA A	19	min. 47,4 max. 52,6	min. 54,5 max. 56,7	DIN CEN ISO/TS 17919:2014-03
CBOT B re		TTC CCT TGA TGC AAA ATG AT	20	35,0	51,2	Messelhäußer et al. (2007a)
2-CBOT B fw	128	TAA TCC AGG AGA AGT GGA GC	20	50,0	57,3	LfL - dieses Projekt
2-CBOT B re		CCT TCC CTT GAT GCA AAA TGA T	22	40,9	56,5	LfL - dieses Projekt
CBOT B S		<b>FAM</b> - CCT GGG CCA GTT TTA AAT GA - <b>BHQ-1</b>	20	45,0	55,3	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT E fw	102	TCA GCA CCT GGA CTT TCA GA	20	50,0	57,3	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT E re		CAT GTT GTT CTA TAT CAC TTG TTC CA	26	34,6	58,5	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT E S		<b>FAM</b> - TCC AAA ATG ATG CTT ATA TAC CAA AA - <b>BHQ-1</b>	26	26,9	55,3	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT F fw	116	ATA CGG GGC TAG GGG AGT TA	20	55,0	59,4	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT F re		AAA TCC TGA CCT CCA AAG GTT	21	42,9	55,9	Messelhäußer et al. (2007a)
CBOT F S		<b>HEX</b> - CCG AAA AAC CCA TAA GGC TA - <b>BHQ-1</b>	20	45,0	55,3	Messelhäußer et al. (2007a)
pUC_19_fw	118	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG	20	45,0	55,3	Messelhäußer et al. (2007a)
pUC_19_re		AGC TGG CGT AAT AGC GAA G	19	52,6	56,7	Messelhäußer et al. (2007a)
pUC_19_S		<b>ROX</b> - GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC - <b>TAMRA</b> (od. - <b>BHQ-2</b> )	20	50,0	57,3	Messelhäußer et al. (2007a)

BHQ-1 und -2: Black Hole Quencer<sup>®</sup> 1 und 2, FAM: 6-Carboxyfluorescein, HEX: Hexachlorofluorescein, ROX: 6-Carboxyl-X-Rhodamine

Tabelle 11: qPCR-Nachweissysteme für *C. botulinum* (Teil II: Nachweis der Gene *bont/C* und *bont/D*)

Bezeichnung	Amplikon [bp]	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T <sub>m</sub> [°C]	Quelle
CBOT C fw	128	GGC ACA AGA AGG ATT TGG TG	20	50,0	57,3	Ziegler, 2013
CBOT C re		TTG GAT CCA TGC AAA ATT CA	20	35,0	51,2	Ziegler, 2013
CBOT C S		<b>FAM</b> - TGC AAC TAA TAA TGT AGG AGA GGG - <b>TAMRA</b>	24	41,7	59,3	Ziegler, 2013
CBOT D fw	103	TGG TTC ACC TTT TAT GGG AGA	21	42,9	55,9	Ziegler, 2013
CBOT D re		CCA ACT ACC ATT TTC AAA CTT TTC	24	33,3	55,9	Ziegler, 2013
CBOT D S		<b>HEX</b> - CGC CTG AAG ATA CAT TTG ATT TT - <b>TAMRA</b> (LfL: <b>BHQ-1</b> )	23	34,8	55,3	Ziegler, 2013

BHQ-1: Black Hole Quencer<sup>®</sup> 1, FAM: 6-Carboxyfluorescein, HEX: Hexachloro-6-carboxyfluorescein

## 2.5.2 qPCR-Systeme für *Clostridium botulinum*

### 2.5.2.1 Multiplex-qPCR-System zum Nachweis der Botulinum-Neurotoxin-Gene (*bont*), Typ A, B, C, D, E und F [LGL]

Für die Untersuchung der inkubierten Anreicherungskulturen wurde am LGL ein Multiplex-qPCR-System zum simultanen Nachweis der Gene *bont/A*, *bont/B*, *bont/E* und *bont/F* verwendet, ergänzt durch eine auf dem pUC-19-Plasmid basierende interne Amplifikationskontrolle (IAC, IPC). Dafür wurden im Wesentlichen die Primer-Sonden-Systeme nach Messelhäusser et al. (2007a) eingesetzt (Tabelle 10). Im Hinblick auf den Nachweis des *bont/B*-Gens wurde ein leicht modifizierter Forward-Primer „CBOT B deg fw“ mit einer sog. „gemischten“ oder „degenerierten“ Base R (= A oder G) verwendet (Tabelle 10).

Dieses Nachweissystem und das verwendete Temperatur-Zeitprofil ist der DIN CEN ISO/TS 17919:2014-03 bzw. den zugehörigen Vorentwürfen entnommen. Im Gegensatz zu der in der DIN CEN ISO/TS 17919:2014 beschriebenen Vorgehensweise wird das real-time-PCR-System am LGL allerdings als Fünffach-Multiplex-System eingesetzt, wobei die Sonde für den Nachweis des Gens *bont/B* mit ATTO425 als Reporter-Farbstoff und die Sonde für den Nachweis von *bont/F* mit Cy5 als Reporter-Farbstoff markiert sind. Für eine qPCR-Reaktion (25 µL) wurden jeweils 280 nM Primer und 100 nM Sonde sowie 12,5 µL QPCR Multiplex-Master-Mix (Agilent Technologies, USA), 1 µL des auf  $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  konzentrierten pUC19-Plasmids (Fermentas, Deutschland) und 5 µL des Templates eingesetzt, die Untersuchungen wurden mittels eines Mx3005P-real-time-PCR-Cyclers (Agilent Technologies, USA) durchgeführt.

Um die beiden veterinärmedizinisch bedeutsamen *C. botulinum*-Toxingen-Varianten *bont/C* und *bont/D* sowie die zugehörigen Mosaik-Varianten *bont/CD* und *bont/DC* ebenfalls erfassen zu können, wurden die inkubierten Anreicherungskulturen zusätzlich mit einem Multiplex-qPCR-System zum Nachweis von *bont/C* und *bont/D* (siehe auch Ziegler, 2013; Tabelle 11) und einem weiteren Multiplex-qPCR-System zum Nachweis der Mosaikvarianten nach Anniballi et al., 2013 untersucht. Die Primer- und Sonden-systeme sowie die Zusammensetzung des Master-Mixes sind den genannten Publikationen ohne weitere Modifikationen entnommen und sind deshalb hier nicht erneut aufgeführt.

Die Untersuchungen wurden unter den gleichen Reaktionsbedingungen (Temperatur-Zeit-Profil) mittels eines Mx3005P-real-time-PCR-Cyclers (Agilent Technologies, USA) durchgeführt.

### 2.5.2.2 Abwandlungen des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis der Botulinum-Neurotoxin-Gene (*bont*), Typ A, B, C, D, E und F [LfL]

Aufbauend auf dem in 2.5.2.1 beschriebenen Multiplex-qPCR-System wurden auch an der LfL im Rahmen des Projektes „Entwicklung eines Schnellscreenings auf Pathogene in landwirtschaftlich relevanten Substraten“ (K/11/08) qPCR-Systeme für die Gene *bont/A*, *bont/B*, *bont/C*, *bont/D*, *bont/E* und *bont/F* etabliert, abgewandelt bzw. neu entwickelt und standen für den Einsatz in diesem Projekt zur Verfügung.

Für die Multiplex-qPCR wurden an der LfL jeweils die Systeme CBOT A nach Messelhäusser et al. (2007a) mit dem abgewandelten System 2-CBOT B fw/ 2-CBOT B

re/ CBOT B S (abgewandelt nach Messelhäuser et al., 2007a) und CBOT E mit CBOT F (jeweils nach Messelhäuser et al., 2007a) in Duplex-Ansätzen kombiniert. Die Systeme für den Nachweis von *bont/C* (hier nicht dargestellt, wird im Abschlussbericht des Projekts „Entwicklung eines Schnellscreenings auf Pathogene in landwirtschaftlich relevanten Substraten“ (K/11/08) erscheinen) und *bont/D* (Tabelle 11; Reaktionsbedingungen wie in 2.5.2.1) wurden im Singleplex eingesetzt.

Die Multiplex-qPCR-Reaktionen (25 µL) wurden mit 1x konzentriertem PCR-Puffer (ohne MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen™ Inc., USA) und einer Konzentration von 6 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™ Inc., USA), jeweils 200 µM dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) und 1 U Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA) angesetzt. Alternativ wurde im Multiplex der PerfeCta® MultiPlex qPCR ToughMix (Quanta Biosciences Inc., USA) als Ready-To-Use-Kit eingesetzt. Es wurden jeweils 300 nM Primer und 200 nM Sonden verwendet. Das 2-Schritt-Temperatur-Programm bestand aus 2 min Aktivierung bei 94 - 95°C und 45 Zyklen aus 15 s Denaturierung bei 94 - 95°C und 60 s Annealing und Extension bei 55°C.

Da ein erster Screening-Nachweis aus kulturellen Anreicherungen des Probenmaterials aus Praxisanlagen (2.2.2) über das *ntnh*-qPCR-Nachweissystem (s. 2.5.2.3) erfolgte und dieser stets negativ ausfiel, kamen die Nachweissysteme für *bont*-Gene im Rahmen dieses Projekts nicht für eine Charakterisierung von Umweltisolaten von *C. botulinum* zum Einsatz.

### 2.5.2.3 Singleplex-qPCR-System zum Nachweis des Gens *ntnh* [LfL]

Ein Screening auf Botulinum-Neurotoxin (BoNT)-bildende Clostridien erfolgte an der LfL über das Gen *ntnh* (nontoxic nonhemagglutinin H). Dieses bildet zusammen mit dem eigentlichen Toxin und weiteren Komponenten den Vorläufer-Toxinkomplex und ist als stark konserviertes Gen in allen BoNT-bildenden Stämmen vorhanden (East und Collins, 1994; Inoue et al. 1996, Nakamura et al. 2013).

Die Primer des an der LfL entwickelten *ntnh*-qPCR-Systems sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Für eine qPCR-Reaktion (25 µL) wurden 1-fach konzentrierter qPCR-Puffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, jeweils 600 nM Primer, 400 nM Sonde, 0,75 U Platinum Taq-Polymerase und 2,5 µL Template eingesetzt (s.a.). Das Temperaturprogramm setzte sich aus einer initialen Denaturierung von 2 min bei 94°C und 40 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei 94°C gefolgt von 60 s Annealing und Extension bei 55°C zusammen.

Als Positivkontrolle wurde eine durch Hitze (95°C, 5 min) inaktivierte Zellsuspension des *C. botulinum*-Stammes LGL E2625 verwendet. Dieser Stamm besitzt die *ntnh*-Genregion, jedoch nur Teile des Gens *bont/E* und ist damit nicht in der Lage ein funktionales Botulinum-Neurotoxin zu bilden.

Als Template dienten DNA-Extrakte (s. 2.4) oder ZS, die aus der inkubierten Anreicherung oder vom Ausstrich gewonnen wurden (s. 2.2.2 und 2.3).

Waren Template-DNA bzw. -ZS qPCR-negativ, wurde zum Ausschluss von inhibitorischen Effekten eine interne Amplifikationskontrolle in einem nachgelagerten qPCR-Ansatz durchgeführt. Dabei wurde entweder das *Ehly*-qPCR-System (s. 2.5.1.1) oder das hier beschriebene *ntnh*-qPCR-System selbst verwendet. Im zweiten Fall wurden dem Reaktionsansatz (25 µL) neben 2,5 µL Proben-Template noch weitere 2,5 µL



einer ZS von transgenen *E. coli* zugegeben, die den Abschnitt des *ntnh*-Gens empfangen hatten, der mit oben beschriebenem Primersystem nachgewiesen wird. Es wurden 21,5 Kopien des *ntnh*-Amplikons pro qPCR-Reaktion zugesetzt. Trat bei der IAC ein qPCR-Signal auf, konnten nennenswerte inhibitorische Effekte ausgeschlossen werden.

## 2.5.3 qPCR-Systeme für weitere pathogene Clostridien

### 2.5.3.1 Multiplex-qPCR-System zum Nachweis von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* und *C. septicum* [LGL]

Für den simultanen molekularbiologischen Nachweis von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* und *C. septicum* wurde auf das im Rahmen des durch das StMUV geförderten Projektes 47d-G7131-2009/20-08 „Humanpathogene *Clostridium* spp. - Staturerhebung in Lebensmitteln, Futtermittel-, Veterinär- und Umweltproben“ etablierte und validierte Multiplex-real-time-PCR-System zurückgegriffen (s. Tabelle 12). Die Reaktionsbedingungen (Temperatur-Zeit-Profil, Zusammensetzung des Master-Mixes) für das System sind bei Ziegler (2013) genauer beschrieben.

Tabelle 12: Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis von *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. haemolyticum* und *C. difficile*

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') und Modifikationen	Gen (Accession number)
CCHAU_fli_fw	CGT TAA ACG CAC ACA GAA ATA TG	<i>C. chauvoei</i> <i>fliC</i> (D89073.1)
CCHAU_fli_re	TGC TAG TCC TGC AGC ATC AT	
CCHAU_fli_S	<b>FAM</b> - TGG GAA ACA TTG CTA CAG CA - <b>TAMRA</b>	
CHAEM_fli_fw	TGA CGG AGC CTA TGG AGT TT	<i>C. haemolyticum</i> <i>fli</i> (AB058939.1)
CHAEM_fli_re	TTT CCA CTT TCT CCA TCA CCT T	
CHAEM_fli_S	<b>HEX</b> - GCA TCT GTC ACT CCT AAA ACT GG - <b>TAMRA</b>	
CDIF_tpi_fw	GAA GCT ACT AAG GGT ACA AAT ATA AAG	<i>C. difficile</i> <i>tpi</i> (AY700149.1)
CDIF_tpi_re	TGA ATG TCC TAT TAC AAC ATA GTC CA	
CDIF_tpi_S	<b>Cy5</b> - GGA GCA TTT ACA GGA GAA GTT TCA - <b>BHQ-2</b>	
CSEP_fw	GTA AAA CTG AGT CTA AAT TAT CAA AAA C	<i>C. septicum</i> alpha-Toxin <i>csa</i> (FJ212777.1)
CSEP_re	TAC TTT AAA TGA TGT TTT TAC TCC TA	
CSEP_S	<b>ATTO 425</b> - ACA GAT AAC TTT AAA TTT GGA GAA AAA - <b>DAB</b>	
pUC_19_fw	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG	IAC pUC 19 (L09137)
pUC_19_re	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G	
pUC_19_S	<b>ROX</b> - GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC - <b>TAMRA</b>	

2.5.3.2 Singleplex-qPCR-System zum Nachweis von *C. difficile* (Triosephosphat-Isomerase; *tpi*) [LfL]

Das in Tabelle 12 aufgeführte qPCR-Hydrolysesonden-System für die Triosephosphat-Isomerase von *C. difficile* wurde an der LfL übernommen und im Singleplex eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen inklusive des Temperatur-Programms der qPCR sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die qPCR wurde in Reaktionsansätzen von 25 µL durchgeführt. Als Template wurden 2,5 µL Hitze-inaktivierte Zellsuspension von CDIF- oder SCS-Agar-Kulturen des Praxisanlagenscreenings (s. 2.2.5) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente entweder eine Hitze-inaktivierte TPGY-ZS der *C. difficile*-Stämme LGL G346 oder LGL Bio498 oder die ZS eines Isolats auf CDIF-Agar, das mit diesem qPCR-System positiv getestet worden war (PB21-FI vom 19.02.2013).

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des *tpi*-Gens von *C. difficile*

Reagenz	Hersteller	Konzentration	Einheit
10x PCR-Puffer - ohne MgCl <sub>2</sub>	InvitrogenTM, Inc., USA	1x	-
MgCl <sub>2</sub>	InvitrogenTM, Inc., USA	6	mM
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	200	µM
Primer, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	600	nM
Sonde, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	200	nM
Platinum-Taq-Polymerase	InvitrogenTM, Inc., USA	0,75	U * (25 µL) <sup>-1</sup>

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur	Einheit
Initiale Denaturierung	2 min	94	°C
Denaturierung	15 s	94	°C
Annealing + Extension	60 s	55	°C
Zyklenanzahl	-	40	-

2.5.3.3 qPCR-System zum Nachweis von *C. novyi* [LGL]

Auch das für den Nachweis von *C. novyi* verwendete real-time-PCR-System wurde im Rahmen des in 2.5.3.1 genannten Projektes am LGL entwickelt und validiert. Die Primer- und Sonden-Sequenzen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Ebenso wie das qPCR-System zum simultanen Nachweis von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* und *C. septicum* (2.5.3.1) wurde auch das real-time-qPCR-System zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. novyi* durch eine pUC-19-basierte Interne Amplifikationskontrolle (IAC) ergänzt, um falsch-negative Ergebnisse aufgrund von Inhibition ausschließen zu können. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur-Zeit-Profil, Zusammensetzung des Master-Mixes) für das System sind bei Ziegler, 2013 genauer beschrieben.

Tabelle 14: Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis und die Differenzierung von *C. novyi*

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') und Modifikationen	Gen (Accession number)
CNOV_phos_fw:	GAT TCC TGG TCA AAA GAG TATT	Phospholipase C <i>plc</i> (D32125)
CNOV_phos_re	AAA GCG TGA CTT GCT GAA TAA	
CNOV_phos_S	<b>FAM</b> - GGT TGG GCA AAA CAA GCT AA - <b>TAMRA</b>	
CNOV_alpha_fw:	ATG GAC AAA GAT GGG GTC AA	Alpha-Toxin (Z48636)
CNOV_alpha_re:	CCA CCT AAT ACT CGC CAA CC	
CNOV_alpha_S:	<b>HEX</b> - TGG ATG GCT ACA CTT AAA TGG A - <b>TAMRA</b>	
pUC_19_fw	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG	IAC
pUC_19_re	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G	pUC 19
pUC_19_S	<b>ROX</b> - GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC - <b>TAMRA</b>	(L09137)

#### 2.5.3.4 qPCR-System zum Nachweis von *C. perfringens* [LGL]

Zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. perfringens* wurde verschiedene Multiplex-real-time-PCR-Systeme eingesetzt, die am LGL entwickelt sowie validiert wurden und dort seit Jahren für die Untersuchung von Veterinär- und Lebensmittelproben sowie zur Differenzierung von Isolaten im Einsatz sind (Messelhäusser et al., 2007b). Dabei wird für die Bestätigung von Isolaten prinzipiell als erster Schritt ein System eingesetzt, das eine Aussage dazu ermöglicht, ob es sich bei dem Isolat um *C. perfringens* handelt (Nachweis des *cpa*-Gens, das das alpha-Toxin codiert und bei allen *C. perfringens*-Stämmen vorhanden ist). Der Nachweis der übrigen Major- und Minortoxingene erfolgte nur bei *cpa*-positiven Isolaten. Die u. a. bei Messelhäusser et al. (2007b) beschriebenen Primer- und Sonden für die Bestätigung und die Differenzierung von *C. perfringens* sind in Tabelle 15 aufgeführt, Reaktionsbedingungen (Temperatur- und Zeitprofil sowie Master-Mix-Zusammensetzung) sind in der genannten Publikation umfassend beschrieben.

Tabelle 15: Sequenzen der Primer und Sonden zur Differenzierung von *C. perfringens* (u. a. Messelhäuser et al., 2007b)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') und Modifikationen	Gen (Accession number)
CRPF cpa fw	GCT AAT GTT ACT GCC GTT GA	Alpha-Toxin <i>cpa</i> DQ184176
CRPF cpa re	CCT CAT TAG TTT TGC AAC C	
CRPF cpa S	<b>FAM - GCG CAG GAC ATG TTA AGT TTG - TAMRA</b>	
CPRF cpe fw	GAA ATC CTT GAT TTA GCT GCT G	X81849
CPRF cpe re	TGA GTT AGA AGA ACG CCA ATC A	
CPRF cpe S	<b>HEX - GAT GCA TTA AAC TCA AAT CCA GC - TAMRA</b>	
CPRF etx fw	AGC TTT TCC TAG GGA TGG TTA	M95206
CPRF etx re	AAC TGC ACT ATA ATT TCC TTT TCC	
CPRF etx S	<b>FAM - AAG AGT GAT TTA AAT GAA GAT GG - TAMRA</b>	
CPRF cpb fw	TCA ATT GAA AGC GAA TAT GCT G	X83275
CPRF cpb re	CTG TAA ATT TTG TAT CCC ATG AAG C	
CPRF cpb S	<b>HEX - GAA TAT GTC CAA CCT GAT TTT TCT - TAMRA</b>	
CPRF cpb2 fw	TTT AAA TAT GAT CCT AAC C	AY730632
CPRF cpb2 re	GCA CCA TTC ATA AAT TCA GT	
CPRF cpb2 S	<b>FAM - TGA AAT ACT TAA TTC ACA AAA GA - TAMRA</b>	
CPRF iap fw	CGT GGA GGA TAT ACC GCA AT	X73562
CPRF iap re	GGT GTG AGC TTT AAT GCG TTT	
CPRF iap S	<b>HEX - TGG TCC TTT AAA TAA TCC TAA TCC A - TAMRA</b>	

## 2.6 Keimträgerversuche in Labor-Biogasanlagen

### 2.6.1 Betrieb der Labor-Biogasanlagen

Für die Durchführung von Keimträgerversuchen wurden 3 Fermenter im Labormaßstab im Durchfluss betrieben (Abbildung 5).



Abbildung 5: Fermenter im Labormaßstab

Die Biogas-Produktion wurde kontinuierlich mit Gaszählern (Eigenherstellung) gemessen und auf Standard-Temperatur und -Druck (STP) normalisiert. Die Zusammensetzung des Gases bzgl.  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$  und  $\text{H}_2\text{S}$  wurde mehrfach täglich mit Gasanalyse-Geräten der Firma AWITE (Deutschland) bestimmt.

Substrate und Gärgemische wurden nach Standardverfahren (Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, 1981; VDLUFA, 1997) chemisch auf folgende Parameter hin analysiert: TS, oTS, pH,  $\text{NH}_4\text{-N}$ , flüchtige Fettsäuren  $\text{C}_{2-7}$  und FOS/TAC (Quotient aus dem Gehalt an flüchtigen Fettsäuren (flüchtige organische Säuren „FOS“) und dem Gehalt an Carbonat-Puffer (totale anorganische Carbonate „TAC“)) durch die 2-Punkt Titrations-Methode (Voß et al., 2009).

Daten zur Betriebsweise der Fermenter sind in Tabelle 16 zusammengestellt. Die Fermenter verfügten über ein Arbeitsvolumen von 28 – 30 L. Die Durchmischung erfolgte durch semikontinuierlichen Betrieb eines Gabelrührwerks. Gefüttert wurde einmal täglich mit Futterschnecken. Als Substrate standen drei verschiedene Grassilagen (GS) und eine Maissilage (MS) zur Verfügung, die in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (Tabelle 16) eingesetzt wurden.

Tabelle 17 enthält Angaben zum Gehalt der Substrate an Trockensubstanz (TS), organischer Trockensubstanz (oTS) und flüchtigen Fettsäuren (FFS).

Tabelle 16: Substrat-Varianten: Prozessparameter und Verhältnis von Grassilage zu Maissilage im Substratmix

Substrat-Variante	„M1“	„T1“	„T2“
Temperatur [°C]	38	55	55
RB [kg oTS * m <sup>-3</sup> * d <sup>-1</sup> ]	1,0 - 2,0	0,5	0,5
GS:MS*	50:50	100:0	30:70
GS	„Gras-M“	„Gras-BM“	„GS 2. Schnitt kurz“
MS	„Mais-G“	-	„Mais-G“

\* Prozentsatz bezogen auf oTS; RB: Raumbelastung, GS: Grassilage, MS: Maissilage

Tabelle 17: TS-, oTS- und FFS-Gehalt der eingesetzten Substrate

Bezeichnung	TS	oTS	FFS
Einheit	% der FM	% von TS	mg Essigsäureäquivalent*kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>
Mais-G	34,94	96,69	4413,08
Gras-M kurz	30,53	90,73	7358,94
Gras-BM kurz	32,77	88,93	2962,99
GS, 2. Schnitt kurz	23,73	90,40	4494,16

TS: Trockensubstanz, oTS: organische TS, FFS: flüchtige Fettsäuren, FM: Frischmasse

## 2.6.2 Versuchsaufbau der Keimträgerversuche

Zur Analyse des Verhaltens der Krankheitserreger im Biogasprozess wurden Keimträgerversuche durchgeführt. Hierzu wurden Gärgemische aus den Labor-Fermentern (s. 2.6.1) mit apathogenen Stämmen von EHEC bzw. *C. botulinum* dotiert und in Keimträgern wieder in die Labor-Fermenter eingebracht. Die Keimträger bestanden aus einem Glasrohr, das zur Gewährleistung des osmotischen Austauschs und der Zurückhaltung der eingesetzten Mikroorganismen an beiden Enden mit Membranen aus Cellulose-Acetat und einer Porengröße von 0,2 µm abgeschlossen wurde (Abbildung 6, A) Die Keimträger wurden in einer in die Labor-Fermenter (Abbildung 6, C) einsetzbaren Halterung, dem Keimträgerrohr (Abbildung 6, B), befestigt. Die Position der Keimträger im Fermenter wurde so gewählt, dass das gerührte Gärgemisch sie umspült.

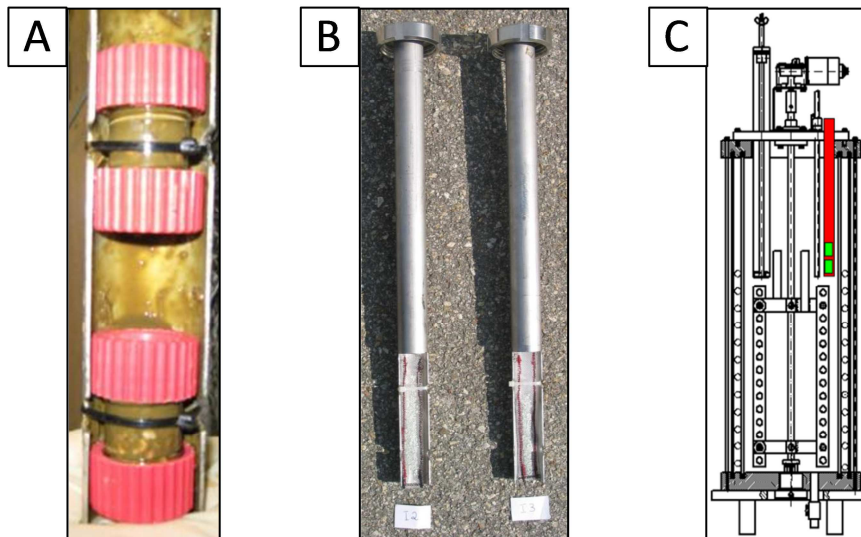


Abbildung 6: Aufbau (A, B) und Position (C) der Keimträger (A) und des Keimträgerrohrs (B) im Labor-Fermenter (C)

Bereits in vorangegangenen Versuchen wurde festgestellt, dass das Volumen des Gärgemischs im Keimträger im Laufe der Exposition abnimmt. Diese Abnahme beruht wahrscheinlich auf dem Abbau organischer Substanz mit Gasproduktion und muss in die quantitativen Berechnungen mit einfließen. Deshalb wurde der Keimträgerinhalt beim Einfüllen und beim Entnehmen gewogen. Da das dotierte Gärgemisch im Keimträger bei der Entnahme nach der Exposition nicht vollständig zurückgewonnen wird, wurde jeder Messwert pauschal um 0,2 g nach oben korrigiert. Die erhaltenen Keimkonzentrationen wurden mit dem daraus resultierenden Faktor multipliziert:

$$\text{Keimkonzentration}_{\text{korrigiert}} [\text{MPN} * \text{mL}^{-1}] = \frac{\text{Endvolumen [g]} + 0,2 \text{ g}}{\text{Anfangsvolumen [g]}} * \text{Keimkonzentration}_{\text{gemessen}} [\text{MPN} * \text{mL}^{-1}]$$

### 2.6.3 Keimträgerversuche mit EHEC/ EPEC

Für Keimträgerversuche mit EHEC/ EPEC standen als attenuierte Vertreter der Gruppe STEC/ EHEC die EPEC-Stämme LGL 38122 und LGL K110/1 zur Verfügung. Diese Stämme wurden vom Projektpartner LGL durch die in Kapitel 2.2.1 beschriebene Methode aus Umweltproben (LGL 38122: Umgebungsprobe eines Rinderstalls; LGL K110/1: Milch) isoliert und besitzen das Gen *Ehly*, während die Toxingene für *stx1* und *stx2* nicht nachweisbar sind. Da die Stämme in einem EHEC-typischen Habitat gefunden wurden und vergleichbare physiologische Eigenschaften besitzen (Untersuchungen des LGL), waren beide Stämme für den Einsatz in den Keimträgerversuchen geeignet. Die Prävalenz des *Ehly*-Gens in Diarrhö-auslösenden *E. coli*-Stämmen (Schmidt et al. 1995) legt ebenfalls die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Stamm LGL 38122 um einen ehemaligen *stx*-Träger handeln könnte.

Zur Inokulation der Keimträger wurde aus dem Stamm EPEC LGL 38122 zunächst eine Vorkultur hergestellt. Dazu wurde eine Einzelkolonie des Stammes von Endo-Agar

aufgenommen und in 100 mL mTSB gegeben, bei 37°C im Schüttelinkubator bei 175 \* min<sup>-1</sup> über Nacht (ÜN) inkubiert.

In einem Vorversuch wurde von einer solchen Kultur der EPEC-Stämme LGL 38122 und LGL K110/1 nach 3, 4 und 5 h Zellsuspension entnommen und 100 µL einer Verdünnungsreihe (10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-9</sup>) auf Endo-Agar und MH-Agar ausplattiert, um die Höhe und Entwicklung der Zellzahlen zu dokumentieren. Die Ergebnisse dieser Wachstumsbestimmung (s. 3.3.2.1) führten zur Auswahl des Stammes LGL 38122 für die Durchführung der Keimträgerversuche und zur Wahl einer Bebrütungszeit von 3 h („3 h-Kultur“) bis zur Entnahme des Inokulums.

Aus der ÜN-Kultur wurden 1000 µL in 100 mL frische mTSB überimpft und 3 h bei 37°C und 175 \* min<sup>-1</sup> inkubiert. Die 3 h-Kultur wurde im Verhältnis 1:10 mit Fermenterinhalt vermischt, der frisch aus demselben Labor-Fermenter entnommen wurde, in den die Keimträger eingesetzt werden sollten. Sofern Keimträger in mehrere Fermenter eingesetzt wurden, wurde eine Mischprobe dieser Fermenter zum Ansatz des Keimträgerinhalts verwendet. Jeweils 9 mL (bzw. g) dieses inokulierten Fermenterinhalts wurden zur Befüllung der Keimträger verwendet. Die Keimzahl im Keimträgerinhalt betrug dann im Mittel 1,7 \* 10<sup>8</sup> Zellen pro mL<sub>FI</sub> (FI: Fermenterinhalt = Gärgemisch). Pro untersuchtes Expositionsintervall wurde jeweils ein Keimträger eingebracht und nach Ablauf der Exposition wieder entnommen. Anschließend wurden die Keimträgerinhalte kultivierungsbasiert (s. 2.2.1 und 2.2.3) und mittels qPCR molekularbiologisch auf die Anwesenheit des Enterohämolysin-Gens (s. 2.5.1.1) quantitativ analysiert.

Tabelle 18 listet als Übersicht die durchgeführten Keimträger-Experimente auf und ordnet ihnen wichtige Daten der Gärbedingungen in den Labor-Fermentern (s. 2.6.1) zu.

Tabelle 18: Liste der Keimträger-Experimente mit EPEC LGL 38122

Keimträger-Experiment	Zeitraum	Substrat-Variante	Prozess-Temperatur	Inkubationszeiten [h]
KT38-190213	Feb 13	M1	38°C	24
KT38-150413	Apr 13	M1	38°C	24/ 48/ 72
KT38-130513	Mai 13	M1	38°C	6/ 22
KT55-081013	Okt 13	T1	55°C	1/ 3/ 6
KT55-110214	Feb 14	T2	55°C	0,5/ 1

#### 2.6.4 Keimträgerversuche mit *Clostridium botulinum*

Für Keimträgerversuche mit *C. botulinum* wurde der apathogene Stamm LGL E2625 verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine Deletion im Botulinum-Neurotoxin-Gen *bont/E* und der damit einhergehenden fehlenden Toxizität aus. Der Nachweis des Stammes erfolgte über die Detektion des Gens *ntnh* mittels qPCR (s. 2.5.2.3).

Zur Herstellung des Inokulums für die Keimträgerversuche wurde eine Kolonie von *C. botulinum* LGL E2625 von EiL-Agar abgenommen und in 10 mL TPGY-Medium 3 d bei 30°C anaerob inkubiert. Das Inokulum wurde mit 9 Teilen Fermenterinhalt vermischt, der frisch aus denselben Fermentern entnommen wurde, in die anschließend auch die Keimträger eingesetzt wurden. Sofern Keimträger in mehrere Fermenter eingesetzt wurden, wurde eine Mischprobe dieser Fermenter zum Ansatz des Keimträgerinhalts verwendet. Auch hier wurden 9 mL (bzw. g) des inokulierten Gärgemischs in die



Keimträger abgefüllt. Die Keimträger wurden in die Laborfermenter eingebracht. Für *C. botulinum* wurden im mesophilen Temperaturbereich deutlich längere Expositionszeiten als für EHEC/ EPEC von bis zu 63 d gewählt, da der Sporenbildner durch seine Überdauerungsformen eine weniger sensitive Reaktion gegenüber den Bedingungen im Fermenter erwarten ließ. Nach Ablauf der Exposition wurden die Keimträger entnommen und kultivierungsbasiert (s. 2.2.2 bis 2.2.4) und molekularbiologisch durch den qPCR-Nachweis des *ntnh*-Gens (s. 2.5.2.3) quantitativ analysiert.

In Tabelle 19 sind die im Rahmen des Projekts durchgeführten Keimträgerversuche mit *C. botulinum* aufgelistet und relevanten Daten der Gärbedingungen in den Laborfermentern gegenübergestellt. Die Keimträgerexperimente KT38-240912 und KT38-120313 waren als Vorversuche angelegt, um die Anzucht des Inokulums, die quantitative Analyse und den getrennten Nachweis von vegetativen Zellen und Sporen zu etablieren.

Tabelle 19: Liste der Keimträger-Experimente mit *C. botulinum* LGL E2625

Keimträger-Experiment	Zeitraum	Substrat-Variante	Prozess-Temperatur	Inkubationszeiten [d]
KT38-240912	Feb 13	M1	38°C	3
KT38-120313	Mrz 13	M1	38°C	3
KT38-100613	Jun 13	M1	38°C	1/ 3/ 7/ 14/ 22
KT38-010713	Jul 13	M1	38°C	8/ 28/ 63
KT38-141013	Okt 13	M1	38°C	42/ 63
KT55-211013	Okt 13	T1	55°C	1/ 3/ 10
KT55-270114	Jan 14	T2	55°C	1/ 3/ 7

Im **Vorversuch KT38-240914** wurde zur Anzucht der Inokulum-Kultur eine Kolonie *C. botulinum* LGL E2625 von EiL-Agar abgenommen und in 5 mL TPGY-Medium suspendiert. Die Inkubation erfolgte anaerob bei 30°C über 3 d. Die Zellzahl in der inkubierten Inokulum-Kultur wurde zum Einen durch Ausplattierung von jeweils 100 µL der Verdünnungsstufen  $10^{-2}$  bis  $10^{-6}$  (in 0,85% steril filtrierter KCl-Lösung) auf EiL- und Blut-Agar und zum Anderen durch MPN-qPCR mit dem *ntnh*-qPCR System (2.5.2.3) quantifiziert. Für die MPN-qPCR wurde 1 mL der Inokulum-Kultur abzentrifugiert (5 min, 14.000 rcf), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL MQ-Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Abtötung 5 min bei 95°C erhitzt. Log-Verdünnungen bis  $10^{-9}$  wurden in Triplikaten in die qPCR eingesetzt. Anhand der qPCR-Ergebnisse wurde die  $\text{MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$  Inokulum kalkuliert. Die Konzentration im Keimträgerinhalt wurde durch Einbezug der 1:10-Verdünnung des Inokulums im Gärgemisch berechnet.

Im **Vorversuch KT38-120313** wurden zur Anzucht der Inokulum-Kultur 200 µL einer flüssigen Vorkultur von *C. botulinum* LGL E2625 auf 50 mL frisches TPGY-Medium gegeben und anaerob bei 30°C über 24 h inkubiert. Danach wurde die Keimkonzentration erneut durch Ausplattieren und MPN-qPCR bestimmt. Im Unterschied zum Vorversuch KT38-240912 wurde die Verdünnungsreihe zur Ausplattierung in TPGY-Medium statt in KCl-Lösung hergestellt und die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  wurden zweimal jeweils auf EiL- und Blut-Agar ausplattiert: einmal direkt nach Herstellen der Verdünnungsreihe, ein weiteres Mal nach Erhitzung der Verdünnungsreihe auf 60°C für 15 min zur

Bestimmung des Sporenanteils. Neben der Bestimmung der Konzentration im Inokulum durch Plattierung und MPN-qPCR (wie bei Vorversuch KT38-240912) wurde der Keimträgerinhalt (9 Teile Fermenterinhalt + 1 Teil Inokulum) im Vorversuch KT38-120313 zusätzlich erstmals wie in 2.2.2, 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben zum Startzeitpunkt (0 h) quantifiziert. Die Anwendung der identischen Methodik ermöglichte einen direkten Vergleich der Konzentrationen vor und nach der Exposition im Fermenter.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Screening in bayerischen Demonstrationsbiogasanlagen

Die Ergebnisse des Screenings in bayerischen Demonstrationsbiogasanlagen sind im Anhang (s. 8.1) im Einzelnen dargestellt. Die folgenden Kapitel enthalten Einzel-Auswertungen aufgliedert nach dem nachgewiesenen Organismus (EHEC, EPEC, *C. botulinum* und weitere pathogene *Clostridium* spp.) bzw. nach Art der Probenahme (gesamte Prozesskette, Einzelproben).

Die Ergebnisse beziehen sich, sofern nicht explizit auf eine andere Vorgehensweise hingewiesen wird, auf eine gemeinsame Auswertung der Ergebnisse von LGL und LfL. Dabei wurde eine Probe als positiv bzgl. eines bestimmten Erregers gewertet, wenn bei einem der beiden Projektpartner eine positive Einstufung vorlag. Nur wenn beide Projektpartner zu einem negativen Ergebnis gelangten, fand eine Einstufung als negativ für den betrachteten Erreger statt.

#### 3.1.1 Untersuchungen zur Anwesenheit von STEC/ EHEC/ EPEC

Eine Einstufung als STEC- bzw. EHEC-positiv erfolgte, wenn die qPCR der kulturell angereicherten Probe einen positiven Nachweis des Gens *stx1*, des Gens *stx2* oder beider Gene *stx1* und *stx2* erbrachte. Als EPEC-positiv galten Proben, die negativ für *stx1* und *stx2* waren, dagegen aber einen positiven Nachweis des *eae*-Gens erzielten (Tabelle 20).

Tabelle 20: Einstufung der untersuchten Proben anhand der Toxine *stx1* und *stx2* und des Pathogenitätsfaktors *eae*. (Die Farbgebung wurde in den folgenden Abbildungen beibehalten.)

Einstufung	Nachweis von		
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
EHEC-positiv	-	+	
	+	-	- oder +
	+	+	
EHEC-negativ	-	-	- oder +
EPEC-positiv	-	-	+
EHEC/EPEC-negativ	-	-	-

Am LGL erfolgte eine Auswertung der Ergebnisse nur bzgl. der Anwesenheit von EHEC (*stx1* bzw. *stx2*); an LfL-AQU wurde zusätzlich die Anwesenheit des *eae*-Gens geprüft und in die Auswertung einbezogen.

#### 3.1.1.1 Screening in unterschiedlichen Probenmatrices ausgewählter Biogasanlagen auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC [LfL + LGL]

Abbildung 7 stellt die Ergebnisse aller im Screening untersuchter Proben (n = 163) dar und untergliedert diese nach den unterschiedlichen Probenmatrices. Es sind sowohl die Ergebnisse der Doppelbestimmungen als auch Einzelbestimmungen eines Projektpartners

eingegangen. Am LGL wurden insgesamt 147 Proben und an LfL-AQU 112 Proben auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC (im Folgenden als EHEC“ bezeichnet) untersucht. 96 Proben wurden von beiden Projektpartnern bestimmt (Doppelbestimmung).

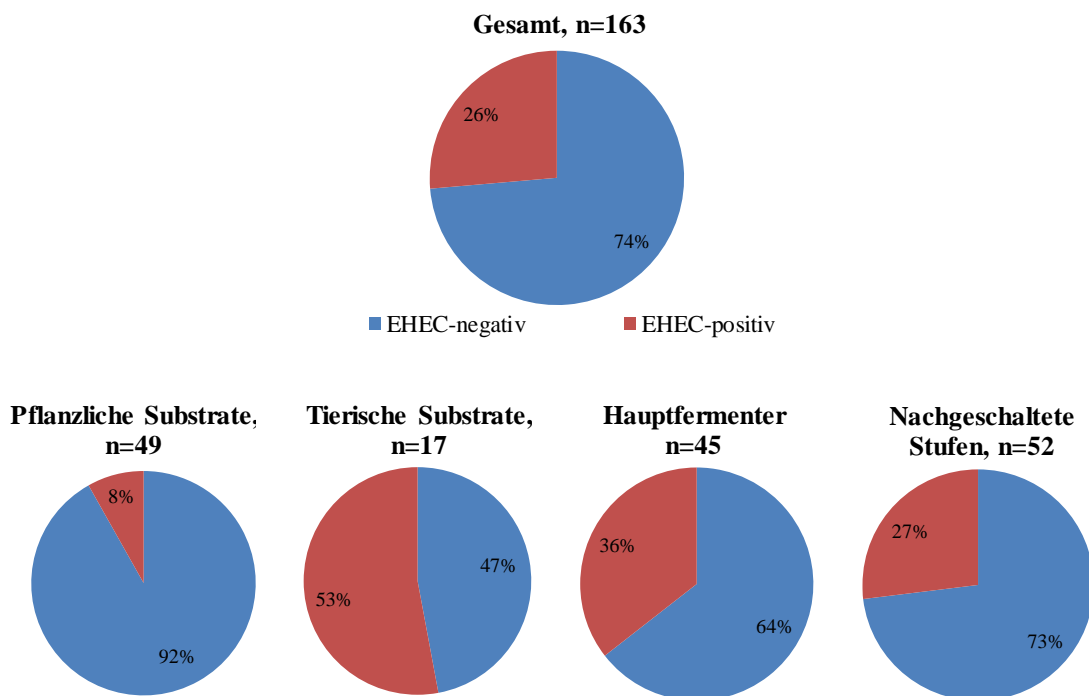


Abbildung 7: EHEC-Nachweisraten – Überblick aller Screening-Ergebnisse (Prozessketten und Einzelproben)

Die Nachweisrate war in pflanzlichen Substraten (z.B. Silagen) mit 8,2% relativ gering. In tierischen Substraten (z.B. Gülle) wurde im Gegensatz dazu in mehr als der Hälfte der Proben (52,9%) ein positiver EHEC-Nachweis erhalten. Etwas geringer aber dennoch relativ hoch lagen die Nachweisraten in den Proben aus Hauptfermentern und nachgeschalteten Stufen. In Hauptfermentern waren etwas mehr als ein Drittel der Proben (35,6%) und in nachgeschalteten Prozessstufen etwas mehr als ein Viertel der Proben (26,9%) betroffen. Insgesamt wurden in den unterschiedlichen Matrices relativ hohe EHEC-Nachweisraten von 26,4% erhalten.

In einer niedersächsischen Studie konnten dagegen in 105 Substrat- und Gärproduktproben aus 15 Biogasanlagen keine EHEC nachgewiesen werden (Breves, 2012). In einer Folgestudie wurde dieses Ergebnis bestätigt (Breves, 2014). Aus beiden Berichten geht nicht genau hervor, mit welcher Nachweismethodik auf EHEC untersucht wurde und welche Serovare mit der Methode nachgewiesen wurden. Die Angabe Nachweis über „Standardkultivierungsverfahren“ legt aber nahe, dass nach Anreicherung selektive Nährböden verwendet wurden. Solche Nährböden erlauben i.d.R. nur eine präsumtive Identifizierung des EHEC-Stammes O157 oder der Fähigkeit zur Bildung von Enterohämolysin und erfassen damit nicht alle EHEC Stämme. Die in der vorliegenden Studie angewendeten qPCR-Nachweis-Methoden erfassen dagegen spezifisch die Anwesenheit von Shigatoxingenen im Gesamtgenom der Anreicherung. Dadurch könnte die Divergenz der Ergebnisse von Breves (2012; 2014) und der Ergebnisse der

vorliegenden Studie bezüglich EHEC erklärt werden. Auch Bonetta et al. (2011) untersuchten nur den EHEC-Stamm O157:H7 und fanden ihn nicht in Gärprodukten einer mit Gülle beschickten, italienischen Anlage. Eine US-amerikanische Studie fand dagegen EHEC O157:H7 in geringen Konzentrationen in mit Gülle beschickten Laborfermentern (Aitken et al., 2007).

In den folgenden Unterkapiteln 3.1.1.1.1 und 3.1.1.1.2 werden die Screening-Ergebnisse unterschieden nach Beprobungen von gesamten Prozessketten und Einzelproben beschrieben und diskutiert.

#### 3.1.1.1.1 Screening der gesamten Prozesskette ausgewählter Biogasanlagen auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC [LfL + LGL]

Beim Screening der gesamten Prozesskette wurden insgesamt 134 Proben aus Praxisbiogasanlagen auf EHEC untersucht (LGL: 119; LfL-AQU: 96 Proben). Davon wurden 81 Proben sowohl von LGL als auch LfL untersucht (Doppelbestimmung). In Abbildung 8 sind die Ergebnisse des Screening von gesamten Prozessketten bzgl. der Anwesenheit von EHEC dargestellt.

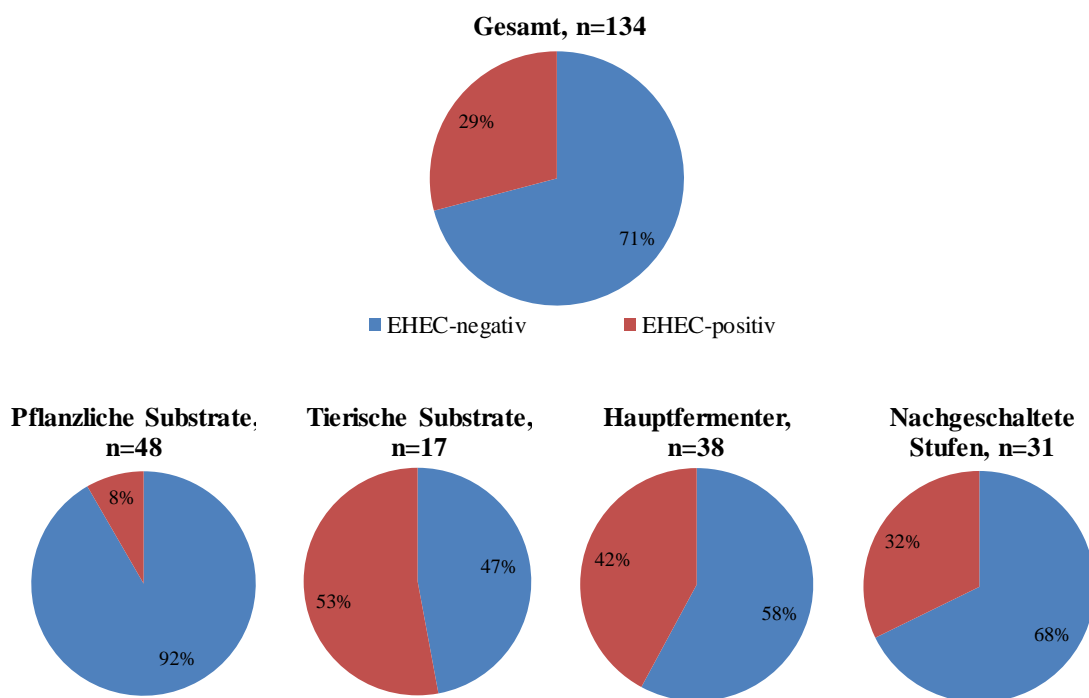


Abbildung 8: EHEC-Nachweisraten im Screening der gesamten Prozessketten

Ein Nachweis von *stx1* und/ oder *stx2* und damit eine Einstufung als EHEC-Positiv erfolgte in 39 von 134 der untersuchten Proben (29,1%) aus Prozessketten (Abbildung 8). Pflanzliche Einsatzstoffe waren dabei weniger betroffen, EHEC wurden hier nur in 4 von 48 Proben EHEC nachgewiesen (8,3%). Dagegen waren 52,9% (9 von 17) der untersuchten tierischen Substrate betroffen. Bei Inhalten aus Hauptgärern lag die Rate positiver Nachweise bei 42,1% (16 von 38), in nachgeschalteten Prozessstufen bei 32,3% (10 von 31).

Die hier gefundenen Kontaminationsraten für tierische Substrate waren hoch. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Befund, dass die Ausscheidungen von Wiederkäuern wie Rindern ein wichtiges Reservoir für EHEC-Erreger sind (RKI, 2011). Ein Eintrag von EHEC in Biogasanlagen findet demnach hauptsächlich über die Beschickung mit tierischen Einsatzstoffen statt. Der prozentuale Anteil der EHEC-positiven Proben war in den Gärgemischen aus Hauptfermentern geringer als in den tierischen Substraten und in den nachgeschalteten Prozessstufen niedriger als in den Hauptfermentern. Bei einer Bewertung ist zu bedenken, dass die Ergebnisse auf qualitativen Nachweisen von EHEC in den untersuchten Matrices beruhen und eventuelle Konzentrationsunterschiede keine Berücksichtigung finden. Ein Rückschluss auf das Verhalten von EHEC in der Prozesskette kann aus dieser Art der Untersuchung nur bedingt (z.B. bei Betrachtung einzelner Biogasanlagen; Beispiele in Tabelle 21) gezogen werden. Hierzu geben die Untersuchungen in Keimträgerversuchen mehr Aufschluss (s. 3.3.2).

Tabelle 21 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Proben dreier Prozessketten. In PB18 (Beispiel 1) konnte EHEC im Hauptfermenter aber nicht im Nachgärer nachgewiesen werden. Wird von statistischen Unsicherheiten (z.B. bei der Probenahme) abgesehen, kann für diesen Betrieb bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen (v.a. konstante Prozesstemperatur und Beschickung) aus der qualitativen Analyse eine Reduktion im Verlauf der Prozesskette angenommen werden.

In Beispiel 2 kam es zu keiner Veränderung im qualitativen Ergebnis, während in Beispiel 3 das separierte flüssige Gärprodukt im Endlager positiv für EHEC getestet wurde, obwohl alle vorgeschalteten Stufen ein negatives Ergebnis lieferten. Dies kann verfahrenstechnische Gründe haben (z.B. andere Eintragsquelle durch Einleitung von Sickerwässern aus Silostöcken in das Endlager bei dieser Anlage, s. Kissel et al., 2013) oder durch die statistische Unsicherheit bei der Probenahme bedingt sein.

Tabelle 21: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse des Screenings auf EHEC in drei Prozessketten aus Praxisbiogasanlagen

Bsp.-Nr.	Probenbezeichnung	Probenahme-Datum	Proben-Matrix	Kategorie	Ergebnis
1	PB18-GS	10.01.2013	Grassilage	Pflanzliches Substrat	EHEC-negativ
	PB18-FI	10.01.2013	Gärgemisch Hauptgärer	Hauptfermenter	EHEC-positiv
	PB18-N	10.01.2013	Gärgemisch Nachgärer	Nachgeschaltete Stufen	EHEC-negativ
2	PB14-GS	09.01.2013	Grassilage	Pflanzliches Substrat	EHEC-positiv
	PB14-MS	09.01.2013	Maissilage	Pflanzliches Substrat	EHEC-negativ
	PB14-GeSc	09.01.2013	Getreide-Schrot	Pflanzliches Substrat	EHEC-negativ
	PB14-RiGü	09.01.2013	Rinder-Gülle	Tierisches Substrat	EHEC-positiv
	PB14-RiMi	09.01.2013	Rinder-Festmist	Tierisches Substrat	EHEC-positiv
	PB14-FI	09.01.2013	Gärgemisch Hauptgärer	Hauptfermenter	EHEC-positiv
	PB14-N	09.01.2013	Gärgemisch Nachgärer	Nachgeschaltete Stufen	EHEC-positiv
3	PB17-GS	18.10.2012	Grassilage	Pflanzliches Substrat	EHEC-negativ
	PB17-RiMi	18.10.2012	Rinder-Festmist	Tierisches Substrat	EHEC-negativ
	PB17-HüMi	18.10.2012	Geflügel-Mist	Tierisches Substrat	EHEC-negativ
	PB17-FI	18.10.2012	Gärgemisch Hauptgärer	Hauptfermenter	EHEC-negativ
	PB17-N	18.10.2012	Gärgemisch Nachgärer	Nachgeschaltete Stufen	EHEC-negativ
	PB17-E fest	18.10.2012	separiertes Gärprodukt im Endlager, feste Phase	Nachgeschaltete Stufen	EHEC-negativ
	PB17-E flüssig	18.10.2012	separiertes Gärprodukt im Endlager, flüssige Phase	Nachgeschaltete Stufen	EHEC-positiv

### 3.1.1.1.2 Screening von Einzelproben aus Biogasanlagen auf die Anwesenheit von STEC/ EHEC [LfL + LGL]

Die 29 untersuchten Einzelproben waren vorwiegend Gärgemische aus Hauptfermentern oder nachgeschalteten Stufen. Am LGL wurden davon 28 Proben, an LfL-AQU 16 Proben untersucht. 15 Proben wurden parallel durch beide Einrichtungen analysiert.

Eine Charge Maissilage wurde negativ auf die Anwesenheit der Shigatoxine getestet, ebenso alle getesteten Gärgemische aus Hauptfermentern ( $n = 7$ , Abbildung 9). 19,0% (4 von 21) der Gärprodukte aus dem Fermenter nachgeschalteten Prozessstufen wurden als EHEC-positiv eingestuft. Insgesamt wurden damit 13,8% der untersuchten Einzelproben positiv für EHEC getestet.

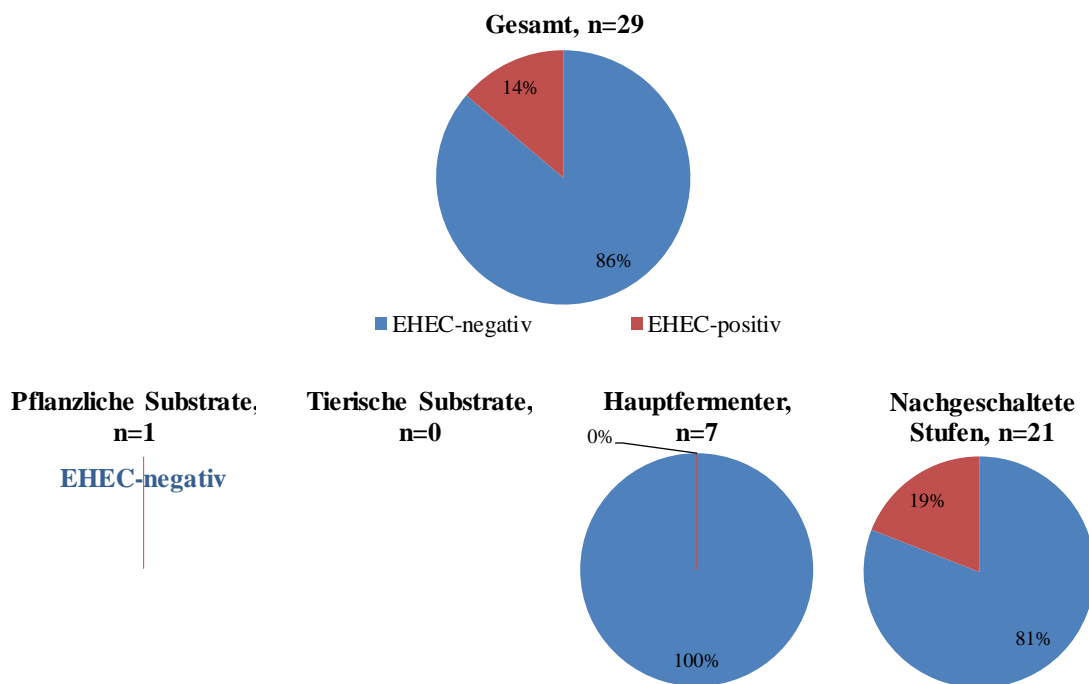


Abbildung 9: Nachweis von EHEC in weiteren Einzelproben aus Biogasanlagen

### 3.1.1.2 Vergleich der Ergebnisse LfL - LGL des Screenings auf EHEC

Von den insgesamt 163 Ergebnissen auf die Anwesenheit von EHEC von Prozessketten- und Einzelproben wurden 96 sowohl von LfL als auch LGL bestimmt (Tabelle 22). Es traten Abweichungen in den Einstufungen (EHEC-positiv bzw. –negativ) in 16 Proben auf (16,7%). Bei 15 Proben (15,6%) wurde an LfL-AQU ein EHEC-positives Ergebnis erhalten, obwohl am LGL ein EHEC-negatives Ergebnis erzielt wurde (1x pflanzliches Substrat, 3x tierische Substrate, 6x Gärgemische aus Hauptfermentern, 4x Inhalte nachgeschalteter Prozessstufen). Dagegen trat am LGL eine EHEC-positive Einstufung bei einer Probe auf (tierisches Substrat), die an LfL-AQU negativ eingestuft wurde.

Tabelle 22: Vergleich der EHEC-Einstufungen bei Doppelbestimmungen im Screening

Anzahl	EHEC
- aller untersuchten Proben	163
- aller doppelt bestimmten Proben (LfL + LGL)	96
- der abweichenden Ergebnisse gesamt	16
- LfL-EHEC-positiv und LGL-EHEC-negativ	15
- LGL-EHEC-positiv und LfL-EHEC-negativ	1

Ursachen für die Fälle unterschiedlicher Einstufung können z.B. in der z.T. inhomogenen Beschaffenheit der Probenmaterialien oder auch in einer unterschiedlichen Sensitivität der Nachweissysteme liegen.

Die untersuchten Probenmaterialien können z.T. sehr unterschiedliche Beschaffenheit aufweisen. Diese reicht von grobkörniger, relativ trockener Maissilage über langfaserige,



sehr nasse Grassilage, zähflüssigen Fermenterinhalt mit hohen TS/oTS-Gehalten hin zu der dünnflüssigen Fraktion fest-flüssig-separierter Gärprodukte.

Die Entnahme einer homogenen Probe war besonders bei trockenen oder zähflüssigen Materialien häufig schwierig. Das entnommene Aliquot sollte die Keimkonzentration im gesamten Fermenter widerspiegeln, durch Klumpenbildung oder die Entnahme eines ungleichmäßigen Verhältnisses von festen und flüssigen Bestandteilen, kann es zu Unterschieden in der Keimkonzentration des entnommenen Anteils im Verhältnis zu der des Ausgangsmaterials kommen. Je größer die untersuchte Probenmenge, desto geringer werden i.d.R. die Auswirkungen von Probenahme-Unsicherheiten. Bei den angewendeten Methoden wurde eine für mikro-/molekularbiologische Untersuchungen relativ große Probenmenge von 10 – 25 g für Anreicherungskulturen eingesetzt, wodurch die statistische Unsicherheit gering gehalten werden sollte.

Auch die Höhe der im Ausgangsmaterial enthaltenen Keimkonzentration ist wichtig. Je geringer diese ist, desto größer wird die statistische Wahrscheinlichkeit, Aliquote zu entnehmen, deren Keimbelastung unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methode liegt. Diese Nachweisgrenze kann bei unterschiedlichen Methoden teils erheblich variieren. Im Rahmen dieses Projekts wurde die Nachweismethode für EHEC an LfL-AQU weitgehend vom LGL übernommen. Veränderungen bestanden insbesondere an dem eingesetzten qPCR-Nachweissystem für das *stx1*-Gen (s. 2.5.1.2). Dies sollte die Sensitivität erhöht haben. Eine weitere Ursache für die divergierenden Ergebnisse könnte auch in der am LGL im Rahmen der Untersuchung von Lebensmitteln angewendeten Vorgehensweise liegen, dass Proben, die mit dem in 2.5.1.1 beschriebenen qPCR-System untersucht werden, mit einem Ct-Wert  $\geq 38$  grundsätzlich nicht mehr als positiv gewertet wurden (Cut-off, s. 2.5.1.1), da aus langjähriger Erfahrung am LGL bekannt ist, dass aus solchen Proben keine Isolierung von EHEC möglich war. Da aber im Lebensmittelbereich nur solche Proben als EHEC-positiv gewertet werden können, bei denen sowohl der molekularbasierte Nachweis als auch das dazu passende Isolat vorliegen, wird dort routinemäßig mit dem genannten Cut-off gearbeitet. Diese Vorgehensweise stellt im Prinzip eine Normierung der Nachweisgrenze des molekularbiologischen Nachweises an den Erfahrungswerten aus der mikrobiologischen Untersuchung dar. Die so künstlich herabgesetzte Sensitivität des Systems kann die Ursache einer geringeren Anzahl von *stx1*-positiv bzw. EHEC-positiv-Einstufung im Vergleich zu den an LfL-AQU erzielten sein, bei denen kein Cut-off angewendet wurde.

In Tabelle 23 sind die Abweichungen der Ergebnisse von LfL-AQU und LGL aufgegliedert nach den Nachweisen der beiden Shigatoxingene dargestellt. In 17 von 96 Untersuchungen (17,7%) wichen die Ergebnisse für *stx1* voneinander ab. Dabei wurde in 16 Fällen ein positiver Nachweis an LfL-AQU erzielt, während die Nachweise am LGL negativ ausfielen. Der umgekehrte Fall trat einmal auf. Für *stx2* gab es 15 abweichende Ergebnisse (15,6%), von denen 14 auf einen positiven Nachweis an LfL-AQU zurückgehen und eines auf einen positiven Nachweis am LGL.

Tabelle 23: Vergleich der Ergebnisse für *stx1* bzw. *stx2* bei Doppelbestimmungen im Screening

<b>Anzahl</b>	<b><i>stx1</i></b>	<b><i>stx2</i></b>
- der doppelt bestimmten Proben (LfL + LGL)	96	96
- der übereinstimmenden Ergebnisse	79	81
- der abweichenden Ergebnisse:	17	15
- LfL-positiv und LGL-negativ	16	14
- LfL-negativ und LGL-positiv	1	1

3.1.1.3 Screening der Proben auf die Anwesenheit von EPEC [LfL]

In diesem und dem folgenden Kapitel 3.1.1.4 sind die Ergebnisse der Analysen auf *eae* (EPEC) dargestellt, die nur von LfL-AQU vorgenommen wurden. Daher gingen hier für die Vergleiche auch nur die von LfL-AQU erhobenen Ergebnisse ein.

Abbildung 10 zeigt die prozentuale Aufgliederung der Nachweise von EHEC, EPEC und negativen Ergebnissen. Es wurden sowohl die Ergebnisse des Screenings der gesamten Prozesskette als auch der Einzelproben zusammengefasst dargestellt.

Die Summe der in Abbildung 10 als „EHEC/EPEC-negativ“ und „EPEC-positiv“ dargestellten Einstufungen entspricht der Einstufung mit der in den Abschnitten 3.1.1.1.1 und 3.1.1.1.2 verwendeten Bezeichnung „EHEC-negativ“ (s. auch Tabelle 20).

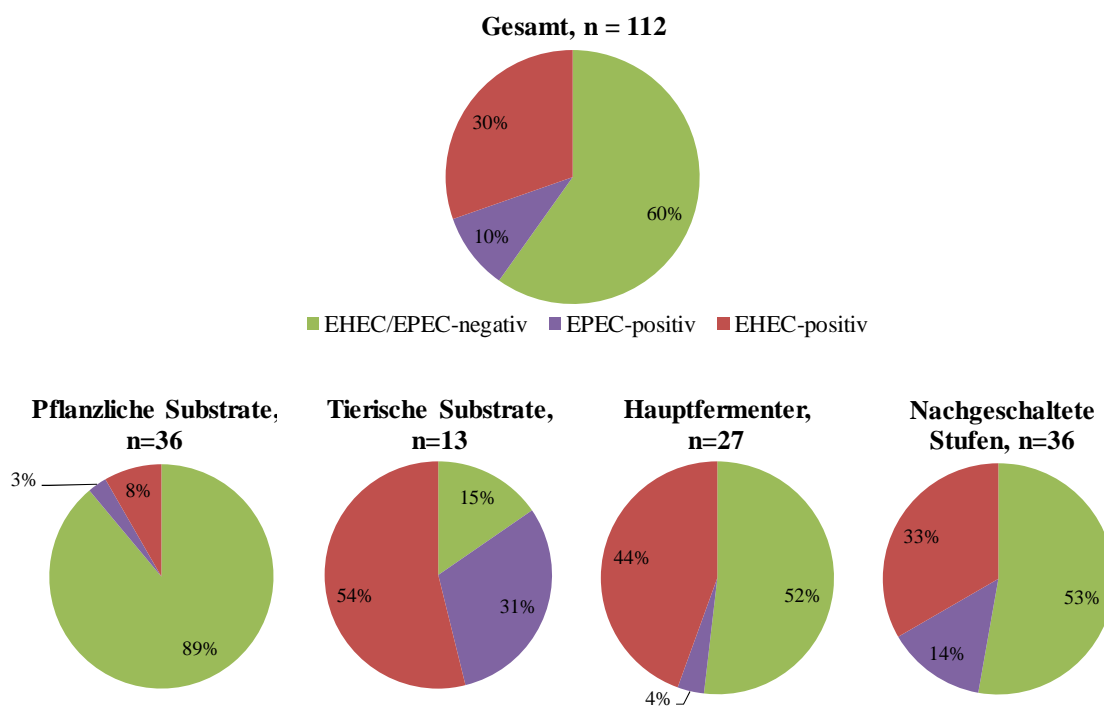


Abbildung 10: Verhältnis der Einstufungen als EHEC und EPEC in den Substrat-, Gärgemisch- und Gärprodukt-Proben aus Biogasanlagen [LfL]

Neu in dieser Darstellung (Abbildung 10) ist die weitere Untersuchung der EHEC-negativen Kulturen auf die Anwesenheit des *eae*-Gens und damit von EPEC-positiven Stämmen. Auch in den hier als „EHEC-positiv“ bezeichneten Ergebnissen können EPEC-Stämme enthalten sein. Da die untersuchte mTSB-Kultur eine Anreicherungs-Zellsuspension darstellt, können nebeneinander unterschiedliche Stämme – also EHEC und EPEC – wachsen. Die Anwesenheit des *eae*-Gens kann daher aus der Anwesenheit von EHEC- und/ oder EPEC-Stämmen resultieren. Die Fraktion „EPEC-positiv“ steht also für diejenigen Kulturen, in denen nur das *eae*-Gen und keine *stx*-Gene gemessen wurden (s. auch Tabelle 20).

Eine solche gesonderte Einstufung als EPEC fand für eines von 36 untersuchten pflanzlichen Substraten (2,8%), 4 von 13 tierischen Substraten (30,8%), einen von 27 Hauptfermenter-Inhalten (3,7%) und 5 von 36 Gärprodukten aus nachgeschalteten Prozessstufen (13,9%) statt (Abbildung 10). Insgesamt wurden 11 von 112 untersuchten Proben (9,8%) positiv für *eae* eingestuft.

Auch EPEC-Stämme sind humanmedizinisch durch die Auslösung von Diarrhö-Infektionen vorwiegend bei Kleinkindern relevant (s. auch 1.1.1). Der Anteil der EPEC-positiven Einstufungen war in dieser Studie teils relativ hoch. Wie auch für die EHEC-positiven Einstufungen war der Anteil der EPEC-positiven Einstufungen in den tierischen Substraten am höchsten, etwas geringer in den dem Fermenter nachgeschalteten Prozessstufen und am geringsten in Gärgemischen aus Hauptfermentern und in pflanzlichen Substraten.

Die Summe der EHEC- und EPEC-positiven Einstufungen war in den tierischen Substraten mit 84,6% sehr hoch. Nach diesen Ergebnissen findet ein Eintrag von EPEC in die Biogasanlage wie bei EHEC hauptsächlich über tierische Substrate statt. In Hauptfermentern und nachgeschalteten Prozessstufen war die Summe „EHEC“- + „EPEC-positiv“ nahezu gleich hoch mit 48,1% bzw. 47,2%. Das Verhältnis von EPEC- zu EHEC-positiven Ergebnissen stieg dagegen in den nachgeschalteten Prozessstufen an. Im Vergleich zu den tierischen Substraten haben die reinen EPEC-Nachweise im Verlauf der Prozesskette bis hin zu den nachgeschalteten Prozessstufen wie auch die EHEC-/EPEC-Nachweise abgenommen. Wie schon in 3.1.1.1.1 diskutiert, handelt es sich bei den Ergebnissen um qualitative Daten, d.h. es kann hieraus nicht auf eine quantitative Entwicklung der Keimzahlen im Fermenter rückgeschlossen werden.

#### 3.1.1.4 Verteilung der Genmarker *stx1*, *stx2* und *eae* in der Gesamtheit der untersuchten Proben (LfL)

Die Nachweisrate der mittels qPCR qualitativ untersuchten Genmarker *stx1*, *stx2* und *eae* ist in Abbildung 11 dargestellt. *E. coli*-Stämme werden als EHEC eingestuft, sobald sie mindestens ein *stx*-Gen tragen, und als EPEC-Stämme, sobald sie das *eae*-Gen tragen. Dabei können alle möglichen Kombinationen der Genmarker auftreten.

In dieser Studie wurden mTSB-Zellsuspensionen einer Anreicherung auf EHEC/EPEC untersucht. Diese können aus mehreren EHEC- und EPEC-Stämmen bestehen. Dabei wurde *stx1* und *stx2* mit einer sehr ähnlichen Nachweisquote von jeweils knapp einem Viertel der gesamten untersuchten Proben gefunden (Abbildung 11). Außer bei den tierischen Substraten, bei denen *stx1* 23,1% mehr positive Nachweise erzielte als *stx2*, betrug die Abweichung der Nachweisraten von *stx1* und *stx2* in den Proben-Kategorien

nur maximal 5,6%. Das Gen *eae* wurde außer bei den pflanzlichen Substraten häufiger nachgewiesen als die einzelnen *stx*-Gene.

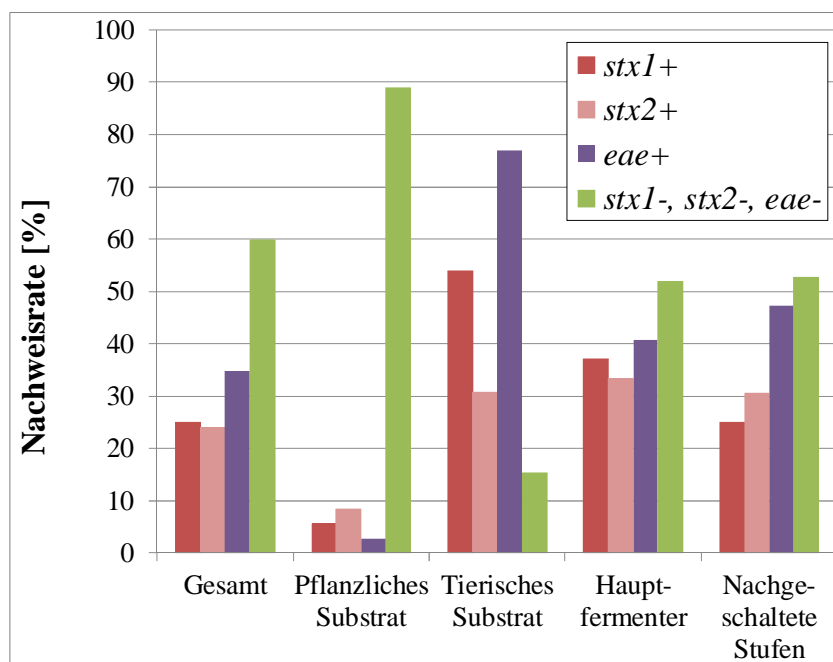


Abbildung 11: Nachweisrate der einzelnen Genmarker in 112 untersuchten Proben [LfL]

Eine weitere Aufgliederung der Nachweise in die unterschiedlichen Genmarker-Kombinationen ist in Abbildung 12 gezeigt. Den größten Anteil stellte nach der gesamt-negativen Genmarker-Kombination (*stx1-*, *stx2-*, *eae-*; „EHEC/EPEC-negativ“) die gesamt-positive Variante (*stx1+*, *stx2+*, *eae+*) mit Nachweisraten von bis zu 30,8% (tierische Substrate). Diese Variante kam in den untersuchten pflanzlichen Substraten nicht vor. Dieses Ergebnis kann aus einer Population resultieren, die Stämme mit beiden Shigatoxin-Genen sowie dem *eae*-Gen enthält. Wahrscheinlicher ist aber, dass eine komplexe Mischpopulation aus mehreren unterschiedlichen Stämmen mit jeweils einem, zwei oder allen drei Genmarkern enthalten ist.

Die zweithäufigste Genmarker-Kombination war die EPEC-Variante (*stx1-*, *stx2-*, *eae+*). Zellsuspensionen mit Genmarker-Kombinationen, die von den Shigatoxin-Genen nur *stx2* aufwiesen (*stx1-*, *stx2+*, *eae-* oder *stx1-*, *stx2+*, *eae+*), waren in Hauptfermenter und nachgeschalteten Stufen häufig vorzufinden, in den Substraten einzeln aber kaum präsent. Diese Genmarkerkombinationen können aber auch in den Varianten mit beiden Shigatoxin-Genen (*stx1+*, *stx2+*, *eae-* oder *stx1+*, *stx2+*, *eae+*) enthalten sein.

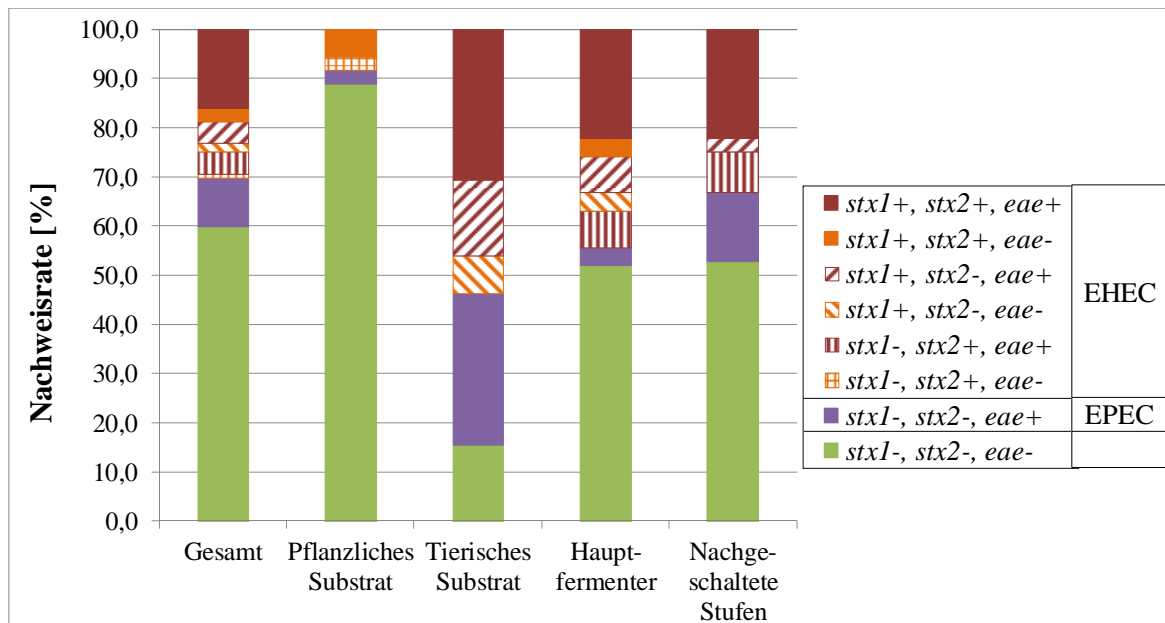


Abbildung 12: Nachweisrate der Genmarker-Kombinationen aus *stx1*, *stx2* und *eae* in 112 untersuchten Proben [LfL]

### 3.1.2 Untersuchungen zur Anwesenheit von *C. botulinum* [LfL + LGL]

Insgesamt wurden 157 Proben auf die Anwesenheit von *C. botulinum* hin untersucht. Am LGL konnte auf Grund der bereits bestehenden, etablierten Analytik schon im Herbst 2011 mit der Untersuchung der ersten Proben begonnen werden. Gesamt wurden am LGL 154 Proben untersucht. Nach Etablierung der mikro- und molekularbiologischen Nachweismethoden an LfL-AQU wurde ab Herbst 2012 mit der Analyse der Proben aus Praxisbiogasanlagen begonnen. Die Anzahl der untersuchten Proben betrug hier 106. 103 der von LfL-AQU untersuchten Proben wurden auch vom LGL untersucht. Diese unterlagen also einer Doppelbestimmung.

Die untersuchten Proben waren folgender Herkunft:

- 45 pflanzliche Substrate (Silagen, Getreideschrote, Landschaftspflegegut, etc.)
- 17 tierische Substrate (Güllen, Festmiste, etc.)
- 43 Gärgemische aus Hauptfermentern
- 52 Gärgemische aus nachgeschalteten Prozessstufen (Nachgärer, Endlager)

In keiner der untersuchten Proben wurde *C. botulinum* nachgewiesen (Abbildung 13). Einzel-Ergebnisse des Screenings zur Anwesenheit von *C. botulinum* in Substraten, Fermenterhalten und Gärprodukten von Biogasanlagen sind im Anhang (Kapitel 1) einsehbar.

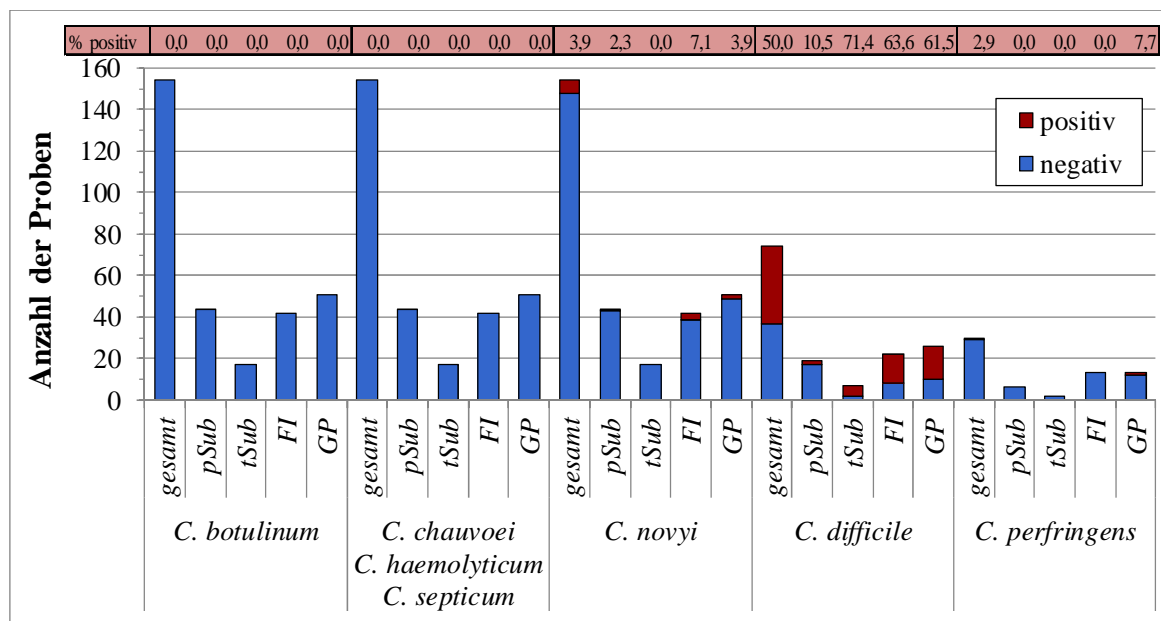


Abbildung 13: Häufigkeit des Nachweises der pathogenen *Clostridium* spp. und analysierte Probenanzahl (pSub: Substrat pflanzlicher Herkunft, tSub: Substrat tierischer Herkunft, FI: Fermenterinhalt aus dem Hauptfermenter, GP: Gärprodukt aus dem Fermenter nachgeschalteten Prozessstufen)

Dieses Ergebnis ist zunächst etwas überraschend, da *C. botulinum* und besonders seine Sporen eigentlich in Boden und Gewässersedimenten ubiquitär verbreitet sind (Tanner und Dack, 1922; Smith, 1978; Smith, 1980; Lúquez et al., 2005) und in Fäzes von Nutztieren nachgewiesen werden können (Klarmann, 1989). Dahlenborg et al. (2001; 2003) wiesen z.B. *bont/B* mit relativ geringer Abundanz ( $< 4$  Sporen  $\cdot$  g<sup>-1</sup>) in 62% und 73% der untersuchten Fäzes-Proben frisch geschlachteter Schweine und Rinder nach. Die Autoren entwickelten hierzu auf der Basis von Detektionswahrscheinlichkeiten eine Schätz-Methode für Konzentrationen unterhalb der analytischen Detektionsgrenze. Die Detektionsgrenze des in der vorliegenden Studie verwendeten qPCR-Systems für den Nachweis von *bont/A*, *bont/B*, *bont/E* und *bont/F* wurden auf 230, 920, 450 und 840 Kopien  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> für Reinkulturen bzw. auf 10 - 100 Kopien  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> innerhalb von Probenmatrizes (Honig, Dosenfisch) nach Anreicherung bestimmt (Messelhäusser et al., 2007a). Das Detektionslimit für das *ntnh*-qPCR-System lag für *C. botulinum* E2625 in Reinkultur bei 3,9 Kopien pro 25  $\mu$ L qPCR-Reaktionsansatz. Das entspricht  $1,6 \cdot 10^3$  Kopien  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> Reinkultur (die entsprechenden Daten hierzu werden im Abschlussbericht des Projekts „Entwicklung eines Schnellscreenings auf Pathogene in landwirtschaftlich relevanten Substraten“ (K/11/08) nachzulesen sein). Für *ntnh*-Analysen innerhalb einer Probenmatrix nach Anreicherung wurde kein Detektionslimit bestimmt, es müsste aber auf Grund des zwischengeschalteten Anreicherungs-schrittes theoretisch geringer sein als in Reinkultur und sollte ähnlich den in Messelhäuser et al. (2007) bestimmten Detektionslimits sein, da die selbe Anreicherungs-methode vor dem Einsatz in die qPCR angewendet wurde, mit der Ausnahme, dass das halbe Volumen an Ziel-DNA in die *ntnh*-qPCR eingesetzt wurde (2,5  $\mu$ L statt 5,0  $\mu$ L).

In anderen Studien wurde ebenfalls kein *C. botulinum* in Rinder-Fäzes gefunden (Tanner und Dack, 1922, Bagge et al., 2010) oder mit geringeren Nachweisraten (Notermans et al., 1985). Hoedemaker et al. (2014) fanden z.B. *bont*-Gene in 8 bis 23% von 1408 Rinder-

Kotproben bezogen auf verschiedene Fallgruppen, von denen auch Seyboldt et al. (2014) 1388 Proben untersuchten und eine Nachweishäufigkeit der *bont*-Gene von 2,2% fanden.

Daneben sollte berücksichtigt werden, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten Proben nicht direkt von Schlachttieren entnommen wurden, sondern Gülle-Proben waren, die durch Reinigungswasser, Regen oder die Ausscheidungen von nicht befallenen Tieren verdünnt sein konnten. Zudem wurden die zu analysierenden Proben vom Güllelager gezogen und können so bereits eine nicht genau bestimmbare Lagerzeit hinter sich haben. Der Lagerung von Gülle wird ebenfalls bereits eine hygienisierende Wirkung zugeschrieben (Strauch, 1996). Auch dieser Lagerungs-Effekt kann dazu beigetragen haben, dass die Ergebnisse dieser Studie zur Anwesenheit von *C. botulinum* durchwegs negativ ausgefallen sind.

Verschiedene weitere wissenschaftliche Studien befassten sich ebenfalls mit Hygiene-Aspekten des Biogasprozesses bzgl. *C. botulinum*. Bagge et al. (2010) konnten *C. botulinum* nach anaerober Vergärung von *C. botulinum*-haltigen Substraten (Schlachthausabfälle) nicht nachweisen. Tebbe et al. (2007) untersuchten Labor-Biogasanlagen, die mit Rindergülle, Schweinegülle, Geflügeltrockenkot und NaWaRo gefüttert wurden, und fanden ebenfalls keine Hinweise auf die Anwesenheit von *C. botulinum* oder anderen pathogenen *Clostridium* spp.. Eine weitere niedersächsische Studie untersuchte 105 Substrate und Gärprodukte aus 15 Praxis-Biogasanlagen mit negativem Resultat (Breves, 2011). Eine programm-basierte Metagenom-Analyse von mikrobiellen Populationen in mehreren Praxis-Biogasanlagen wies nur einen von mehr als  $2 * 10^6$  Gen-Abschnitten *C. botulinum* zu, welcher sich dann in einer händischen Auswertung mittels NCBI-Datenbankensuche als ähnlicher zu nicht-pathogenen *Clostridium* spp. herausstellte (Eikmeyer et al, 2013). Dohrmann et al. (2011) untersuchten methanogene Bioreaktoren, die mit Rinder- oder Schweinegülle beschickt wurden und fanden heraus, dass keine der erhaltenen 16S rRNA Gen-Sequenzen aus dem *Clostridium*-Cluster I eng mit pathogenen Spezies verwandt war.

In einer Studie wurde allerdings *C. botulinum* in Biogasanlagen nachgewiesen: Hier wurde *C. botulinum* zwar vereinzelt in den Substraten mehrerer Anlagen, aber nur in Gärresten einer Biogasanlage gefunden (Köhler, 2011). In einem weiteren Untersuchungszeitraum (1990 – 2012) wurden 5 von 74 untersuchten Gärresten positiv auf *C. botulinum* getestet (Köhler, 2012). Das Auftreten konnte in den meisten Fällen mit dem Einsatz verdorbener Substrate in Verbindung gebracht werden.

Insgesamt kann das Hygiene-Risiko, das von *C. botulinum* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen ausgeht, nach den Ergebnissen des vorliegenden Screening-Projekts und der Synthese der in der Literatur vorhandenen Studien als relativ gering eingeschätzt werden.

### 3.1.3 Untersuchungen zur Anwesenheit weiterer pathogener Clostridien

Unter dem Überbegriff weitere pathogene Clostridien wurden die Erreger *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. novyi* und *C. chauvoei* am LGL untersucht. An LfL-AQU wurden nur einzelne von Proben auf die Anwesenheit von *C. difficile* getestet.

### 3.1.3.1 Screening der Proben aus Praxisanlagen auf die Anwesenheit von *C. perfringens*

In nur einer von 34 am LGL untersuchten Proben wurde *C. perfringens* Typ A in 0,1 g Probenmaterial nachgewiesen (Abbildung 13). Auch weil die Anzahl der untersuchten Proben relativ gering war, lassen sich keine Trends ableiten. Die Nachweisrate war mit 2,9% für den ubiquitären Organismus erstaunlich gering. Der positive Nachweis erfolgte für einen separierten Gärrest, der durch eine Hitzebehandlung (70°C, 4 h) pasteurisiert und getrocknet wurde.

Aussagen in der Literatur zum Vorkommen von *C. perfringens* sind divergent. In einer Untersuchung von 7 Metagenom-Analysen aus Labor- und Praxisbiogasanlagen wurde kein Hinweis auf *C. perfringens* gefunden (Eikmeyer et al. 2013). Lebuhn und Wilderer (2006) wiesen dagegen im Verlauf der Prozesskette einer mit Rindergülle, Grassilage, Heu, Korn und Mineralmischung gefütterten Pilot-Biogasanlage unveränderte Belastungen mit *C. perfringens* von etwa  $10^3$  KBE bzw. Genome  $\cdot \text{mL}^{-1}$  des Frischgewichts nach. Bagge et al. (2005) fanden bei der Analyse von 4 Praxisbiogasanlagen mit vorgeschalteter Pasteurisierung sowohl in den Einsatzstoffen wie auch nach Behandlung eine Belastung mit *C. perfringens* von im Mittel  $2,5 \cdot 10^4$  KBE  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . Durch die Behandlung trat keine Reduktion des Keimes auf. Diese Anlagen behandelten u.a. tierische Nebenprodukte der Kategorie 3 wie Schlachtabfälle (Blut, Fett, etc.) und Bioabfall aus Haushalten oder der Gastronomie nach der europäischen Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 mit Durchführungsverordnung (EU) Nr. 142/2011. Auch weitere Studien fanden keinen Rückgang von *C. perfringens* in Spiking-Versuchen (Aitken et al., 2005; Lebuhn et al., 2005; Wagner et al. 2009).

### 3.1.3.2 Screening der Proben aus Praxisanlagen auf die Anwesenheit von *C. novyi*

Insgesamt wurden am LGL 154 Proben (44 pflanzliche Substrate, 17 tierische Substrate, 42 Fermenterinhalt, 51 nachgeschaltete Prozessstufen) auf die Anwesenheit von *C. novyi* untersucht. Dabei kam es zu 6 positiven Nachweisen (3,9%, Abbildung 13). Betroffen waren ein pflanzliches Substrat (2,3%), drei Fermenterinhalt (7,0%) und 2 Gärprodukte (3,9%) aus nachgeschalteten Prozessstufen.

Drei der positiv getesteten Proben wurden quantitativ nachuntersucht (s. 2.2.5). Die gemessene MPN lag für alle Proben bei  $< 3 \text{ MPN} \cdot \text{g}^{-1}$ .

*C. novyi* kann als Krankheitserreger für Mensch und Tier in Erscheinung treten. Dem Organismus wurde auch eine wichtige Rolle bei der Produktion von Butter- und Propionsäure in den Hydrolysereaktionen der anaeroben Vergärung zugeschrieben (Kim et al., 2010). Eine Metagenom-Analyse einer Biogas-produzierenden mikrobiellen Population enthielt ebenfalls Sequenzen mit Ähnlichkeit zu *C. novyi* (Schlüter et al, 2008). Diesen und den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge kann der Organismus durchaus im Prozess vorkommen, die in diesem Projekt gefundene Anzahl an Nachweisen und auch die gefundenen Keimkonzentrationen waren aber relativ gering.



### 3.1.3.3 Screening der Proben aus Praxisanlagen auf die Anwesenheit von *C. difficile*

Am LGL wurden im Jahr 2012 45 Proben auf *C. difficile* untersucht und 22 positive Nachweise erzielt. Dies entsprach einer Nachweisrate von 48,9%. Dabei waren

- 2 von 7 pflanzlichen Substraten (28,6%),
- 2 von 3 tierischen Substraten (66,7%),
- 8 von 15 Gärgemischen aus Hauptfermentern (53,3%) und
- 10 von 20 Gärprodukten aus nachgeschalteten Prozessstufen (50,0%) betroffen.

Bei 14 der 22 positiv getesteten Proben wurde eine quantitative Untersuchung über MPN-Verfahren (0) nachgeschaltet. Die Ergebnisse lagen alle unter der Nachweisgrenze von 3 MPN \* g<sup>-1</sup>.

In 15 von 29 (51,7%) an LfL-AQU Anfang des Jahres 2013 untersuchten Proben wurde ebenfalls *C. difficile* gefunden. Bezogen auf die Probenmatrix wurden positive Nachweise erzielt in

- 0 von 12 pflanzlichen Substraten (0,0%),
- 3 von 4 tierischen Substraten (75,0%),
- 6 von 7 Gärgemischen aus Hauptfermentern (85,7%) und
- 6 von 6 Gärprodukten aus nachgeschalteten Prozessstufen (100,0%).

Insgesamt sind von 74 Proben 37 positiv auf *C. difficile* getestet worden (Abbildung 13). Die damit sehr hohe Nachweisrate von 50% in der relativ geringen Anzahl von Proben dieser ersten sondierenden Untersuchungen deutet auf eine weite Verbreitung dieses Keims in landwirtschaftlich relevanten Substraten hin. In der Literatur sind kaum Daten zu *C. difficile* in Biogasanlagen hinterlegt. In einer Studie mit mesophil bzw. meso- und thermophil anaerob behandelten Klärschlämmen wurde *C. difficile* in 25% bzw. 38% der untersuchten Proben gefunden (Viau und Peccia, 2009). In Kläranlagen liegt zwar ein abweichendes Einsatzstoffspektrum im Vergleich zu Biogasanlagen vor, dennoch wurden hier ebenfalls hohe Vorkommen gemessen. In Metagenom-Analysen der mikrobiellen Populationen von verschiedenen Biogasreaktoren wurde dagegen kein Hinweis auf die Gegenwart pathogener *Clostridium* spp. und damit auch von *C. difficile* gefunden (Eikmeyer et al., 2013).

Auf Grund der relativ hohen Nachweisrate für eine allerdings eher geringe Anzahl an Proben dieser Studie und wegen des Fehlens weiter wissenschaftlicher Studien zu *C. difficile* in Biogasanlagen wird hier noch Forschungsbedarf gesehen.

### 3.1.3.4 Screening der Proben aus Praxisanlagen auf Anwesenheit von *C. haemolyticum*, *C. septicum* und *C. chauvoei*

*C. haemolyticum*, *C. septicum* und *C. chauvoei* wurden in 154 untersuchten Proben (44 pflanzliche Substrate, 17 tierische Substrate, 42 Fermenterinhalt, 51 nachgeschaltete Prozessstufen) nicht nachgewiesen (Abbildung 13). Angesichts der hohen Anzahl untersuchter Proben und des Fehlens der genannten Organismen wird die Bedeutung dieser Keime in Biogasanlagen und Gärprodukten als untergeordnet eingeschätzt.

Auch Ergebnisse aus der Literatur deuten z.T. Ähnliches an: In schwedischen Arbeiten wurden Biogasanlagen mit Gülle und Bioabfällen als Einsatzstoffen und mit einer Pasteurisierungsstufe untersucht. *C. septicum* wurde im Substrat (1 von 20 Abfall-Chargen aus zwei Schlachthäusern) gefunden, nicht aber vor der Pasteurisierung (homogenisierter

Substratmix), noch nach der Pasteurisierung oder nach der Vergärung (Bagge et al., 2010). *C. haemolyticum* und *C. chauvoei* wurden in diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen.

Dagegen konnte *C. septicum* in einer anderen Labor-Studie in einigen Proben während des gesamten Prozesses vor und nach der Pasteurisierung, sowie auch während der mesophilen und thermophilen anaeroben Vergärung nachgewiesen werden (Bagge, 2009a). In diesen Untersuchungen wurden *C. chauvoei* und *C. haemolyticum* aber ebenfalls nicht gefunden. In Spiking-Versuchen mit künstlicher Inokulation wurde *C. septicum* ebenfalls im Verlauf des gesamten Prozesses gefunden, während *C. chauvoei* und *C. haemolyticum* in den meisten Experimenten nach einer gewissen Zeit nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Bagge, 2009a). Bagge et al. (2009b) fanden *C. chauvoei* in 3 von 11 Praxis-Biogasanlagen vor Pasteurisierung, aber nicht nach Pasteurisierung oder nach Vergärung. Der Organismus wurde nicht in Boden- (84) oder Silageproben (4) und in nur einer Gülleprobe von 114 gefunden (Bagge et al., 2009b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sowie von Bagge (2009a, 2009b und 2010) führen zu der Schlussfolgerung, dass *C. haemolyticum* und *C. chauvoei* von geringer Relevanz im Kontext der anaeroben Vergärung in landwirtschaftlichen Biogasanlagen sind.

Wie *C. botulinum*, wird *C. septicum* im Boden und im Fäzes von Tier und Mensch gefunden (Songer, 1998). *C. septicum* kann die Krankheit Bradsot (Braxy, Labmagenpararauschbrand) in Schafen auslösen, die hauptsächlich aber nicht ausschließlich in Nordeuropa auftritt. Seltener wird auch von Krankheitserscheinungen in Kälbern und Pferden berichtet (Songer, 1996). *C. septicum* wurde von Bagge (2009a, 2010) vielleicht deshalb wiederholt gefunden, weil ein von den in dieser Studie untersuchten Anlagen (NaWaRo und Gülle) abweichender Substrat-Mix (Gülle, Schlachthausabfälle) eingesetzt wurde und der Organismus in nördlichen Ländern möglicherweise verbreiteter ist.

### **3.2 Screening in veterinär-/abfallrechtlich überwachten Biogasanlagen**

Screeninguntersuchungen, wie in 1.3.1 beschrieben, sollten auch für Einsatzstoffe, Gärgemische aus Hauptfermentern und Gärprodukte von mit Schlachtabfällen bzw. Küchenabfällen/Speiseresten betriebenen K 3-Biogasanlagen durchgeführt werden. Dies war im Projektzeitraum nicht möglich, da die dem LGL zugänglichen Anlagen zwar über eine Genehmigung zur Vergärung der oben genannten Materialien verfügten, im Projektzeitraum aber tatsächlich keine Vergärung solcher Materialien stattfand. Die Anlagen wurden dennoch doppelt beprobt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind mit in die Auswertung der anderen untersuchten Praxis-Biogasanlagen integriert (s. 3.1).

### **3.3 Keimträgerversuche in Labor-Biogasanlagen**

#### **3.3.1 Betriebsdaten der Labor-Biogasanlagen**

##### 3.3.1.1 Substrat-Variante M1

Bei der Substrat-Variante M1 (s. Tabelle 16) und einem Betrieb mit Raumbelastung  $2 \text{ kg oTS} * (\text{L}_{\text{FI}} * \text{d})^{-1}$  lag der Biogasertrag bei  $600 - 700 \text{ L}_{\text{N}} * \text{kg oTS}^{-1}$ . Bei einem Methangehalt

von 50 – 55 % entsprach dies einem Methanertrag von ca.  $350 \text{ L}_N \cdot \text{kg oTS}^{-1}$  (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Die Ammonium- ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) und entsprechend auch die daraus berechneten Ammoniak-Stickstoffgehalte ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) stiegen im Verlauf des Betriebs stetig an (Abbildung 16). Die  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration umfasste eine Spanne von ca.  $150 - 650 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

Während des mesophilen Betriebs kam es zu zwei Zeitpunkten zu einer Säureanreicherung (Abbildung 17). Im April 2013 stieg die Essigsäure- und im Oktober 2013 die Propionsäurekonzentration, sowie zu beiden Terminen der FOS/TAC-Quotient deutlich an. Zur Vermeidung eines Prozess-Zusammenbruchs die Raumbelastung in beiden Fällen verringert (s. graue Pfeile in Abbildung 14 bzw. Abbildung 15).

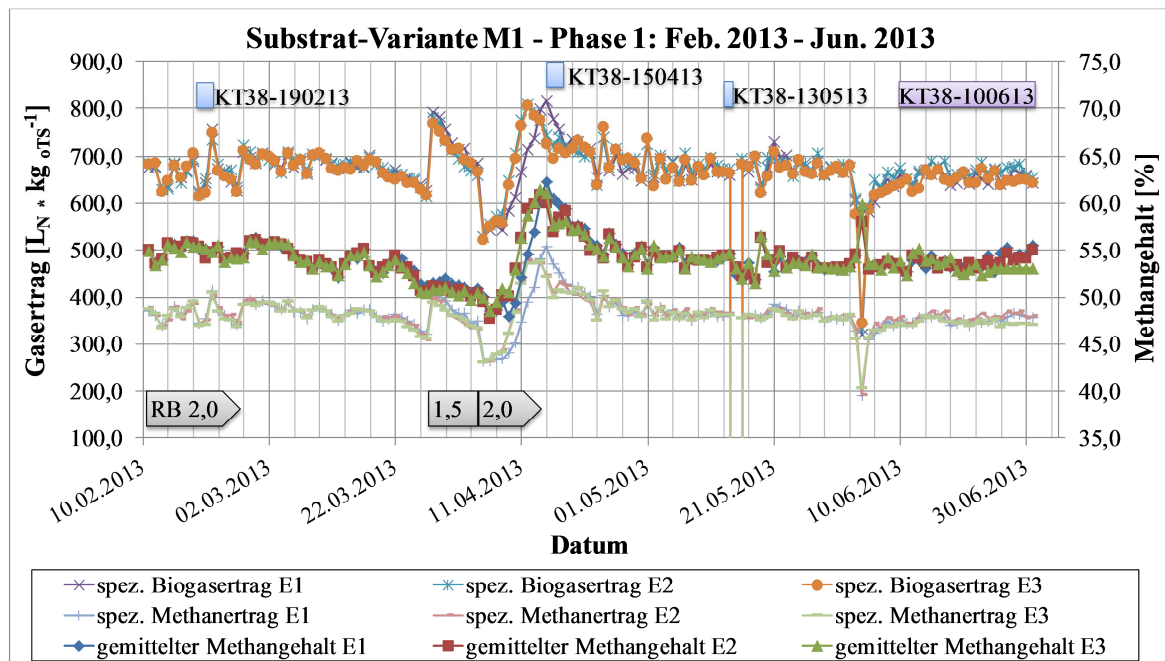


Abbildung 14: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt der Fermenter E1, E2 und E3 (Substrat-Variante M1; Phase 1: Feb. 2013 – Jun. 2013); blaue bzw. lila Felder: Keimträgerversuche mit EPEC bzw. *C. botulinum*

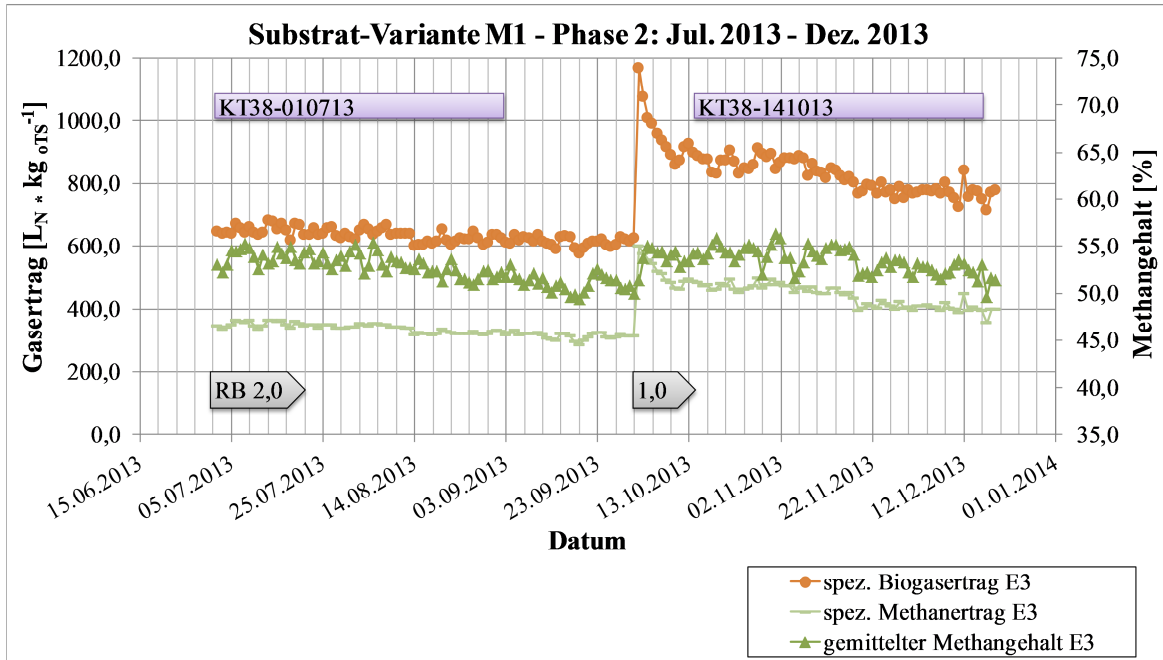


Abbildung 15: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt des Fermenters E3 (Substrat-Variante M1; Phase 2: Jul. 2013 – Dez. 2013); lila Felder: Keimträger-Versuche mit *C. botulinum*

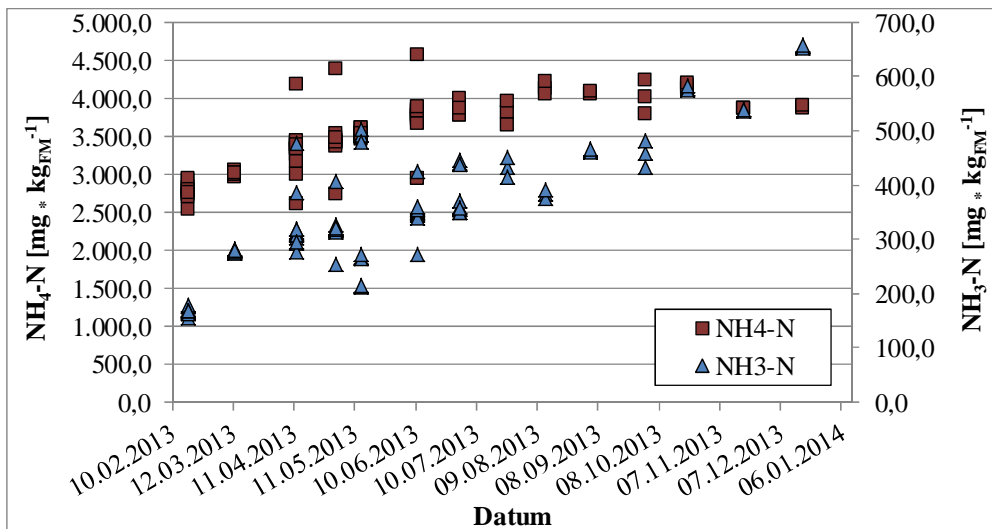


Abbildung 16: Gemessene Ammonium- und daraus berechnete Ammoniak-Stickstoffgehalte der Fermenter E1, E2 und E3 für die Substrat-Variante M1

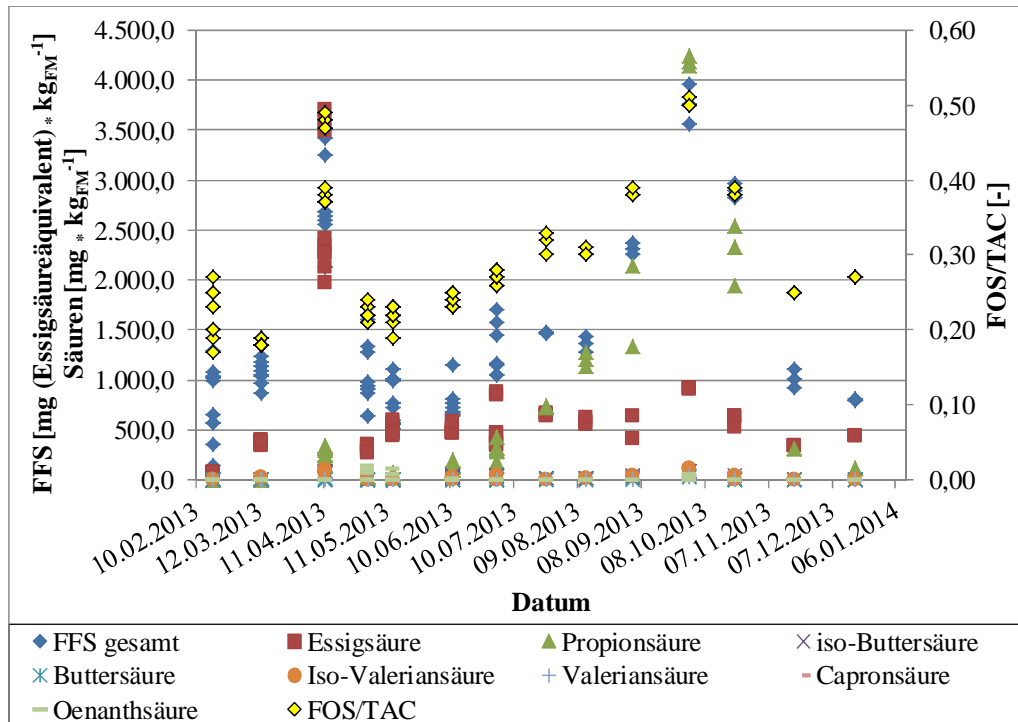


Abbildung 17: FOS/TAC und Säurekonzentrationen der Fermenter E1, E2 und E3 für die Substrat-Variante M1

### 3.3.1.2 Substrat-Variante T1

Im Oktober 2013 wurden zwei thermophile Keimträgerversuche in Fermentern der Substrat-Variante T1 (s. Tabelle 16) durchgeführt. Biogas- und Methanertrag sowie Methangehalt des produzierten Biogases sind in Abbildung 18 gezeigt. Der Biogasertrag lag im Mittel bei etwa  $750 \text{ L}_N \cdot \text{kg oTS}^{-1}$ , wodurch sich bei einem mittleren Methangehalt von 55% ein Methanertrag von ca.  $400 \text{ L}_N \cdot \text{kg oTS}^{-1}$  ergab. Bei Probenahme am 30.09.2013 wurden die in Tabelle 24 dargestellten Parameter aufgenommen. Die Ammoniak-Stickstoffkonzentration lag mit  $1168 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$  deutlich über dem durch Kaiser et al. (2007) bereits als hemmend für den Biogasprozess beschriebenen Wert von  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ .

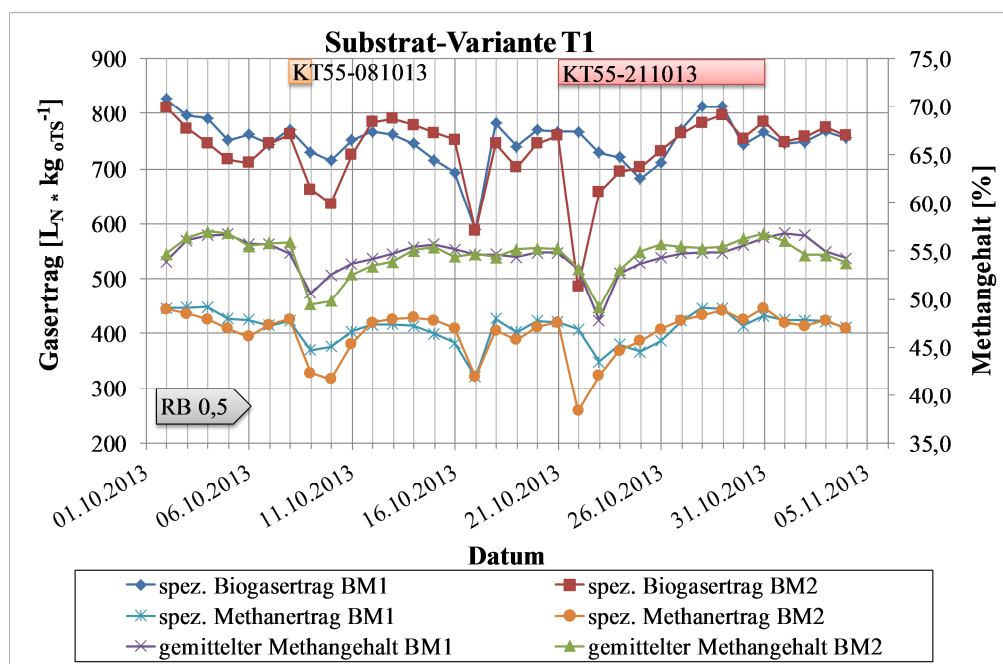


Abbildung 18: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt der Fermenter BM1 und BM2 (Substrat-Variante T1); orangefarbene bzw. rote Kästen: Keimträgerversuche mit EPEC bzw. *C. botulinum*

Tabelle 24: Gemittelte Ergebnisse der Laborparameter für Substrat-Variante T1 und T2

Parameter	Einheit	Substrat-Variante	
		T1*	T2**
TS	% FM	4,63	4,55
oTS	% TS	66,15	72,85
FFS gesamt	mg (Essigsäureäquivalent) * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	419,11	693,82
FOS/TAC	---	0,26	0,24
Essigsäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	179,58	331,01
Propionsäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	9,57	71,72
iso-Buttersäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	0,00	0,00
Buttersäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	0,00	0,00
Iso-Valeriansäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	0,00	0,00
Valeriansäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	0,00	0,00
Capronsäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	83,05	0,00
Oenanthensäure	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	0,00	0,00
pH	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	8,40	8,28
NH <sub>4</sub> -N	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	2499,59	2147,37
NH <sub>3</sub> -N	mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup>	1168,83	859,71

Mittelwerte der Fermenter \* BM1 und BM2 am 30.09.2013 bzw. \*\* E1 und E2 vom 27.01.2014 und 11.0

### 3.3.1.3 Substrat-Variante T2

Im ersten Quartal 2014 wurden die thermophilen Keimträgerversuche in Fermentern der Substrat-Variante T2 (s. Tabelle 16) wiederholt (Abbildung 19). Auf Grund der etwas unterschiedlichen Substrat-Zusammensetzung (s. Tabelle 16) wurden auch etwas abweichende Werte bei der Gasanalyse aufgenommen. Der Biogasertrag lag mit ca. 850  $L_N \cdot kg \text{ oTS}^{-1}$  etwas höher, der Methangehalt mit 50 – 55% etwas niedriger. Tabelle 24 listet die gemessenen Laborparameter zur entsprechenden Zeit für die Substrat-Variante T2. Die Bedingungen der Keimträgerversuche in beiden thermophilen Substrat-Varianten waren damit relativ ähnlich. Bei Variante T2 lagen geringfügig, aber unbedenklich mehr  $C_2$ - bzw.  $C_3$ -Fettsäuren vor und der Ammoniak-Stickstoffgehalt lag mit  $859 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$  etwas niedriger als bei Variante T1, aber noch immer deutlich über dem durch Kaiser et al. (2007) bereits als hemmend für den Biogasprozess beschriebenen Wert von  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ .

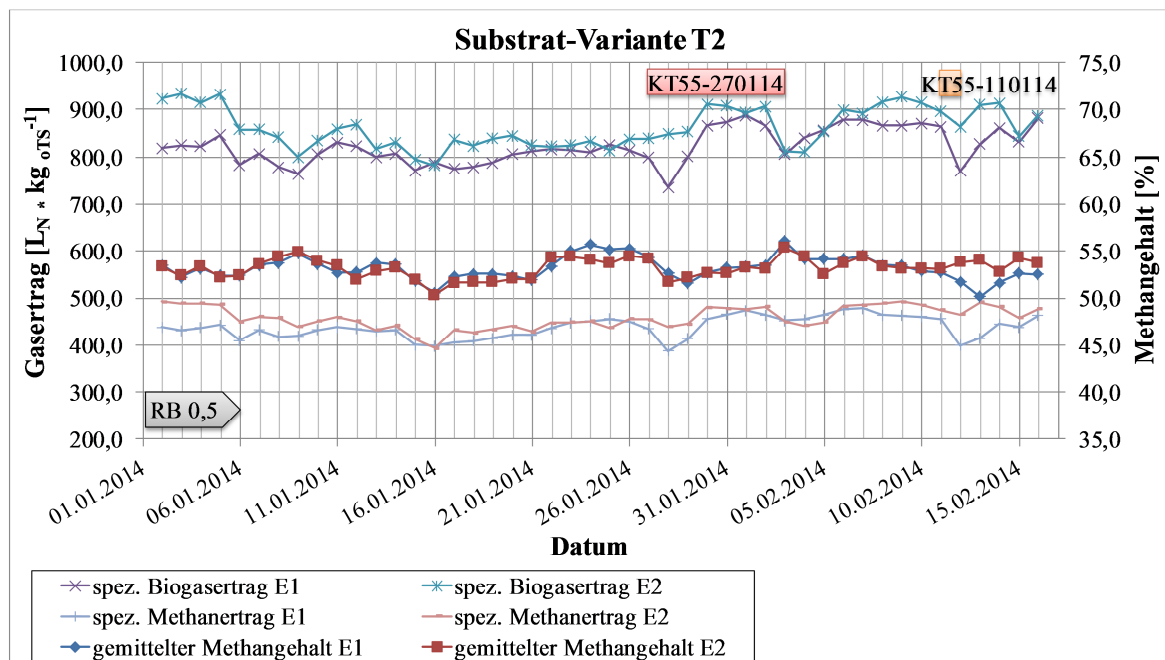


Abbildung 19: Biogasertrag, Methanertrag und Methangehalt der Fermenter E1 und E2 (Substrat-Variante T2); orangefarbene bzw. rote Kästen: Keimträgerversuche mit EPEC bzw. *C. botulinum*

## 3.3.2 Keimträgerversuche mit EPEC

### 3.3.2.1 Vorversuch: Anzucht des Inokulums für die Keimträgerversuche mit EPEC

Die aus der Zählung der ausplattierten Verdünnungsreihe (jeweils auf MH- und Endo-Agar, s. 2.6.3) erhaltenen Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) wurden auf die Zellkonzentration pro mL Zellsuspension hochgerechnet und über der Inkubationsdauer aufgetragen (Abbildung 20). Die Plattierung auf Endo-Agar wurde nur nach 3 und 4 h Inkubationsdauer vorgenommen. In der 3 h-Kultur wurden etwa 3 bis  $7 \cdot 10^8 \text{ KBE} \cdot \text{mL}^{-1}$  gemessen, nach 5 h waren es zwischen  $6 \cdot 10^9 \text{ KBE} \cdot \text{mL}^{-1}$  und  $1 \cdot 10^{10} \text{ KBE} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Nach ca. 3 h war die Kultur zu einer deutlichen Trübung angewachsen (optische Begutachtung), befand sich aber noch in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 20). Exemplarisch die KBE-Zahl des Stammes LGL 38122 betrachtend, kam es innerhalb der 4. Stunde des Wachstums noch zu einem Anwachsen auf das 10-fache, während sich der Stamm innerhalb der 5. Stunde der Bebrütung nur noch auf das 1,5-fache vermehrte.

Zur Inokulation der Keimträger wurde deshalb eine Zellsuspension nach 3 h Bebrütung („3 h-Kultur“) ausgewählt. Dabei wurde der Stamm EPEC LGL 38122 eingesetzt, da dieser im Vorversuch konsistent etwas höhere Zellkonzentrationen aufwies (Abbildung 20) und wegen seiner Herkunft (Umgebungsprobe eines Rinderstalls) als passend erschien.

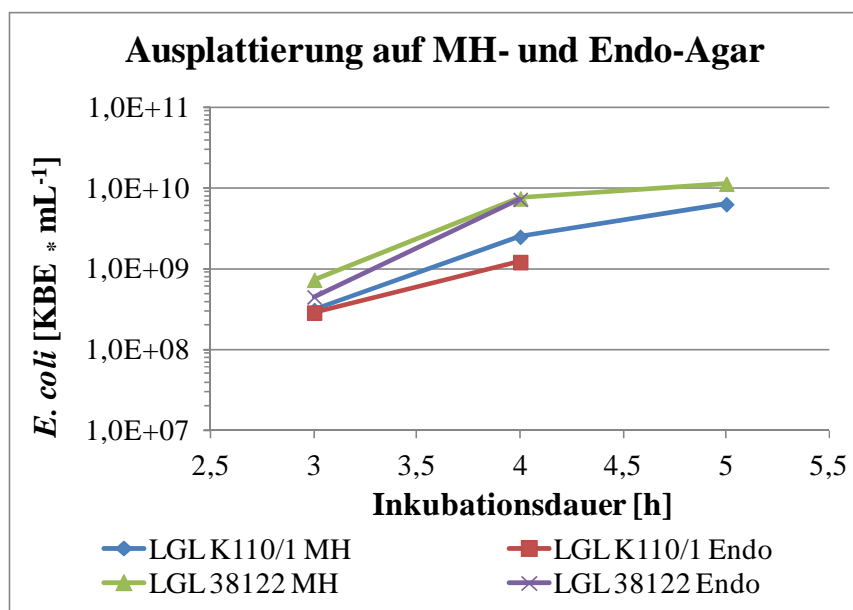


Abbildung 20: Zellzahl zweier EPEC-Stämme nach 3 - 5 h Inkubationszeit durch Ausplattierung und Zählung auf MH- und Endo-Agar

### 3.3.2.2 Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei mesophiler Gärtemperatur (38°C)

In Abbildung 21 und Tabelle 25 sind die Ergebnisse der drei bei 38°C durchgeführten Keimträgerversuche mit EPEC Stamm 38122 dargestellt. Die Keimzahl lag zum Start der drei Versuche zwischen  $9,3 \cdot 10^7$  und  $2,4 \cdot 10^8$  MPN \* mL<sup>-1</sup>.

Bei **KT38-190213** fand innerhalb von 24 h eine Reduktion um 1,6 log-Stufen bzw. 97,6% auf  $2,3 \cdot 10^6$  MPN \* mL<sup>-1</sup> statt.

In Versuch **KT38-150413** lag die Detektionsgrenze für den Ansatz 24 h Exposition bei  $2,8 \cdot 10^2$  und nach 48 und 72 h Exposition bei 2,7 MPN \* mL<sup>-1</sup>. In Abbildung 21 beginnt deshalb die Ordinate bei diesem 72 h-Wert. Für den 24 h-Wert kennzeichnet die blaue Fläche den Bereich, in dem die MPN \* mL<sup>-1</sup> nach der verwendeten Methode liegt. Dieser Bereich wird nach oben durch die Detektionsgrenze von  $2,8 \cdot 10^2$  MPN \* mL<sup>-1</sup> begrenzt. In diesem Versuch betrug das Ausmaß der Reduktion nach 24 h also mindestens 5,5 log-Stufen bzw. 99,9997% und nach 48 h 7,5 log-Stufen bzw. 99,999997%.



Bei **KT38-150313** konnte nach 6 h bereits eine geringe Reduktion des EPEC-Stamms um 0,4 log-Stufen gemessen werden. Nach 22 h waren von den anfänglich  $2,4 \cdot 10^8$  noch 86 MPN  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> nachweisbar. Die Abnahme betrug 6,4 log-Stufen bzw. 99,99996%.

Die Versuche wurden nacheinander durchgeführt (s. Tabelle 18). In diesem zeitlichen Ablauf stiegen die NH<sub>4</sub>-N- und damit auch die NH<sub>3</sub>-N-Konzentrationen merklich an. Während der NH<sub>3</sub>-N-Gehalt für KT38-190213 im Februar 2013 noch bei etwa 172 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> lag, war er für Versuch KT38-150413 im April 2013 auf 308 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> und für KT38-130513 im Mai 2013 auf 491 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> angestiegen (s. auch Abbildung 16, Tabelle 25). In KT38-150413 war zudem eine leichte Säureanreicherung festzustellen (s. Abbildung 17).

Die höheren Ammoniak-Stickstoff-Konzentrationen in den Keimträgerversuchen KT38-150413 und -130513 hatten möglicherweise einen Einfluss auf das Ausmaß der Reduktion. In diesen Versuchen schien der EPEC-Stamm pro Zeiteinheit stärker reduziert zu werden als im Versuch KT38-190213 mit geringeren NH<sub>3</sub>-N-Gehalten (Abbildung 21). Angesichts der dünnen Datenbasis sollte diese Aussage allerdings durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Ammoniak gilt allgemein als Hemmstoff für die Mikrobiologie des Biogasprozesses und wird häufig in Zusammenhang mit Prozessstörungen gebracht. Ammoniak wird beim Abbau stickstoffhaltiger Einsatzstoffe gebildet und wirkt als Entkoppler der ATP-Synthese. Er kann passiv in die Zellen diffundieren und beeinflusst die Gleichgewichte im Protonen- und/ oder Kalium-Gradient, damit auch den intrazellulären pH-Wert und möglicherweise die Aktivität verschiedener Enzyme (Chen et al., 2008). Bei Keimträgerversuchen mit Salmonellen im Rahmen des dieser Studie vorangegangenen Projekts „Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe“ (K/08/07) wurde für Salmonellen eine ähnliche Beobachtung gemacht. Kürzere Reduktionszeiten der Salmonellen traten hier ebenfalls bei höheren Ammoniak-Konzentrationen auf (Marín Pérez et al., 2013).

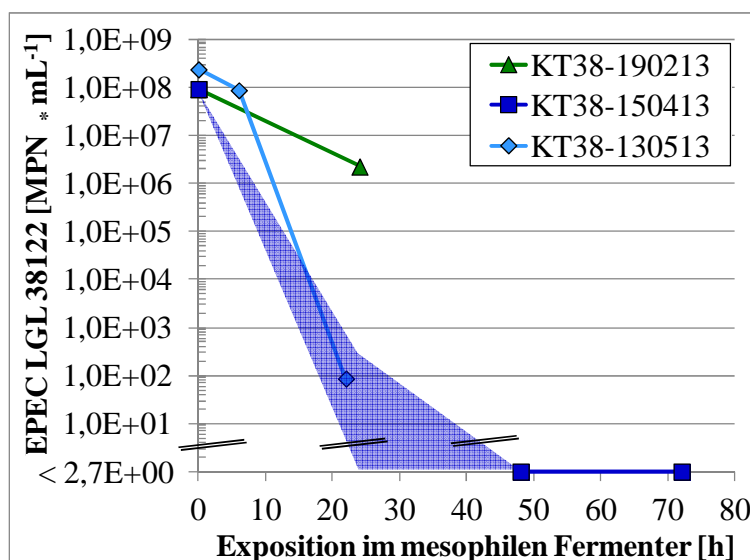


Abbildung 21: Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei 38°C

Um das Ausmaß der Reduktion in den unterschiedlichen Versuchen zu vergleichen, wurden dezimale Reduktionszeiten (D-Werte) berechnet. Dies ist die Zeit, die unter den

gegebenen Bedingungen für eine Reduktion um 90% benötigt wird. Für KT38-190213 lag der D-Wert bei 14,9 h, für KT38-150413 bei  $\leq 4,3$  h und für KT38-130513 bei 3,2 h (Tabelle 25). Die hier berechneten D-Werte geben insbesondere für KT38-190213 nur einen Anhaltspunkt, da sie z.T. nur auf zwei Datenpunkten beruhen. Die beiden Versuche bei höheren Ammoniak-Stickstoffkonzentrationen im Fermenter (KT38-150413 und KT38-130513) verliefen jedoch sehr ähnlich und die hieraus bestimmten D-Werte waren mit 3,2 h bzw.  $\leq 4,3$  h praktisch identisch, was auf eine gute Reproduzierbarkeit hinwies.

Tabelle 25: Keimzahlen, Reduktion und Ammoniak-Stickstoffgehalte der Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122

	Expo- sition	EPEC LGL 38122	Reduktion		Dezimale Reduktion		NH <sub>3</sub> -N	
			[d]	[MPN * mL <sup>-1</sup> ]	log-Stufen	[%]		[h]
KT38-	-190213	0	9,30E+07			14,9		172
		24	2,27E+06	1,6	97,564			
	-150413	0	9,30E+07					308
		24	2,77E+02	5,5	99,9997	$\leq 4,3$		
		48	2,74E+00	7,5	99,999997			
		72	2,73E+00	7,5	99,999997			
	-130513	0	2,40E+08					
		6	8,78E+07	0,4	63,4	3,2		
		22	8,61E+01	6,4	99,9999641			
KT55-	-081013	0	2,40E+08	0,0				
		1	8,78E-01	8,4	99,9999996	$\leq 0,11$	$\leq 6,4$	
		3	8,56E-01	8,4	99,9999996			
		6	8,44E-01	8,5	99,9999996			
	-110214	0	1,10E+08	0,3				
		0,5	9,00E-01	8,4	99,9999992	$\leq 0,06$	$\leq 3,5$	
		1	8,67E-01	8,4	99,9999992			

Doyle und Schoeni (1984) bestimmten das Wachstumsoptimum für *E. coli* O157:H7 in TSB-Medium auf 37°C, ähnlich wie für nicht pathogene *E. coli*. Reduktionseffekte allein durch die Temperatur sind im hier untersuchten mesophilen Prozess bei 38°C daher kaum von Bedeutung. Demnach verursachten andere Faktoren des umgebenden Milieus wie die Konkurrenz-Mikroflora und/ oder der bereits erwähnte Ammoniakgehalt die Reduktion.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass nicht pathogene und pathogene *E. coli* Stämme sehr ähnliche Reduktionsverhalten aufwiesen (Spinks et al., 2006; Aitken et al., 2007; s. auch 3.3.2.3). Der eingesetzte EPEC-Stamm LGL 38122 war ehemals ein EHEC-Stamm, der die *stx*-Gene verloren hatte und aller Kenntnis nach keine Gene trägt, die die Widerstandsfähigkeit verändern. Bei der Deutung der vorliegenden Ergebnisse wurde daher sowohl im mesophilen als auch im thermophilen Temperaturbereich von einer weitgehenden Übertragbarkeit des Reduktionsverhaltens des verwendeten EPEC-Stammes LGL 38122 auf EHEC-Stämme ausgegangen.

Andere Studien zur Reduktion von EHEC in der mesophilen, anaeroben Vergärung existieren kaum. Hoferer (2001) bestimmte für *E. coli* O157 einen D-Wert von 27,6 h bei 35°C in einer Laborbiogasanlage mit Rindergülle und Speiseresten in Kofermentation. Olsen und Larsen (1987) erhielten für die *E. coli* Serovare O8 und O147 im Vergleich zu den in diesem Projekt bestimmten relativ lange dezimale Reduktionszeiten von 1,8 d in Rinder- bzw. Schweinegülle bei 35°C. Diese Werte liegen z.T. mehr als 24 h höher als die in dieser Studie erhaltenen D-Werte. Gründe hierfür können u.a. die um 3°C abweichende Gärtemperatur und die durch die verschiedenen Einsatzstoffe bedingten unterschiedlichen Fermentations-Milieus (u.a. Ammoniak-Gehalte) darstellen.

### 3.3.2.3 Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei thermophiler Gärtemperatur (55°C)

In Abbildung 22 und Tabelle 25 sind die Ergebnisse der beiden bei 55°C durchgeführten Keimträgerversuche dargestellt. Bei thermophilen Prozessbedingungen waren bei KT55-081013 nach 1 h und bei KT55-110214 schon nach 30 min Exposition im Fermenter keine der anfänglich  $2,4 \cdot 10^8$  bzw.  $1,1 \cdot 10^8$  eingesetzten  $\text{MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$  mehr nachweisbar. Die Nachweisgrenze lag bei der verwendeten MPN-Methode bei  $0,27 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Demnach wurde eine Abnahme der EPEC um 8,6 log-Stufen bzw. 99,9999998% innerhalb der ersten 30 min Exposition erreicht. Aus KT55-081012 resultierte ein D-Wert (Reduktion um 90%) von  $\leq 6,4$  min. In KT55-110214 konnte eine bessere Auflösung erreicht werden, wobei sich ein D-Wert von  $\leq 3,5$  min ergab. Dieser Wert stellt immer noch einen Maximal-Wert dar, da auf Grund der benötigten Untersuchungszeit keine Daten zu kürzeren Expositionszeiten erhalten werden konnten.

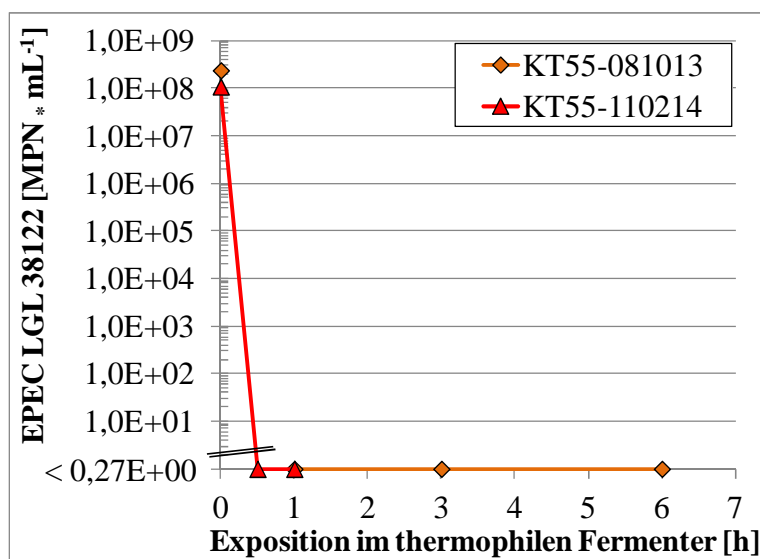


Abbildung 22: Keimträgerversuche mit EPEC LGL 38122 bei 55°C

Die  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen waren in beiden thermophilen Keimträgerversuchen relativ hoch (s. Tabelle 24 und Tabelle 25). Bei Fütterung mit Grassilage trat im Gärgemisch eine Anreicherung an Ammonium- und damit an Ammoniak-Stickstoff in diesen wie auch in früheren Versuchen auf. Geringere  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen - ähnlich wie bei mesophiler

Prozessführung - konnten bei dieser Art der Betriebsführung nicht erreicht werden. Vergleichende Untersuchungen mit geringeren Konzentrationen waren demnach nicht möglich. Es ist auch fraglich, ob eine Auswirkung des  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehaltes angesichts des sicherlich starken Einflusses der hohen Temperatur noch messbar gewesen wäre.

Die in diesem Projekt ermittelten D-Werte im thermophilen Betrieb decken sich gut mit D-Werten, die nicht-pathogene *E. coli* O3:H6 (D = 6,7 min) bzw. *E. coli* O157:H7 (D = 3,7 min) in deionisiertem Wasser bei 55°C bestimmt worden sind (Spinks, 2006). Dies bekräftigt die Hypothese, dass der Einfluss der thermophilen Temperatur für nicht angepasste Erreger im Gärgemisch prioritär für die Reduktion verantwortlich ist und andere Parameter dann eher untergeordnete Auswirkung haben. Aitken et al. (2007) bestimmten in Batch-Versuchen bei anaerober Vergärung von Rindergülle einen D-Wert von 10 min bei 55°C für einen Wild-Typ *E. coli*-Stamm sowie für *E. coli* O157:H7. Beide genannten Studien konnten zudem zeigen, dass *E. coli* O157:H7 sich sehr ähnlich bzw. sogar leicht sensitiver gegenüber den getesteten Bedingungen bei 55°C wie die nicht-pathogenen *E. coli*-Stämme verhielten, wodurch eine Verwendung auch nicht-pathogener *E. coli*-Stämme als Indikatoren für die Reduktion von EHEC im Prozess gerechtfertigt werden kann (Spinks, 2006; Aitken, 2007). Andere Studien bestimmten D-Werte von 1 – 5 min bei 55°C (Hoferer, 2001) bzw. 24 min bei etwas geringerer Temperatur (53°C) für andere *E. coli* Serovare (O4; O147; Olsen und Larsen, 1987), die daher ebenfalls in Einklang mit den in diesem Projekt bestimmten D-Werten bei 55°C stehen.

### 3.3.2.4 Reduktion von EPEC (Stamm LGL 38122) in ein- und mehrstufigen ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktoren

Im Modell eines ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktors, bzw. einer 2-stufigen Abfolge zweier ideal, gleichmäßig durchmischter Durchflussreaktoren kann die theoretische Keimreduktion in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) dargestellt werden (Abbildung 23). Hierbei wurde von einem Reaktorvolumen von 275m<sup>3</sup> pro Verfahrensstufe und einem täglichen Fütterungsvolumen von 7 m<sup>3</sup> für die 2-stufige Variante sowie von einem Reaktorvolumen von 550 m<sup>3</sup> und einem täglichen Fütterungsvolumen von 7 m<sup>3</sup> für die einstufige Verfahrensführung ausgegangen. Der Abstand zwischen den Fütterungen und damit die minimale, gesicherte Verweilzeit wurde auf 1 h festgelegt.

Im thermophilen Betrieb wurde ein D-Wert von < 3,5 min ermittelt (s. 3.3.2.3). Bei dieser spezifischen Dezimierungszeit wäre in einer einstufigen Anlage eine Keimzahlreduktion von > 42,9 log-Stufen bzw. in den einzelnen Stufen einer zweistufigen Anlage jeweils eine Keimzahlreduktion von > 42,6 log-Stufen theoretisch annehmbar. In der Summe der zweistufigen Anlage wären es > 85,3 log-Stufen.

Für die Keimträgerexperimente in mesophilen Fermentern wurde eine dezimale Reduktionszeit von 3,2, 4,3 bzw. 14,9 h errechnet (s. 3.3.2.2). Hierbei wäre eine Keimzahlreduktion von ca. 3,6, 3,4 bzw. 2,6 log-Stufen pro Verfahrensstufe einer zweistufigen Anlage zu erwarten. In einer einstufigen Anlage wären es 3,9, 3,7 bzw. 2,9; in der Summe der zweistufigen Verfahrensführung dagegen 7,2, 6,7 bzw. 5,2 log-Stufen.

Im Allgemeinen kann demnach die Keimreduktion durch eine räumliche Aufteilung des Prozesses in zwei Verfahrensstufen deutlich gesteigert werden. Bei Vergrößerung des Fermentationsvolumens im einstufigen Betrieb ist die Keimreduktion dagegen nur minimal gesteigert.

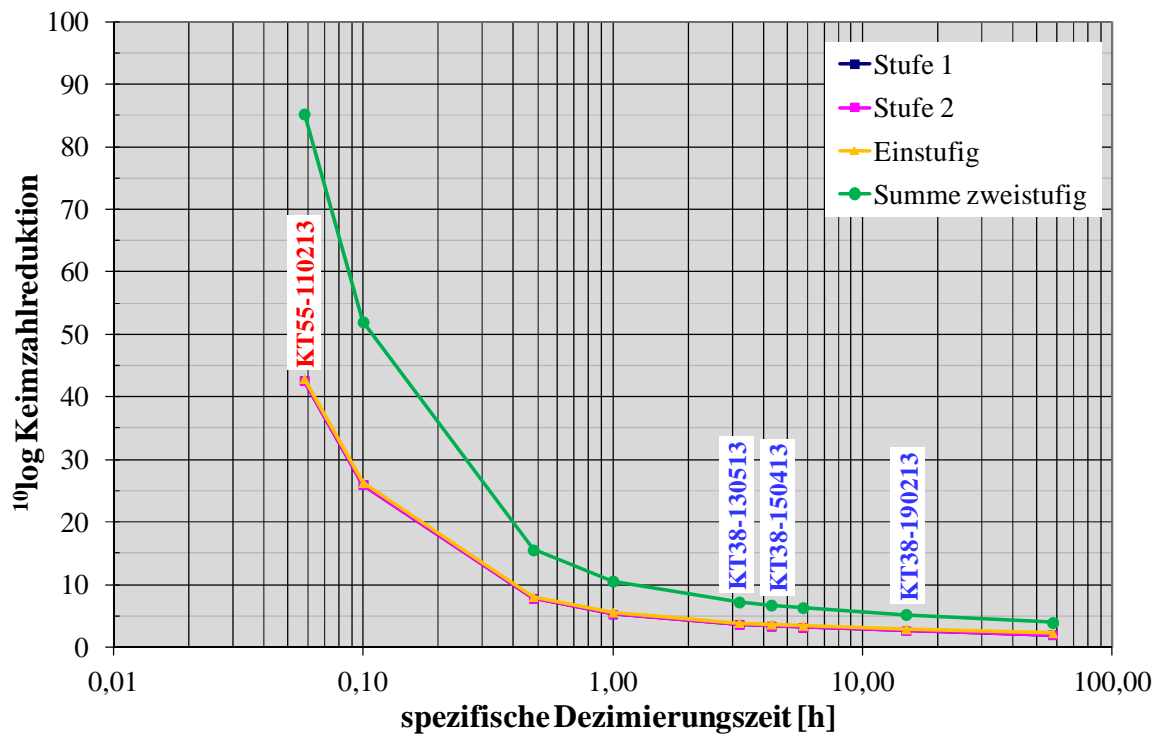


Abbildung 23: Reduktion von EPEC (Stamm LGL 38122) in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) in einem ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktor

### 3.3.3 Keimträgerversuche mit *Clostridium botulinum*

#### 3.3.3.1 Vorversuche zur Methodik-Etablierung: Anzucht des Inokulums, quantitative Analyse und getrennter Nachweis von vegetativen Zellen und Sporen

##### 3.3.3.1.1 Anzucht des Inokulums

Das Inokulum (Stamm LGL E2625) wurde in den beiden Vorversuchen KT38-240912 und KT38-120313 auf unterschiedliche Weise inokuliert und inkubiert. In Versuch KT38-240912 wurde eine Kolonie in 5 mL TPGY-Medium angezogen. Bei Plattierung auf EiL-Agar ergab sich eine deutlich höhere Zellkonzentration ( $1,5 \cdot 10^6$  KBE  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) als in KT38-120313 ( $10^4$  KBE  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, Tabelle 26), in dem aus einer flüssigen Vorkultur inokuliert und nur 24 h inkubiert wurde. Der Wert für Versuch KT38-120313 könnte etwas unterschätzt sein, da er auf dem Wachstum einer Kolonie (EiL, unerhitzt,  $10^{-3}$ , Tabelle 26) beruht. Die Verdünnungsstufen  $10^0$  bis  $10^{-2}$  wurden bei der Auswahl der zu plattierenden Verdünnungsstufen nicht berücksichtigt, da auf Grund des Vorversuches KT38-240912 eine höhere Ausgangszellkonzentration vermutet wurde.

Tabelle 26: Ergebnisse der Zählung des Wachstums von 100 µL Inokulum der Vorversuche auf EiL- bzw. Blut-Agar

	Verdünnungs- stufe	Vegetativ: unerhitzt		Sporen: 60°C, 15 min		Keimzahl [KBE * mL <sup>-1</sup> ]
		EiL	Blut	EiL	Blut	
KT38- 240912	1,0E-02	∞	0	---	---	1,5E+06
	1,0E-03	149	0	---	---	
	1,0E-04	16	0	---	---	
	1,0E-05	3	0	---	---	
	1,0E-06	0	0	---	---	
KT38- 120313	1,0E-03	1	0	0	0	1,0E+04
	1,0E-04	0	0	0	0	
	1,0E-05	0	0	0	0	
	1,0E-06	0	0	0	0	

∞ nicht zählbar, --- nicht bestimmt

Die Inkubationszeit wurde in KT38-120313 verkürzt, da die Inokulum-Kultur schon nach 24 h deutlich getrübt war, was in der Regel ausreichendes Wachstum anzeigt. Zudem sollte erreicht werden, dass die Kultur noch in der logarithmischen Phase zum Ansetzen der Keimträgerinhalte verwendet wird, um hauptsächlich lebensfähige Erreger einzusetzen. Da nach 24 h Inkubation eine zu geringe Konzentration lebensfähiger Einheiten vorlag, wurde das Inokulum in den folgenden Versuchen mit einer Kolonie *C. botulinum* LGL E2625 in 10 mL TPGY-Medium angeimpft und länger inkubiert (3 d, 30°C, anaerob). Damit stieg zwar die Wahrscheinlichkeit bereits mit dem Inokulum nicht lebensfähige Einheiten in den Keimträger einzubringen, zu einer Verfälschung der Ergebnisse kam es dennoch nicht, da die Quantifizierung des Keimträgerinhalts über eine Kombinationsmethode aus Kultivierungs-MPN und qPCR erfolgte (s. 2.2.3), bei der lebensfähige Zellen über deren Wachstum bestimmt werden, während nicht lebensfähige Einheiten ausgedünnt werden und damit weitgehend unberücksichtigt bleiben.

In beiden Vorversuchen trat bei Ausplattierung auf Blut-Agar kein Wachstum auf. Auch in späteren Versuchen war das Wachstum auf Blut-Agar schlechter als auf EiL-Agar (s. 3.3.3.1.3).

Eine getrennte Bestimmung des Sporenteils konnte durch die hier angewendete Plattierung mit Zählung der Koloniebildung allein nicht erfolgen. In KT38-120313 erfolgte zwar eine Plattierung auf Agar nach Hitze-Schock zur Bestimmung des Sporenteils, Koloniebildung konnte hier aber nicht beobachtet werden (Tabelle 26). Da erwartet wurde, dass auf festem Nährboden weniger vorteilhafte Bedingungen für die Sporenkeimung herrschen als in Flüssigkultur, wurden andere Ansätze zur Quantifizierung des Inokulums bzw. Keimträgerinhalts verfolgt (s. 3.3.3.1.2).

### 3.3.3.1.2 Quantifizierung des Keimträgerinhalts

Zur Quantifizierung des Keimträgerinhalts wurden vier unterschiedliche Methoden getestet:

- a) Quantifizierung des Inokulums durch Ausplattierung und Zählung gebildeter Kolonien, Berechnung der Keimkonzentration im Keimträgerinhalt

- b) Quantifizierung des Inokulums durch MPN-qPCR, Berechnung der Keimkonzentration im Keimträgerinhalt
- c) Quantifizierung des Inokulums durch Kultivierungs-MPN (Triplikate, Auswertung anhand der Trübung), Berechnung der Keimkonzentration im Keimträgerinhalt
- d) Quantifizierung der Keimkonzentration im Keimträgerinhalt über eine kultivierungsbasierte MPN aus der TPGY-Kultur und anschließender qPCR zur Identifikation *C. botulinum*-positiver Ansätze

**Methoden a, c und d** enthalten Kultivierungsschritte und quantifizieren demnach in der Regel nur lebensfähige Keime. **Methode b** dagegen kalkuliert die statistisch wahrscheinlichste Konzentration (MPN) von *C. botulinum* rein molekularbiologisch anhand der Anwesenheit der DNA des nachgewiesenen Gens *ntnh* und weist damit auch nicht mehr lebensfähige Einheiten nach.

**Methode b** erfasste erwartungsgemäß im Vergleich zu den kultivierungsbasierten Quantifizierungsmethoden (a, c, d) höhere Keimkonzentrationen (Abbildung 24). Die Unterschiede waren teils beträchtlich (> 3 log-Stufen in KT38-100613). Sie sind wahrscheinlich größtenteils auf den Nachweis der DNA nicht lebensfähiger Einheiten zurückzuführen. Es ist zudem möglich, dass ein unbekannter Anteil der Sporen-DNA mit erfasst wird, der bei Methode a nicht oder nur marginal mit in die Messung eingeht. Da die Zielsetzung bei den Keimträgerversuchen war, lebensfähige *C. botulinum*-Einheiten zu quantifizieren, wurde Methode b als nicht zielführend ausgeschlossen.

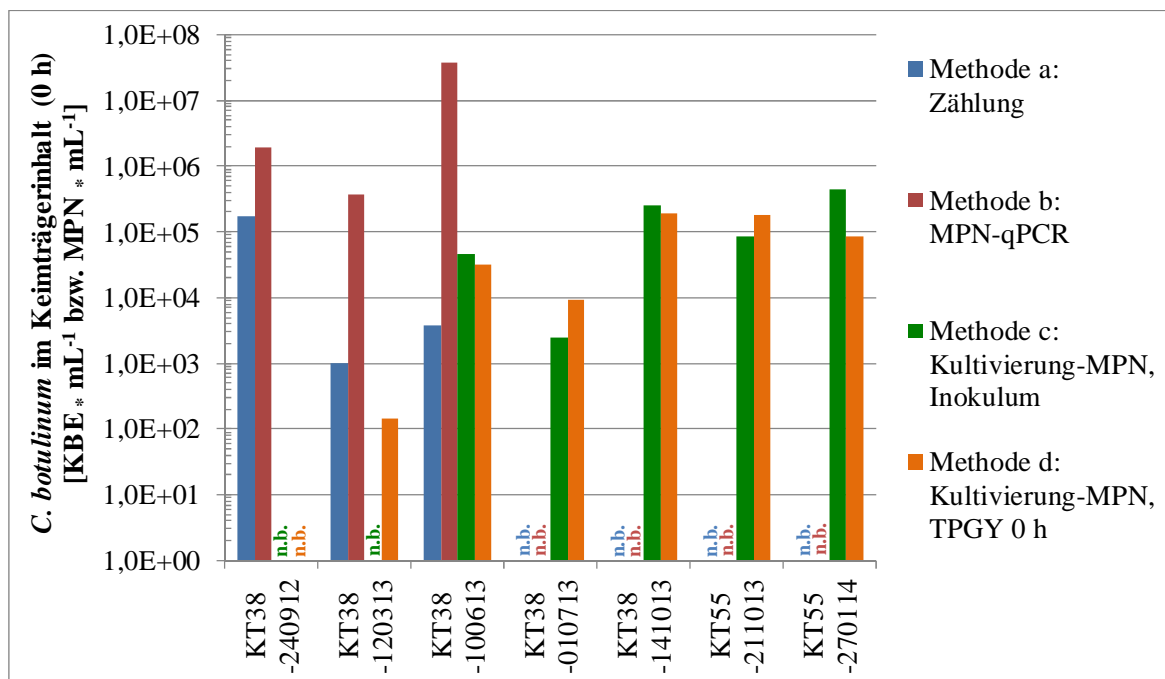


Abbildung 24: Vergleich der Quantifizierungsergebnisse im Keimträgerinhalt der Keimträgerversuche mit *C. botulinum* LGL E2625 (n.b.: nicht bestimmt)

**Methode a** hatte den Nachteil, dass nicht differenziert werden konnte, ob ein (bzw. welcher) Anteil der Sporen auskeimt und mit erfasst wird (s. 3.3.3.1.1).



**Methoden c und d** basieren beide auf der Kultivierungs-MPN mit dem Unterschied dass der Keimträgerstamm *C. botulinum* LGL E2625 bei c als Reinkultur quantifiziert wurde und bei d innerhalb einer komplexen Population des Keimträgerinhalts. Dadurch reichte bei c das Indiz der Trübung der Kultur für die Bestimmung *C. botulinum*-positiver Kulturen und damit der MPN-Indexzahl aus, während bei d eine spezifische Identifizierung über qPCR erfolgen musste. In beiden Methoden (c, d) wurde im Unterschied zu Methoden a und b eine Differenzierung des Anteils vegetativer Zellen und der Sporen erreicht, wie in 2.2.4 beschrieben. In Abbildung 24 sind Gesamtkeimzahlen (Anteil vegetativer Zellen + Sporenanteil) für die Methoden c und d dargestellt.

Im Vergleich der Methode c mit Methode d wurden in allen Fällen reproduzierbar sehr ähnliche Keimzahlen in den Keimträgerinhalten gemessen (Abbildung 24). Für die Verwendung der Ergebnisse aus Methode d sprach außer der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, dass die Keimkonzentrationen nach Inkubation mit der gleichen Methode bestimmt wurden und daher direkt vergleichbar waren. Als Startkeimzahl sind deshalb in den Ergebnissen der Keimträgerversuche mit *C. botulinum* nur die durch Methode d erzielten Werte aufgenommen (3.3.2.2 und 3.3.2.3). Durch Methode c erfolgte dennoch weiterhin eine Doppelbestimmung der Startkeimzahl.

### 3.3.3.1.3 Vergleich der Quantifizierungsergebnisse aus TPGY-Kultur (Methode d), von EiL-Agar und von Blut-Agar

Im Vorversuch KT38-240912 wurden sowohl die MPN-Verdünnungsstufen der TPGY-Kultur (Methode d, 3.3.3.1.2) als auch die Zellen auf EiL- und Blut-Agar (zum Kultivierungsablauf s. 2.2.2, Abbildung 3) mittels *ntnh*-qPCR untersucht. Die daraus kalkulierten MPN-Ergebnisse sind in Abbildung 25, Ziffer 1 gezeigt.

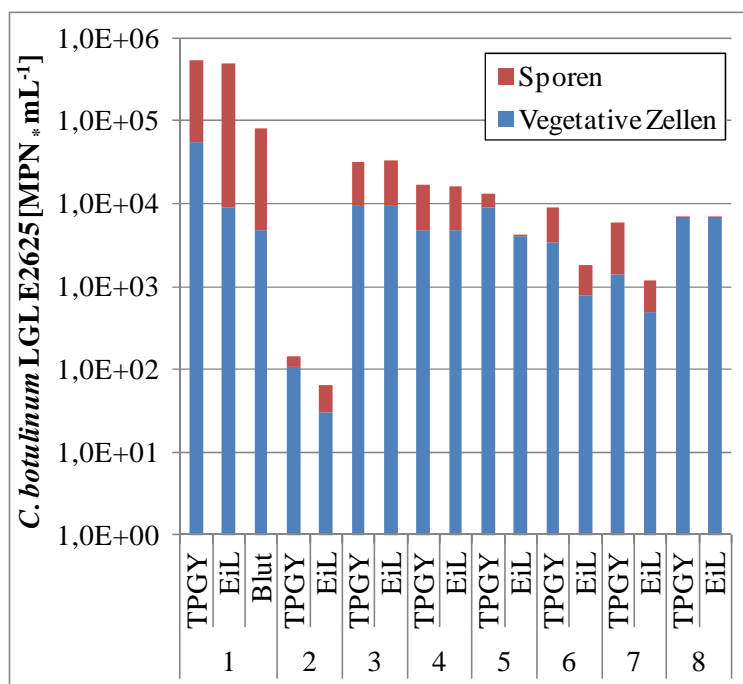


Abbildung 25: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Kultivierungs-MPN aus der TPGY-Kultur und der Kultivierung auf EiL- und Blut-Agarplatten (1: KT38-240912, 2: KT38-120313, 3-8: KT38-100613; TPGY, EiL, Blut: s. 2.2.2, Abbildung 3)



Die EiL-MPN lag um 8,7% niedriger als der TPGY-Wert, die Blut-Agar-MPN war sogar deutlich geringer (84,6%, 0,8 log-Stufen). Auch aus früheren Arbeiten am LGL war bekannt, dass das Wachstum von *C. botulinum* auf EiL-Agar gegenüber Blut-Agar besser ist. In den folgenden Versuchen wurde deshalb von der Verwendung des Blutagars zur Quantifizierung abgesehen.

Im Vorversuch KT38-120313 (Abbildung 25, Ziffer 2) wurde in einem niedrigeren Keimkonzentrationsbereich mit dem EiL-Wert ein um 54,5% geringerer Messwert erhalten als bei der Analyse der TPGY-Kultur. In KT38-100613 kamen neben identischen Ergebnissen (z.B. Ziffer 8 in Abbildung 25) Unterschätzungen bei den EiL-Varianten um bis zu 80,3% bezogen auf den jeweiligen TPGY-Wert vor.

Weitere Schwierigkeiten bereitete die Analyse niedriger Verdünnungsstufen ( $10^0$  bis  $10^{-3}$ ) der EiL-Zellsuspensionen. Solche MPN-Replikate lieferten keine Signale in der qPCR, obwohl sie der Erwartung nach positive qPCR-Ergebnisse erzielen sollten, da sie in der TPGY-Kultur und auch in höheren Verdünnungsstufen auf EiL-Agar (ab  $10^{-4}$ ) als *C. botulinum*-positiv eingestuft worden waren.

Mögliche Ursachen dafür liegen in

- der Zusammensetzung der Population in der jeweiligen Verdünnungsstufe: *C. botulinum* LGL E2625 wurde in einer relativ hohen Konzentration eingesetzt. Trotzdem sind in unverdünnten oder niedrig verdünnten TPGY-Kulturen andere Mikroorganismen ebenfalls in hoher Zahl vorhanden, deren Anwesenheit durch verschiedene Faktoren (z.B. Abgabe antimikrobieller Substanzen, Fraßdruck) das Wachstum des konkurrenzschwachen *C. botulinum* verhindert haben kann;
- der Auswahl der aufgenommenen Kolonien bzw. des aufgenommenen Teils des Bakterienrasens auf EiL-Agar: Die Auswahl der in MQ-Wasser aufgenommenen Kolonien für die qPCR erfolgte subjektiv. Jede visuell unterschiedliche Erscheinungsform auf EiL-Agar wurde mit der Impföse in einem Ansatz aufgenommen. Es besteht dennoch das Risiko, dass nicht alle auftretenden Mikroorganismen erfasst wurden.

Die Analyse der EiL-Zellsuspensionen wurde deshalb in weiteren Versuchen nur sporadisch durchgeführt. Die in den folgenden Kapiteln 3.3.3.2 und 3.3.3.3 dargestellten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Analyse der TPGY-Kulturen.

### 3.3.3.2 Keimträgerversuche mit *C. botulinum* (Stamm LGL E2625) bei mesophiler Gärtemperatur (38°C)

Es wurden drei Keimträgerversuche mit dem Sporenbildner *C. botulinum* (Stamm LGL E2625) im mesophilen Temperaturbereich (38°C) durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung sind in Abbildung 26, Abbildung 27 und Tabelle 27 zusammengestellt.

Im ersten Versuch (KT38-100613) wurde ein Expositionszeitraum von ca. 3 Wochen (22 d) abgedeckt. In den weiteren Versuchen wurde dieser Zeitraum auf bis zu 9 Wochen (63 d) ausgedehnt. Die Gesamtkeimzahl stellt die Summe des Anteils vegetativer Zellen und des Sporenteils von *C. botulinum* dar.

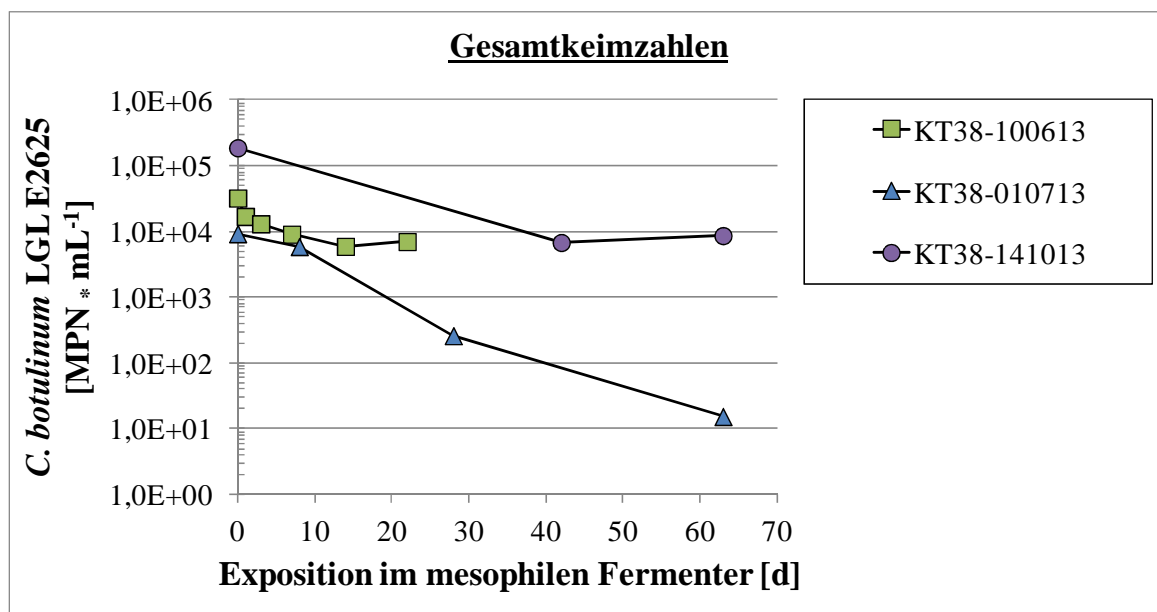


Abbildung 26: Keimträgerversuche mit *C. botulinum* LGL E2625 bei 38°C – Gesamtkeimzahlen (vegetative Zellen + Sporen)

### 3.3.3.2.1 Entwicklung der Gesamtkeimzahlen

Die Entwicklung der Gesamtkeimzahlen (vegetative Zellen + Sporen) von *C. botulinum* LGL E2625 bei 38°C ist in Abbildung 26 dargestellt.

In **KT38-100613**, wurde innerhalb von 22 d eine Reduktion der Gesamtkeimzahlen um 0,7 log-Stufen auf  $7,0 \cdot 10^3$  MPN \* mL<sup>-1</sup> erreicht. Dies entsprach einer Reduktion der zu Beginn eingesetzten Keimkonzentration von  $3,2 \cdot 10^4$  MPN \* mL<sup>-1</sup> um 78,2%.

Im zweiten Versuch, **KT38-010713**, waren von der etwas geringeren Startkeimzahl von  $9,3 \cdot 10^3$  MPN \* mL<sup>-1</sup> nach 28 d noch  $2,6 \cdot 10^2$  MPN \* mL<sup>-1</sup> bzw. nach 63 d noch 15 MPN \* mL<sup>-1</sup> nachweisbar. Es fand eine Reduktion um 1,6 bzw. 2,8 log-Stufen oder 97,2 bzw. 99,8% statt.

Der dritte Versuch, **KT38-141013**, startete mit der höchsten Gesamtkeimzahl von  $1,9 \cdot 10^5$  MPN \* mL<sup>-1</sup>. Nach 42 d und nach 63 d Exposition lagen sehr ähnliche Gehalte von  $6,8 \cdot 10^3$  MPN \* mL<sup>-1</sup> und  $8,7 \cdot 10^3$  MPN \* mL<sup>-1</sup> vor. Nach 63 d wurde damit eine Reduktion um 1,3 log-Stufen bzw. 95,4% erreicht.

Die mittlere, dezimale Reduktion wurde in den Keimträgerversuchen bei 38°C mit *C. botulinum* innerhalb von  $34,6 \pm 11,2$  d erreicht (Tabelle 27).

Studien zum Verhalten von *C. botulinum* in mesophilen Biogasanalgen existieren dem Wissensstand der Autoren in der Literatur bisher nicht. Bagge et al. (2010) untersuchten die Entwicklung der Keimzahl der *Clostridium* spp. als Gesamtheit in einer Praxisbiogasanlage bei 39°C und stellten eine leichte Reduktion fest.

Tabelle 27: Keimzahlen, Reduktion und Ammoniak-Stickstoffgehalte in den Keimträgerversuchen mit *C. botulinum* LGL E2625

	Exposition	Vegetative Zellen	Sporen	Gesamt-Keimzahl	Sporen-Anteil	Reduktion		Dezimale Reduktion	NH <sub>3</sub> -N		
						log-Stufen	[%]				
	[d]	[MPN * mL <sup>-1</sup> ]			[%]		[%]	[d]	[mg * kg <sub>FM</sub> <sup>-1</sup> ]		
KT38-	-100613	0	9,30E+03	2,30E+04	3,23E+04	71,2			38,4	354	
		1	4,75E+03	1,23E+04	1,70E+04	72,1	0,3	47,3			
		3	9,11E+03	4,03E+03	1,31E+04	30,7	0,4	59,3			
		7	3,48E+03	5,62E+03	9,10E+03	61,7	0,6	71,8			
		14	1,40E+03	4,56E+03	5,97E+03	76,5	0,7	81,5			
	22	6,77E+03	2,74E+02	7,04E+03	3,9	0,7	78,2				
	-010713	0	9,20E+03	9,20E+01	9,29E+03	1,0			21,9	387	
		8	5,76E+03	1,61E+02	5,92E+03	2,7	0,2	36,3			
		28	7,36E+01	1,88E+02	2,62E+02	71,9	1,6	97,2			
		63	1,42E+01	1,24E+00	1,54E+01	8,0	2,8	99,8			
	-141013	0	1,10E+05	7,80E+04	1,88E+05	41,5			43,4	508	
		42	1,20E+03	5,62E+03	6,82E+03	82,4	1,4	96,4			
		63	5,88E+03	2,81E+03	8,69E+03	32,4	1,3	95,4			
	KT55-	-211013	0	9,30E+04	9,30E+04	1,86E+05	50,0			1,2	1169
			1	7,44E+03	3,44E+03	1,09E+04	31,6	1,2	94,2		
3			1,44E+02	3,68E+02	5,12E+02	71,9	2,6	99,7			
10			6,30E+01	6,30E+01	1,26E+02	50,0	3,2	99,93			
-270114		0	4,20E+04	4,20E+04	8,40E+04	50,0			0,8	845	
		1	1,08E+04	2,02E+03	1,29E+04	15,7	0,8	84,7			
		3	1,38E+01	5,06E+00	1,88E+01	26,9	3,6	99,98			
		7	4,67E-01	4,67E-01	9,33E-01	50,0	5,0	99,9989			

## 3.3.3.2.2 Entwicklung der vegetativen Zellen und der Sporen

In allen drei mesophilen Keimträgerversuchen konnte beobachtet werden, dass die Verhältnisse der Konzentrationen von vegetativen Zellen und Sporen zueinander schwankten (Abbildung 27). Die Werte für die Sporenanteile lagen zwischen 3,9% und 82,4% (Tabelle 27). In KT38-100613 ergab sich nach 3 d und nach 22 d ein Anstieg der Konzentration vegetativer Zellen, während die Werte für die Sporen-Konzentration sanken. Nach 10 d konnte der umgekehrte Fall beobachtet werden: die Zahl der vegetativen Zellen sank, gleichzeitig stieg die Zahl der gemessenen Sporen. Im Prozess kam es wahrscheinlich immer wieder zu Phasen der Germination (Sporenkeimung) und der Sporulation. Insgesamt betrachtet sank aber sowohl die Anzahl der Sporen als auch der vegetativen Zellen im Verlauf aller drei mesophilen Keimträgerversuche.

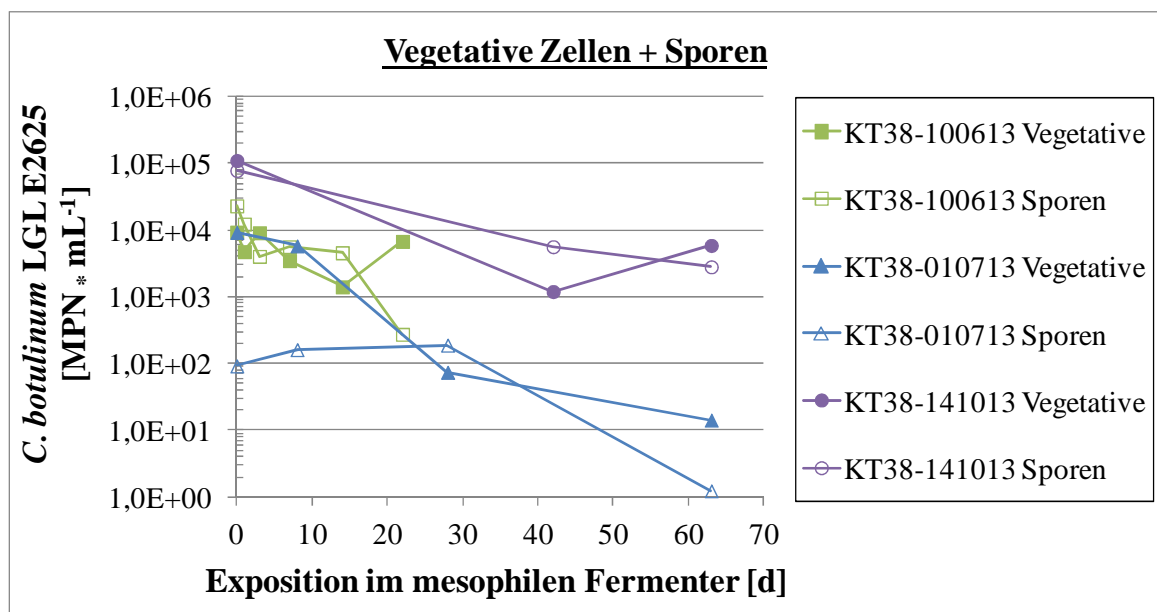


Abbildung 27: Keimträgerversuche mit *C. botulinum* LGL E2625 bei 38°C – Vegetative Zellen und Sporen

### 3.3.3.2.3 Gegenüberstellung der Keimreduktion und der Ammoniak-Gehalte

In Tabelle 27 sind die  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Gehalte in den Labor-Fermentern zum Zeitpunkt der Durchführung der Keimträgerversuche aufgeführt. Für KT38-100613 und -010713 betragen diese Werte  $< 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ . Bei KT38-141013 lag der Wert mit  $508 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$  etwas höher.

Ein Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die Dynamik der Germination und Sporulation beim Sporenbildner *C. botulinum* ist denkbar. Ungünstige Umgebungsbedingungen wie z. B. hohe Ammoniak-Gehalte könnten die Sporulation beschleunigen und die Germination verlangsamen. Ammoniak ist bekannt für seine Hemmwirkung auf Mikroorganismen und wird häufig mit Prozessstörungen in Verbindung gebracht. Yenigün und Demirel (2013) haben  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen zwischen  $337$  und  $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$  zusammengetragen, bei denen durch verschiedene Autoren erste inhibitorische Effekte auf den Biogasprozess festgestellt wurden.

In einem vorangegangenen Projekt wurden schnellere Reduktionszeiten für Salmonellen bei höheren Ammoniakgehalten festgestellt (Marín Pérez et al., 2012). Es ist daher auch möglich, dass der Sporenbildner *C. botulinum* dadurch Vorteile bei der Überdauerung hat, dass der Konkurrenzdruck durch die z. T. weniger Ammoniak-resistente Begleit-Mikroflora bei hohem Ammoniak-Gehalt geringer ist. Einige Studien haben nachgewiesen, dass das Wachstum von *C. botulinum* unter Konkurrenz-Druck verschiedener Organismen eingeschränkt ist (Smith, 1975; Girardin et al., 2002; Espelund und Klaveness, 2014). Verringert sich dieser Konkurrenzdruck, hat *C. botulinum* neben seiner Fähigkeit zur Sporenbildung einen weiteren Überdauerungsvorteil.

Unterschiede in der Entwicklung des Verhältnisses vegetativer Zellen zu Sporen zwischen den mesophilen Versuchen lassen sich aber wegen der kaum verschiedenen Ammoniak-Konzentrationen (Abbildung 27) kaum diskutieren. Es fiel aber auf, dass für KT38-141013 mit dem leicht höheren Ammoniak-Gehalt mesophil die längste dezimale Reduktionszeit gemessen wurde. In diesem Versuch wurden auch nur Sporenanteile  $>$

30% gemessen, in den anderen mesophilen Versuchen waren diese z.T. niedriger (Tabelle 27).

#### 3.3.3.2.4 Vergleich mit den Ergebnissen der mesophilen Keimträgerversuche mit EPEC:

Die Reduktion von *C. botulinum* LGL E2625 verlief im mesophilen Temperaturbereich deutlich langsamer als die von EPEC. *C. botulinum* zeigte sich insbesondere durch die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen offenkundig entschieden resistenter gegenüber den Bedingungen im mesophilen Biogasprozess. Dennoch fand eine deutliche Reduktion statt.

#### 3.3.3.3 Keimträgerversuche mit *C. botulinum* (Stamm LGL E2625) bei thermophiler Gärtemperatur (55°C)

Die Ergebnisse der zwei bei 55°C durchgeführten Keimträgerversuche sind in Abbildung 28 und Abbildung 28 dargestellt. Die zu Grunde liegenden Keimzahlen sind in Tabelle 27 zusammen mit den zum Zeitpunkt der Durchführung vorherrschenden Ammoniak-Stickstoffgehalten aufgelistet.

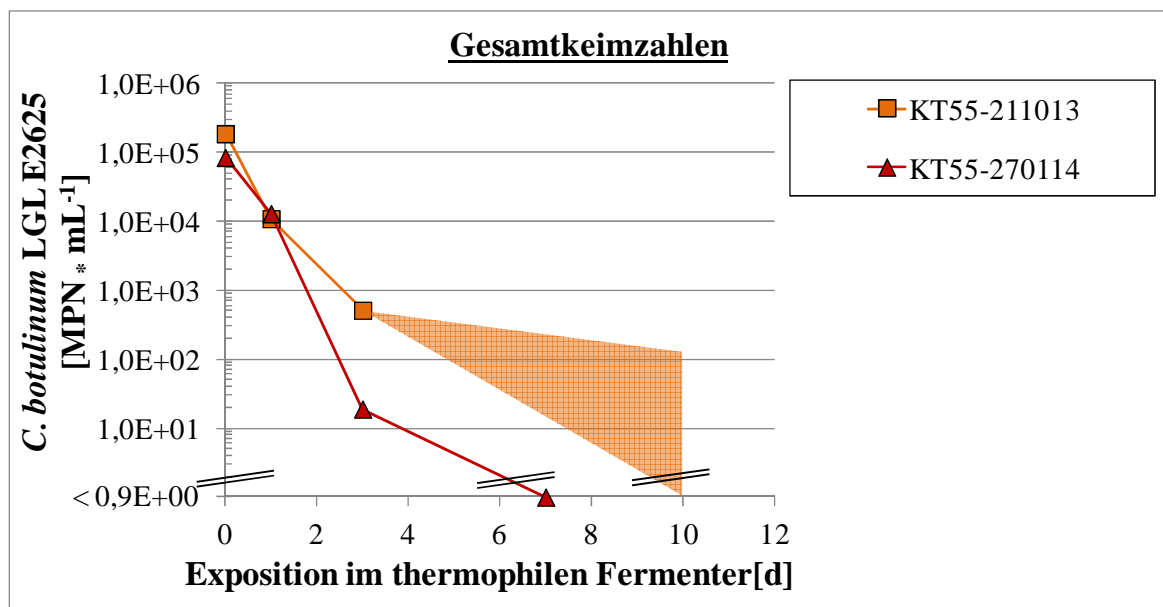


Abbildung 28: Keimträgerversuche mit *C. botulinum* LGL E2625 bei 55°C – Gesamtkeimzahlen

##### 3.3.3.3.1 Entwicklung der Gesamtkeimzahlen:

In **KT55-211013** konnten die MPN-Werte bis 3 d Expositionszeit genau bestimmt werden (Abbildung 28). Beim 10 d-Ansatz lag die Nachweisgrenze bei 126 MPN \* mL<sup>-1</sup>. Dieser Wert stellt die obere Grenze des in Abbildung 28 orange gefärbten Wertbereichs für die Gesamtkeimzahlen dar. Wird diese Obergrenze berücksichtigt, bewirkte die Exposition von 10 d in diesem Keimträgerversuch eine Reduktion um mindestens 3,2 log-Stufen bzw. 99,93%. Schon nach 1 d waren die anfänglich vorhandenen  $1,9 * 10^5$  MPN \* mL<sup>-1</sup> um 1,2 log-Stufen (94,2%) und nach 3 d um 3,6 log-Stufen (99,7%) reduziert. Aus der Keimzahlentwicklung innerhalb der ersten 3 d wurde ein D-Wert von 1,2 d berechnet (s. Tabelle 27).

Durch methodische Verbesserungen konnte in Versuch **KT55-270114** eine niedrigere Nachweisgrenze von  $0,9 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$  erreicht werden. Deshalb beginnt die Ordinate in Abbildung 28 mit dem Wert  $< 0,9 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Er resultiert aus der MPN-spezifischen untersten, statistisch gesicherten Nachweisgrenze von  $< 0,3 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$  multipliziert mit den methodenspezifischen Faktoren (s. 2.6.2).

Innerhalb des ersten Versuchstages fand eine im Vergleich zu KT55-211013 etwas geringere Reduktion um 0,8 log-Stufen (84,7%) statt. Nach 3 d hatte *C. botulinum* bereits um 3,6 log-Stufen (99,98%) und nach 7 d sogar um 5 log-Stufen (99,999%) abgenommen.

Wie auch bei den mesophilen Keimträgerversuchen mit *C. botulinum* (3.3.3.2) war auffällig, dass bei den thermophilen Versuchen eine etwas deutlichere Reduktion im Fermenter mit der geringeren  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration ( $845 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  bei KT55-270114) gemessen wurde. Ob dieser Effekt tatsächlich durch den Ammoniak bedingt ist, z.B. durch vorteilhaftere Wachstums- bzw. Überlebensbedingungen für den Sporenbildner *C. botulinum* gegenüber der mikrobiellen Umgebungsflora, lässt sich anhand der dünnen Datengrundlage nur als Arbeitshypothese formulieren. Weitere Untersuchungen wären zur Klärung erforderlich.

Wie auch für den ersten mesophilen Keimträgerversuch, wurde der D-Wert für KT55-270114 nur aus der Keimzahl-Entwicklung der ersten 3 d berechnet, da der 7 d- Wert bereits an der Nachweisgrenze lag und nicht bekannt ist, zu welchem Zeitpunkt die Keimkonzentration erstmals die Nachweisgrenze erreichte. Die dezimale Reduktionszeit betrug in diesem Versuch 0,8 d (s. Tabelle 27).

Damit ergab sich für den thermophilen Betrieb eine mittlere, dezimale Reduktionszeit von  $1,0 \pm 0,2 \text{ d}$ .

Die Ergebnisse stehen mit denen in der Literatur im Einklang. Bagge et al. (2010) berichteten bei einer thermophil ( $52^\circ\text{C}$ ) betriebenen K2-Biogasanlage von einer Reduktion pathogener *Clostridium* spp. um  $\geq 2,5$  Log-Stufen. Nach anaerober Vergärung mit einer hydraulischen Retentionszeit von 26 d fand hier kein positiver Nachweis mehr statt.

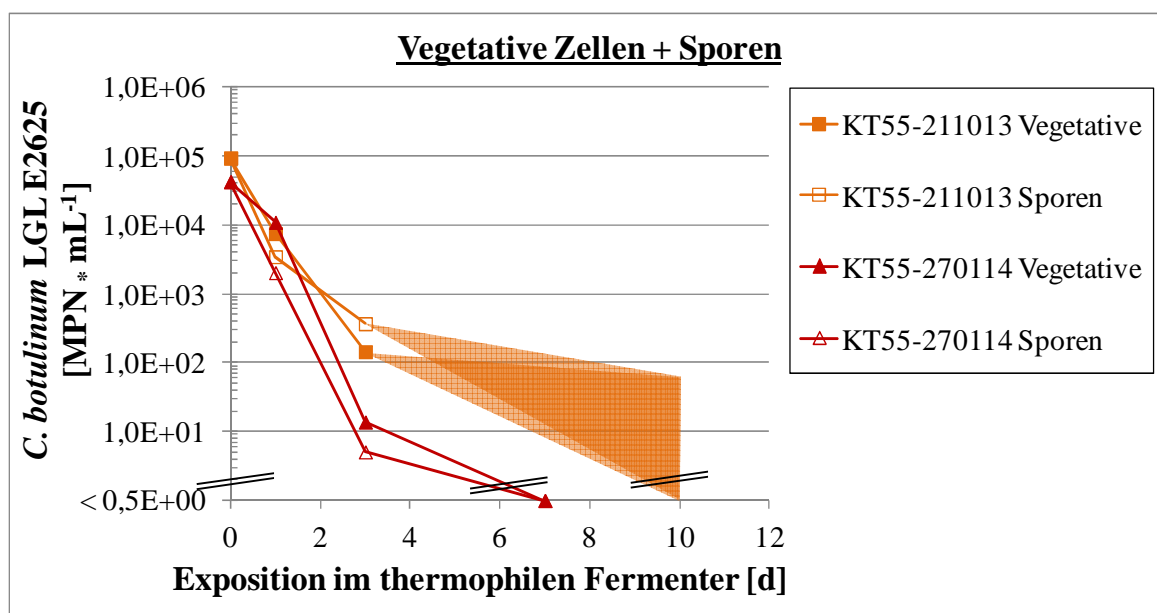


Abbildung 29: Keimträgerversuche mit *C. botulinum* LGL E2625 bei  $55^\circ\text{C}$  – Vegetative Zellen und Sporen

### 3.3.3.3.2 Entwicklung der vegetativen Zellen und der Sporen:

Auch im thermophilen Betrieb schwankten die Anteile der vegetativen Zellen und Sporen zueinander (Abbildung 29). Bei KT38-211013 mit vergleichsweise höherer Ammoniak-Stickstoffkonzentration waren die Sporenanteile wie im mesophilen Betrieb (KT38-141013, s. 3.3.3.2) immer > 30%, während bei KT38-270114 auch geringere Sporenanteile gemessen wurden (Tabelle 27).

### 3.3.3.4 Reduktion von *C. botulinum* (Stamm LGL E2625) in ein- und mehrstufigen ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktoren

Die Reduktion von *C. botulinum* LGL E2625 ist im Modell des ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktors, bzw. einer 2-stufigen Abfolge zweier ideal, gleichmäßig durchmischter Durchflussreaktoren in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) dargestellt (Abbildung 30). Es wurden dieselben Anlagen- und Betriebsparameter angenommen wie in Kapitel 3.3.2.4. In Abbildung 30 sind neben Beispiel-D-Werten die in den Keimträgerversuchen errechneten D-Werte für *C. botulinum* LGL E2625 eingetragen. Bei einem D-Wert von 1 d im thermophilen Betrieb würde durch die Vergärung in der einstufigen Variante eine Reduktion von *C. botulinum* um 2,7 log-Stufen erreicht werden, in der Summe der zwei Einzelstufen im zweistufigen Betrieb sogar eine Abnahme um 4,7 log-Stufen. Im mesophilen KT38-141013 lag die dezimale Reduktionszeit bei 43,4 d, d.h. bei der hier angenommenen Konstellation wäre noch eine Reduktion um eine log-Stufe (90%) im einstufigen Betrieb möglich. Im zweistufigen Betrieb würde eine Abnahme um 1,5 log-Stufen bzw. 96,8% erreicht werden.

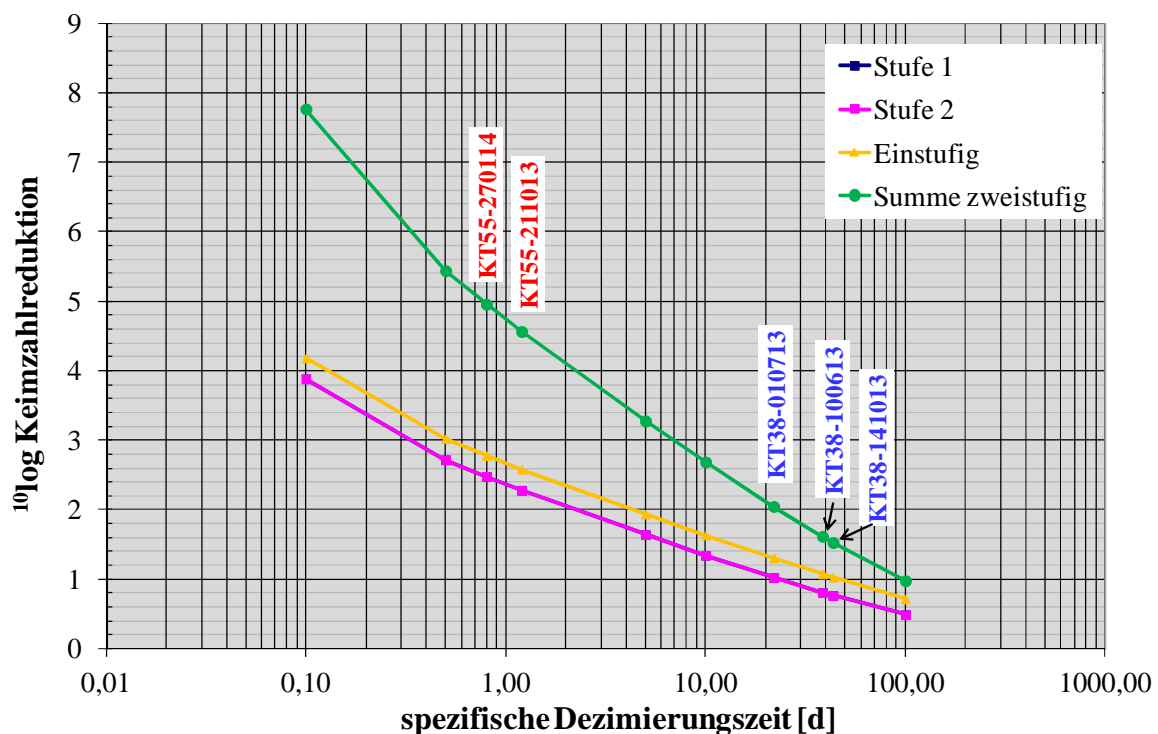


Abbildung 30: Reduktion von *C. botulinum* (Stamm LGL E2625) in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) in einem ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktor

### 3.3.3.5 Diskussion: Verhalten von *C. botulinum* (Stamm LGL E2625) im Biogasprozess

Da *C. botulinum* in den im Screening untersuchten Proben (n = 154) nicht gefunden (s. 3.1.2) und der Organismus im Rahmen der Keimträgerversuche reduziert wurde, wird das hygienische Risiko, das von diesem Krankheitserreger ausgeht, als sehr gering eingeschätzt. Das Risiko durch Gärprodukte ist damit zumindest geringer als das Risiko, das von den unbehandelten oder nur gelagerten Roh-Substraten wie der Gülle ausgeht.

Nach Wissen der Autoren sind vergleichbare Studien, die explizit das Verhalten von *C. botulinum* im Biogas-Prozess untersuchen, bisher nicht vorhanden. Die Ergebnisse der Keimträgerversuche mit *C. botulinum* stehen dennoch mit Berichten aus der Literatur im Einklang: Bagge et al. (2010) untersuchte in einer Biogasanlage, die pasteurisierten Schlachthausabfall anaerob vergärt, quantitativ die Gesamt-Konzentration von Clostridien sowie den Anteil pathogener *Clostridium* spp. daran. Bei thermophiler Temperaturführung (52°C) wurde dabei der Anteil pathogener Clostridien um mehr als 2,5 log-Stufen reduziert. Nach Vergärung mit einer hydraulischen Verweilzeit von 26 d konnten keine pathogenen Clostridien mehr nachgewiesen werden.

Die für die mesophile Vergärung bestimmte dezimale Reduktionszeit von *C. botulinum* nimmt relativ viel Zeit in Anspruch, vergleicht man sie mit den in Biogas-Anlagen vorherrschenden hydraulischen Verweilzeiten von ca. 80 d (Lebuhn et al., 2014). Die tatsächliche Exposition kann zudem durch Kurzschlussströme in Rührkessel-Fermentern verkürzt sein. Demnach bleibt ein hygienisches Restrisiko bestehen. Insbesondere, wenn außergewöhnliche hohe Konzentrationen von *C. botulinum* mit dem Substrat in den Fermenter eingetragen werden, ist erhöhte Vorsicht im Umgang mit den Gärprodukten, aber noch mehr mit den betroffenen Substraten geboten. Wird auf gute landwirtschaftliche Praxis geachtet, können solche Fälle vermieden werden. *C. botulinum* ist in der Regel selten in pflanzlichen Substraten zu finden (Driehuis, 2013). Ein Eintrag hoher Konzentrationen des Organismus könnte z.B. auftreten, wenn Kadaver von Kleintieren oder Vögeln bei der Ernte oder Silierung versehentlich in die Silage gelangen (Cobb et al., 2002). In tierischen Substraten sind zahlreiche Nachweise von *C. botulinum* in Geflügelmist bekannt (Smart et al., 1987; McLoughlin et al., 1988; Ortolani, et al., 1997; Driehuis, 2013). Zudem können bestimmte Organismen (z.B. bestimmte Süßwasser-Pflanzen, eingetauchte Larvenstadien oder Süßwasser-Algen) als Vektoren für *C. botulinum* dienen. Zersetzen sich diese, können ihre Reste die Quelle von Botulismus-Ausbrüchen in der Umwelt sein (Byappanahalli und Whitman, 2009; Espelund und Klaveness, 2014). Deshalb könnte auch die Vergärung von speziellen Substraten, wie beispielsweise Algen-Abfälle, problematisch bezüglich ihrer Belastung mit *C. botulinum* sein (Samson und LeDuy, 1986; Mussgnug et al, 2010; Raza et al, 2014). Hierzu ist die wissenschaftliche Datenlage noch dürftig.



## 4 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungsergebnisse zeigten einen Eintrag von EHEC/EPEC in Biogasanlagen insbesondere durch tierische Substrate auf. In nicht unbedeutendem Maß konnten EHEC/EPEC auch in Fermenterhaltenen und Gärprodukten qualitativ nachgewiesen werden. Pflanzliche Substrate waren dagegen weniger betroffen. Da aber eine Reduktion des als Indikator eingesetzten EPEC-Stamms im mesophilen und deutlich schneller im thermophilen Biogasprozess durch Keimträgerversuche festgestellt wurde, ist die hygienische Qualität eines Gärprodukts dennoch gegenüber der Rohgülle/ Mist als deutlich verbessert einzuschätzen.

Die meisten untersuchten pathogenen *Clostridium* spp. (*C. botulinum*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* und *C. perfringens*) kamen den Ergebnissen zufolge nicht oder nur in wenigen Praxis-Proben vor. Eine Ausnahme bildet der als nosokomialer Keim immer häufiger auftretende *C. difficile*, der in einer sondierenden Untersuchung sehr häufig nachgewiesen wurde. Ähnlich wie für EHEC/EPEC waren hauptsächlich tierische Substrate, Fermenterhaltenen und Gärprodukte betroffen. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen zudem, dass auch der durch die Fähigkeit zur Sporenbildung resistere *C. botulinum* durch den mesophilen und noch stärker durch den thermophilen Biogasprozess reduziert wird. Es konnten keine Hinweise auf eine Vermehrung in Biogasanlagen gefunden werden. Auch die Abwesenheit von *C. botulinum* in der großen Anzahl untersuchter Praxis-Proben belegt die untergeordnete Bedeutung des Organismus in diesem Umfeld.

Es gilt damit neben dem Parameter EHEC/ EPEC auch für *C. botulinum*, dass die hygienische Qualität im Gärprodukt verglichen mit unbehandelten Einsatzstoffen wie Gülle bzw. Mist als verbessert einzuschätzen ist. Eine Vermehrung der Keime im Gärsubstrat wurde in keinem Fall festgestellt. Die Geschwindigkeit und damit das Ausmaß der Hygienisierung sind im Einzelfall abhängig vom betrachteten Parameter und den Gärbedingungen



## 5 Weiterführende Arbeiten

Die Ergebnisse der ersten, sondierenden Screening-Untersuchungen haben gezeigt, dass *C. difficile* in allen untersuchten Matrices gefunden werden konnte. Die Nachweisrate war insbesondere bei tierischen Substraten, Fermenterhaltenen und Gärprodukten vergleichsweise hoch. Da bisher nur eine geringe Anzahl Praxis-Proben untersucht wurde, wird hier weiterer Forschungsbedarf zur Schaffung einer breiteren Datengrundlage zur Anwesenheit und zum Verhalten von *C. difficile* in Biogasanlagen gesehen.

Ein Nachfolge-Projekt diesbezüglich ist derzeit in der Phase der Antragstellung.



## 6 Veröffentlichungen

- Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U., Plöchl, M. (2014): Teile der Ergebnisse dieses Projekts werden in einem Buch mit dem Titel „Biogas Science & Technology - Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology“ im Rahmen der Internationalen Wissenschaftstagung Biogas Science in Wien als gesondertes Kapitel “Hygiene and sanitation in biogas plants“ veröffentlicht werden.
- Fröschle, B., Lebuhn, M. (2014): *Clostridium botulinum* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen? Abstract und Poster-Präsentation. In: Tagungsband des 5. Agrarwissenschaftlichen Symposium – Agrarische Stoffkreisläufe – Nährstoffmanagement – Umweltschutz – Ressourceneffizienz des Hans Eisenmann-Zentrums, 25. September 2014, Freising, S. 43-44.  
(s. Anhang: 8.2 und 8.3)
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C., Lebuhn, M. (2014): Incidence of pathogenic clostridia and fate of *Clostridium botulinum* in biogas processes. Eingereichtes Abstract zu: 2nd International Conference on Biogas Microbiology (ICBM), 10. – 12. Juni 2014, Uppsala, Schweden.  
(s. Anhang: 8.4)
- Fröschle, B., Kinker, I., Lebuhn, M. (2014): Fast quantification of viable EHEC/EPEC involving qPCR methodology. Abstract und Poster-Präsentation. In: Proceedings of the International Conference on Anaerobic Digestion. Biogas Science, 26. – 30. Oktober 2014, Wien, Österreich, S. 168-169.  
(s. Anhang: 8.5 und 8.6)
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C., Lebuhn, M. (2015): Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen – Abschlussbericht. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Freising. (in Planung)
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C., Lebuhn, M. (2015): Incidence of pathogenic clostridia and fate of *Clostridium botulinum* in biogas processes. (wird eingereicht)
- Lebuhn, M., Fröschle, B. (2011): Hygienische Aspekte beim Einsatz von Gärresten. In Düngung mit Biogasgärresten - effektiv-umweltfreundlich-bodenschonend - 10. Kulturlandschaftstag. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz, S. 59-71.  
[http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p\\_45175.pdf#page=7](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_45175.pdf#page=7).
- Lebuhn, M. (2014): Mikrobiologie und Hygiene des Biogasprozesses – aktueller Kenntnisstand. In: Biogas Infotage, 10.1.2014, Buchloe, 27 Seiten,  
<http://www.renergie-allgaeu.de/index.php/downloads1/finish/66/398>.
- Lebuhn, M. (2014): Hygienische Unbedenklichkeit landwirtschaftlicher Biogasanlagen? In: Kongressband der 23. Jahrestagung und Fachmesse des Fachverbands Biogas e.V., Workshop 2, Hygienische Anforderungen an den Betrieb von Biogasanlagen, 14.01.-16.01.2014, Nürnberg (Ed. Fachverband Biogas e.V.), 27 Seiten.

Messelhäusser, U., Fröschle, B., Lebuhn, M., Höller, C. (2014): Detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in biogas plants in combination with germ carrier experiments. Eingereichtes Abstract zu: 2nd International Conference on Biogas Microbiology (ICBM), 10. – 12. Juni 2014, Uppsala, Schweden.  
(s. Anhang: 8.7)

Messelhäusser, U., Fröschle, B., Lebuhn, M., Höller, C. (2015): Detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in biogas plants in combination with germ carrier experiments. (wird eingereicht)

## 7 Literaturverzeichnis

- Ackermann, G. (2004): *Clostridium difficile* - Aktueller Stand; Teil I: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Immunologie und Prophylaxe. *Mikrobiologe*. 14. Jg.: 123-129.
- Aitken, M. D., Sobsey, M. D., Shehee, M., Blauth, K. E., Hill, V. R., Farrell, J. B., Nappier, S. P., Walters, G. W., Crunk, P. L., Van Abel, N. (2005): Laboratory Evaluation of thermophilic-anaerobic digestion to produce Class A Biosolids. 2. Inactivation of pathogens and indicator organisms in a continuous- flow reactor followed by batch treatment. *Water Environment Research* 77(7):3028-3036.
- Aitken, M. D., Sobsey, M. D., Van Abel, N. A., Blauth K. E., Singleton, D. R., Crunk P. L., Nichols C., Walters, G. W., Schneider, M. (2007): Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. *Water Research* 41(8):1659 – 1666.
- Ammon, A., Schmidt, K., Bräunig, J. (2000): Lebensmittelinfektionen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 43(10):751 – 757.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26: 1988-12: Untersuchung von Lebensmitteln; Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1: 2002-05: Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik.
- Anniballi, F., Auricchio, B., Woudstra, C., Fach, P., Fiore, A., Skarin, H., Bano, L., Segerman, B., Knutsson, R., De Medici, D. (2013): Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice and Science* 11(1):207-214.
- Anonymus (2005): Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* 199:1-65.
- Anonymus (2007): Opinion of the scientific panel on biological hazards on the safety vis-à-vis biological risk of the mesophilic process of biogas and compost treatment of animal by-products (ABPs). *The EFSA Journal* 465:1-16.
- Arnon, S. S., Midura, T. F., Damus, K., Thompson, B., Wood, R. M., Chin, J. (1979): Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *Journal of Pediatrics* 94(2):331–336.

- Bachmaier, H., Ebertseder, F., Effenberger, M., Kissel, R., Rivera-Gracia, E., Gronauer, A. (2011): Wissenschaftliche Begleitung der Pilotbetriebe zur Biogasproduktion in Bayern – Fortsetzung 2008 – 2010. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, [http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p\\_42637.pdf](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_42637.pdf).
- Bauer, C., Lebuhn, M., Gronauer, A. (2009): Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, [http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p\\_36964.pdf](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_36964.pdf).
- Bagge, E., Sahlström, L., Albiñ, A. (2005): The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* 39(20):4879-4886.
- Bagge, E. (2009a): Hygienic aspects of the biogas process with emphasis on spore-forming bacteria. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. Department of Bacteriology, National Veterinary Institute and Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* 2009:28.
- Bagge, E., Sternberg Lewerin, S., Johansson, K.-E. (2009b): Detection and identification by PCR of *Clostridium chauvoei* in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant. *Acta Veterinaria Scandinavica* 51(1):8.
- Bagge, E., Persson, M., Johansson, K.-E. (2010): Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology* 109(5):1549-1565.
- Baljer, G., Wieler, L. H. (1999): Tiere als Infektionsquelle für den Menschen – durch EHEC hervorgerufene Erkrankungen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 106(8):339-343.
- Balslev, T., Ostergaard, E., Madsen, I. K., Wandall, D. A. (1997): Infant botulism. The first culture-confirmed Danish case. *Neuropediatrics* 28(5):287-288.
- Bartlett, J. G. (2002): Clinical practice: antibiotic-associated diarrhea. *The New England Journal of Medicine* 346(5):334-339.
- Bensmann, M. (2012): Interview mit Prof. Dr. Gerhard Breves - Kein Botulinum-Toxin gefunden. *BIOGAS Journal* 2:52-53.
- Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., Scheutz, F. (1993): Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 31(9):2483-2488.
- BfR (2012): Fragen und Antworten zum chronischen Botulismus - Aktualisierte FAQ des BfR vom 10. Februar 2012, <http://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zum-chronischen-botulismus.pdf>.



- Böhnel, H., Gessler, F. (2010): Botulinumtoxikosen – Infektionsrisiken für Mensch und Tier (unter besonderer Berücksichtigung von Schwein bzw. Rind). *Nutztierpraxis Aktuell* 33(2010):14-18.
- Boyle, W. C. (1976): Energy recovery from sanitary landfills - A review. 119-138. In: Schlegel, H.G. und S. Barnea (Hrsg.): *Microbial Energy Conversion - The Proceedings of a Seminar Sponsored by the UN Institute for Training and Research (UNITAR) and the Ministry for Research and Technology of the Federal Republic of Germany Held in Göttingen, October 1976*. Oxford, Pergamon Press.
- Bräunig, J. (2012a): „Chronischer Botulismus“ – Aktueller Stand der Wissenschaft. 23-24. In: *Fortbildung für den öffentlichen Gesundheitsdienst 2012*. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR; Hrsg.), <http://www.bfr.bund.de/cm/343/fortbildung-fuer-den-oegd-2012-abstracts.pdf>.
- Bräunig, J. (2012b): „Chronischer Botulismus“ – Aktueller Stand der Wissenschaft. Vortrag auf der Fortbildung für den öffentlichen Gesundheitsdienst, 21.03.2012, <http://www.bfr.bund.de/cm/343/chronischer-botulismus-aktueller-stand-der-wissenschaft.pdf>.
- Bray, J. (1945): Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhea in infants. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 57(2):239-247.
- Breves, G. (2011): Untersuchungen zum mikrobiologischen Risikopotenzial von Gärsubstraten und Gärresten aus niedersächsischen Biogasanlagen. Vortrag auf der Fachtagung Botulismus des Niedersächsischen Biogasforums, 30.11.2011, Hannover, [http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation\\_id=1375&article\\_id=101070&psmand=7](http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=1375&article_id=101070&psmand=7).
- Breves, G. (2012): Abschlussbericht der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zum Projekt: Einschätzung des Risikopotenzials der Biogastechnologie in mikrobiologischer Hinsicht. [www.ml.niedersachsen.de/download/72762](http://www.ml.niedersachsen.de/download/72762).
- Breves, G. (2014): Abschlussbericht der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zum Projekt: Mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärsubstrat (Teilprojekt 2). Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Bülte, M., Montenegro, M. A., Helmuth, R., Trumpf, T., Reuter, G. (1990): Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei gesunden Rindern und Schweinen mit dem DNS-DNS-Koloniehybridisierungsverfahren. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 103:380-384.
- Bülte, M. (2004): Prävalenz von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) bei Haustieren. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 111(8):314-317.
- Byappanahalli, M. N., Whitman, R. L. (2009): *Clostridium botulinum* type E occurs and grows in the alga *Cladophora glomerata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66(6):879-882.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008): Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99(10):4044-4064.

- Cobb, S. P., Hogg, R. A., Challoner, D. J., Sharpe, R. T., Brett, M. M., Livesey, C. T., Jones, T. O. (2002): Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Veterinary Record* 150(1):5-8.
- Dahlenborg, M., Borch, E., Rådström, P. (2001): Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10):4781-4788.
- Dahlenborg, M., Borch, E., Rådström, P. (2003): Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. *International Journal of Food Microbiology* 82(2):105-110.
- DIN 10102:1988-06: Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen; Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin.
- DIN CEN ISO/TS 17919:2014-03; DIN SPEC 10793:2014-03: Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Nachweis von Botulinum-Neurotoxin Typ A, B, E und F produzierenden Clostridien (ISO/TS 17919:2013); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 17919:2013. Englischer Titel: Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia.
- Dohrmann, A. B., Baumert, S., Klingebiel, L., Weiland, P., Tebbe, C. C. (2011): Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(6):1991-2004.
- Doyle, M. P., Schoeni, J. L. (1984): Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 48(4):855-856.
- Drča M., (2007): Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an einer mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von Speiseresten in Verbindung mit methodischen Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und *Escherichia coli* aus biologischem Material. Inaugural-Dissertation. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- Driehuis, F. (2013): Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science* 22(1):16–34.
- East, A. K., Collins, M. D. (1994): Conserved Structure of Genes Encoding Components of Botulinum Neurotoxin Complex M and the Sequence of the Gene Coding for the Nontoxic Component in Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type F. *Current Microbiology* 29(2):69-77.

- Ebertseder, F., Kissel, R., Lehner, A., Rivera Gracia, E., Bachmeier, H., Effenberger, M. (2012): Monitoring und Dokumentation von Praxis-Biogasanlagen. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, [http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p\\_44993.pdf](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_44993.pdf).
- Effenberger, M., Bachmaier, H., Kränsel, E., Lehner, A., Gronauer, A. (2010): Wissenschaftliche Begleitung der Pilotbetriebe zur Biogasproduktion in Bayern. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, [http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p\\_38045.pdf](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_38045.pdf).
- Eikmeyer, F.G., Rademacher, A., Hanreich, A., Hennig, M., Jaenicke, S., Maus, I., Wibberg, D., Zakrzewski, M., Pühler, A., Klocke, M., Schlüter, A. (2013): Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas-producing microbial communities residing in biogas reactors does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms. *Biotechnology and Biofuels* 6(49):14.
- Espelund, M., Klaveness, D. (2014): Botulism outbreaks in natural environments - an update. *Frontiers in Microbiology* 5(287):7.
- Faulstich, M., Kolb F. R., Netter R. (1995): 18. Mülltechnisches Seminar: Praxis der biologischen Abfallbehandlung. Berichte aus Wassergüte und Abfallwirtschaft, Berichtsheft 121, Technische Universität München.
- Fenicia, L., Ferrini, A. M., Aureli, P., Pocecco, M. (1993): A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. *European Journal of Epidemiology* 9(6):671-673.
- FNR (2014): Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Gülzow-Prutzen. [http://mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/1/e/leitfadenbiogas2014\\_web.pdf](http://mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/1/e/leitfadenbiogas2014_web.pdf).
- Frahm, E., Obst, U. (2003): Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods* 52(1):123-131.
- Fritsche W. (1998): Umweltmikrobiologie. Gustav Fischer-Verlag, Jena.
- Fröschle, B., Munk, B., Gronauer, A., Lebuhn, M. (2012): Inactivation of *Salmonella* in biogas processes – determination by conventional and qPCR methods. In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste, Venice 2012, 14.
- Fuchs G. (2007): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 8. Auflage.
- Geue, L., Segura-Alvarez, M., Conraths, F. J., Kuczus, T., Bockemühl, J., Karch, H., Gallien, P. (2002): A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiology and Infection* 129(1):173-185.

- Geue, L., Selhorst, T., Schnick, C., Mintel, B., Conraths, F. (2004): Untersuchung zum humanen Gefährdungspotential von potentiellen enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) isoliert in deutschen Rinderbeständen Tagungsband EHEC-Workshop 2004, 22. -24. Juli 2004, Wildbad Kreuth.
- Girardin, H., Albagnac, C., Dargaignaratz, C., Nguyen-The, C., Carlin, F. (2002): Antimicrobial Activity of Foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection* 65(5): 806-813.
- Gould, L. H., Limbago, B. (2010): *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clinical Infectious Diseases* 51(5):577-582.
- Godfree, A., Farrell, J. (2005): Processes for managing pathogens. *Journal of Environmental Quality* 34(1):105-113.
- Heißenhuber, A., Hautmann, W., Ludwig, M.-S., Busch, U., Wildner, M. (2005): Leitfaden Labordiagnostik von Shigatoxinbildenden und anderen darmpathogenen *Escherichia coli*-Stämmen, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.), [http://www.bestellen.bayern.de/application/applstarter?APPL=STMUG&DIR=stmug&ACTIONxSETVAL%28index\\_portal.htm,USERxPORTAL:TRUE,ALLE:X%29=X](http://www.bestellen.bayern.de/application/applstarter?APPL=STMUG&DIR=stmug&ACTIONxSETVAL%28index_portal.htm,USERxPORTAL:TRUE,ALLE:X%29=X).
- Hoferer, M. (2001): Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. Inaugural Dissertation beim Fachbereich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, Journal-Nr. 2528, 211.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Inoue, K., Oguma, K. (1996): Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infection and Immunity* 64(5):1589-1594.
- ISO 14189:2013-11: Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Clostridium perfringens* – Membranfiltrationsverfahren.
- ISO/TS 17919:2013: siehe: DIN CEN ISO/TS 17919:2014-03; DIN SPEC 10793:2014-03.
- Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.-T. (2010): Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology* 109(5):1660-1667.
- Kaiser, F., Metzner, T., Effenberger, M., Gronauer, A. (2007): Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. LfL-Information, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, [http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen/p\\_32448.pdf](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen/p_32448.pdf).
- Kaper, J.B. (1996): Defining EPEC. *Revista de Microbiologia Sao Paolo* 27:130-133.
- Karch, H., Schmidt, H., Schwarzkopf, A. (1996): Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Die gelben Hefte* 36:125-135.

- Kim, M. D., Son, M., Jo, M., Shin, S. G., Khim, J. H., Hwang, S. (2010): Growth condition and bacterial community for maximum hydrolysis of suspended organic materials in anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5):1611-1618.
- Kissel, R., Rivera Gracia, E., Effenberger, M. (2012): Nutzung von Grünland zur Biogaserzeugung – Betriebs-Monitoring – 1. Zwischenbericht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising.
- Kissel, R., Pohl, A., Rivera Gracia, E., Effenberger, M. (2013): Nutzung von Grünland zur Biogaserzeugung – Betriebs-Monitoring – 2. Zwischenbericht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising.
- Klarmann, D. (1989): [The detection of *Clostridium botulinum* in fecal samples of cattle and swine and in the raw material and animal meal of different animal body rendering plants]. *Berliner und Muenchener tieraerztliche Wochenschrift* 102:84-86.
- Köhler, B. (2011): Wechselwirkungen von Clostridien-Toxininfektionen mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum* und Entsorgungsverfahren in der Tierhaltung. Tierärztliche Hochschule Hannover, 30.11.2011, [http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation\\_id=1375&article\\_id=101070&psmand=7](http://www.ml.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=1375&article_id=101070&psmand=7).
- Köhler B. (2012): Hygienische Probleme von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum* und anderer pathogener Clostridien Vortrag an der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL), 11.04.2012, Jena, [http://www.tll.de/imperia/ft\\_biog/tbi60412.pdf](http://www.tll.de/imperia/ft_biog/tbi60412.pdf).
- Lebuhn, M., Effenberger, M., Garcés, G., Gronauer, A., Wilderer, P. A. (2005): Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Science and Technology*, 52(1-2):93–99.
- Lebuhn, M., Wilderer, P. (2006): Abschlussbericht des StMUGV-Projekts „Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: Wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen". Technische Universität München, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, <http://www.sww.bgu.tum.de/forschung/forschungsberichte/>.
- Lebuhn, M., Munk, B., Effenberger, M. (2014): Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energy, Sustainability and Society* 4(1):10.
- Lúquez, C., Bianco, M. I., de Jong, L. I., Sagua, M. D., Arenas, G. N., Ciccarelli, A. S., Fernández, R. A. (2005): Distribution of Botulinum Toxin-Producing Clostridia in Soils of Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4137-4139.
- Marín Pérez, C., Fröschle, B., Lebuhn, M. (2012): Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe. Abschlussbericht. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising.
- McLoughlin, M., Mcllroy, S., Neill, S. (1988): A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. *Veterinary Record* 122(24):579–581.

- Messelhäuser, U., Zucker, R., Ziegler, H., Elmer-Englhard, D., Kleih, W., Höller, C., Busch, U. (2007a): Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ A, B, E und F mittels real-time-PCR. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2(2):198–201.
- Messelhäuser, U., Zucker, R., Elmer-Englhard, D., Busch, U., Hörmansdorfer, S., Pudich, U., Höller, C. (2007b): Nachweis und Charakterisierung von *Clostridium perfringens* mittels real-time-PCR. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2(2):194-197.
- Midura, T. F., Snowden, S., Wood, R. M., Midura, S. S. (1979): Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey. *Journal of Clinical Microbiology* 9(2):282-283.
- Midura, T. F. (1996): Update: infant botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 9(2):119-125.
- Mussnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O. (2010): Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150(1):51–56.
- Nakamura K., Kohda, T., Seto, Y., Mukamoto, M., Kozaki, S. (2013): Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and C/C mosaic neurotoxins. *Veterinary Microbiology* 162(2-4):881–890.
- Nataro, J. P., Kaper J. B. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(1):142-201.
- Notermans, S. H., Havelaar, A. H., Dufrenne, J. B., Oosterom, J. (1985): [Incidence of *Clostridium botulinum* on cattle farms]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 110:175-180.
- Ortolani, E. L., Brito, L. A., Mori, C. S., Schalch, U., Pacheco, J., Baldacci, L. (1997): Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three Brazilian cattle herds. *Veterinary and Human Toxicology* 39(2):89–92.
- Pavlovic, M., Huber, I., Skala, H., Konrad, R., Schmidt, H., Sing, A., Busch, U. (2010): Development of a multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(7):801-808.
- Raza, S. H., Hussain, S. H., Shahid, A. A., Hashmi, U., Kazi, A. G. (2014): Microalgal Biomass as a Source of Renewable Energy. In: K. R. Hakeem, M. Jawaid, U. Rashid (Eds.): Biomass and Bioenergy Applications. Springer-Verlag, Berlin.
- Richter, H., Klie, H., Timm, M., Gallien, P., Steinrück, H., Perlberg, K. W., Protz, D. (1997): Verotoxin-produzierende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern in Deutschland. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 110(4):121-127.
- RKI (2011): Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) - RKI-Ratgeber für Ärzte. Robert-Koch-Institut (Hrsg.).  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_EHEC.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_EHEC.html).



- Sahlström, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.L., Albiñ, A. (2008): A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 99(16):7859-7865.
- Samson, R., Leduyt, A. (1986): Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 28(7):1014–1023.
- Schieder, D., Gronauer, A., Lebuhn, M., Bayer, K., Beck, J., Hiopp, G., Binder, S. (2010): Prozessmodell Biogas. In: Biogas Forum Bayern III – 3/2010, ALB Bayern e.B. (Hrsg.), [http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell\\_Biogas.pdf](http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf).
- Schink, B. (1997): Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(2):262-280.
- Schink, B. (2006): Syntrophic associations in methanogenic degradation. S. 1-19. In: J. Overmann (Ed.), *Molecular basis of symbiosis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O. (2008): The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136(1-2):77-90.
- Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H. (1995): Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity* 63(3):1055–1061.
- Selbitz, H.-J. (2010): Grampositive, sporenbildende Stäbchenbakterien. S. 217-288. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Seyboldt, C. (2014): Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen - Schlussbericht Friedrich-Loeffler-Institut - Teilprojekt "Clostridiendiagnostik".
- Sharma, V. K., Dean-Nystrom, E.A., Casey, T.A. (1999): Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxinogenic *E. coli*. *Molecular and Cellular Probes* 13(4):291-302.
- Smart, J. L., Jones, T. O., Clegg, F. G., McMurtry, M. J. (1987): Poultry waste associated type C botulism in cattle. *Epidemiology and Infection* 98(01):73–79.
- Smith, L. D. (1975): Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. *Applied Microbiology* 30(2):319–323.
- Smith, L. D. (1978): The occurrence of *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the soil of the United States. *Health Laboratory Science* 15:74-80.
- Smith, G. R., Young, A. M. (1980): *Clostridium botulinum* in British soil. *The Journal of Hygiene* 85:271-274.

- Songer, J. G. (1996): Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 9(2):216-234.
- Songer, J. G. (1998): Clostridial diseases of small ruminants. *Veterinary Research* 29(3-4):219-232.
- Spinks, A. T., Dunstan, R. H., Harrison, T., Coombes, P., Kuczera, G. (2006): Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Research* 40(6):1326-1332.
- Strauch, D. (1996): Hygieneaspekte bei der Cofermentation. In R. Braun (Hrsg.), Vorträge und Podiumsdiskussion im Rahmen der Fachtagung "Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion" (Band 14, S. 100). Tulln, <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/CP014.pdf#page=59>.
- Streicher, G., Effenberger, M. (2013): Monitoring von Biogasanlagen – Diversifizierung der Einsatzstoffe und Verfahrenstechnik – 1. Zwischenbericht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising.
- SurvStat (2014): Robert-Koch-Institut (RKI, Hrsg.), Datenstand: 30.03.2014, <http://www3.rki.de/SurvStat>.
- Tanner, F. W., Dack, G. M. (1922): *Clostridium botulinum*. *The Journal of Infectious Diseases* 31:92-100.
- Tebbe, C.C., Dohrmann, A.-B., Baumert, S. (2007): Abschlussbericht über das Vorhaben „Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Vorkommen von *Clostridium botulinum* in Substraten und Gärrückständen von Biogasanlagen – Molekularbiologische Untersuchungen. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL, Hrsg.), Institut für Technologie und Biosystemtechnik und Institut für Agrarökologie, Braunschweig  
[http://www.3-n.info/download.php?file=pdf\\_files/InfomaterialDownloadsBiogas/abschlussbericht\\_clostridien\\_fal\\_2007.pdf](http://www.3-n.info/download.php?file=pdf_files/InfomaterialDownloadsBiogas/abschlussbericht_clostridien_fal_2007.pdf).
- Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte),  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:300:0001:0033:DE:PDF>.
- Verordnung (EU) Nr. 142/2011: Verordnung (EU) Nr. 142/2011 der Kommission vom 25. Februar 2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:054:0001:0254:DE:PDF>.
- Viau, E., Peccia, J. (2009): Survey of Wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by Class A and Class B stabilization treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1):164-174.



- Voß, E., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K.-H. (2009): FOS/TAC: Herleitung, Methodik, Anwendung und Aussagekraft. In: Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009. Band 3. LfL-Schriftenreihe, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, 675-682.  
[http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ilt/dateien/biogas\\_science\\_bd\\_3.pdf](http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ilt/dateien/biogas_science_bd_3.pdf).
- Wagner, S. O., Malin, C., Gstraunthaler, G., Illmer, P. (2009): Survival of selected pathogens in diluted sludge of a thermophilic waste treatment plant and in NaCl-solution under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management* 29(1):425-429.
- Ziegler, J. S. (2013): Vergleichende Differenzierung von *Clostridium* spp. mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie. Inaugural-Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.



## 8 Anhang

## 8.1 Anhang 1: Detaillierte Ergebnisse des Screenings

Probenbezeichnung	Probenahme-Datum	Kategorisierung	<i>C. botulinum</i>			<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>			<i>C. novyi</i>	<i>C. haemolyticum, C. septicum, C. chauvoei</i>		EHEC/EPEC			qPCR			STEC/VTEC			qPCR		
			LfL+ LGL	LfL	LGL	LGL	LfL+ LGL	LfL	LGL	LGL	LGL	LfL+ LGL	LfL	stx1	stx2	eae	LGL	stx1	stx2	LGL	stx1	stx2		
PB16-GS		pSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB16-MS		pSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB16-GPS-Klee		pSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB16-RiMi		tSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	+	+	-	-	-		
PB16-F1		FI	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	-	+	-	-	-		
PB16-F2		FI	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB16-N		GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB15-GS		pSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB15-MS		pSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB15-PuMi		tSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB15-F		FI	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	-	+	-	-	-		
PB06-FI	21.12.2011	FI	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB06-MS	21.12.2011	pSub	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB15-FI	21.12.2011	FI	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB12-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB13-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB11-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB07-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB09-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB14-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	+	+	-	-	-		
PB10-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB06-FI	21.12.2011	FI	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB08-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB16-N	21.12.2011	GP	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	+	+	-	-	-		
BGA6-VK1	17.01.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
BGA6-VK2	17.01.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	-	+	-	-	-		
BGA6-F1	17.01.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
BGA6-F2	17.01.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
BGA6-N	17.01.2012	GP	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
BGA6-VK1	18.09.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
BGA6-VK2	18.09.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	-	+	-	-	-		
BGA6-F2	18.09.2012	FI	neg	n.a.	neg	neg	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
BGA6-N	18.09.2012	GP	neg	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	-	-	-		
PB17-GS	18.10.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	-	-	-		
PB17-RiMi	18.10.2012	tSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	-	-	-		
PB17-HüMi	18.10.2012	tSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	-	-	-		
PB17-FI	18.10.2012	FI	neg	n.a.	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	-	-	-		
PB17-N	18.10.2012	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	-	-	-		
PB17-E fest	18.10.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-		
PB17-E flüssig	18.10.2012	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-		

Anhang

Probenbezeichnung	Probenahme-Datum	Kategorisierung	<i>C. botulinum</i>			<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>			<i>C. novyi</i>	<i>C. haemolyticum, C. septicum, C. chauvoei</i>	EHEC/EPEC		qPCR			STEC/VTEC		qPCR	
			LfL+ LGL	LfL	LGL		LGL	LfL+ LGL	LfL			LGL	LGL	LfL+ LGL	LfL	stx1	stx2	eae	LGL	stx1
PB18-GS	18.10.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-FI	18.10.2012	FI	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-E	18.10.2012	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	pos	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-GS	24.10.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	pos	neg	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB21-FI	24.10.2012	FI	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	
PB21-N	24.10.2012	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	EHEC	EHEC	-	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	
PB21-E	24.10.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	EHEC	EHEC	-	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	
PB19-GS	21.11.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	EHEC	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	+	-	
PB19-MS	21.11.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB19-FI	21.11.2012	FI	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB19-N	21.11.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB20-GS	21.11.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB20-MS	21.11.2012	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB20-FI	21.11.2012	FI	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB20-N	21.11.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
BGA1-SGG	29.11.2012	GP	neg	neg	neg	pos	pos	n.a.	pos	pos	neg	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB19-GS	17.12.2012	pSub	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB19-MS	17.12.2012	pSub	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB19-FI	17.12.2012	FI	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB19-N	17.12.2012	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
PB20-GS	17.12.2012	pSub	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB20-MS	17.12.2012	pSub	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB20-RiGü	17.12.2012	tSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB20-FI	17.12.2012	FI	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB20-N	17.12.2012	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
BGA2-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB17-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB16-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB14-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	EHEC	EHEC	-	+	+	neg	-	-	
PB15-FI	17.12.2012	FI	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	-	+	
BGA3-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
BGA4-FI	17.12.2012	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
BGA4-N	17.12.2012	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	n.a.	pos	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-FI	17.12.2012	FI	neg	neg	neg	n.a.	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB14-GS	09.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	-	EHEC	+	-	
PB14-MS	09.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB14-RiGü	09.01.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	+	EHEC	+	-	
PB14-RiMi	09.01.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	+	-	
PB14-GeSc	09.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB14-FI	09.01.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	+	-	
PB14-N	09.01.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	+	EHEC	+	-	
PB18-GS	10.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	

Probenbezeichnung	Probenahme-Datum	Kategorisierung	<i>C. botulinum</i>			<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>			<i>C. novyi</i>	<i>C. haemolyticum, C. septicum, C. chauvoei</i>	EHEC/EPEC		qPCR			STEC/VTEC		qPCR	
			LfL+ LGL	LfL	LGL		LGL	LfL+ LGL	LfL			LGL	LGL	LfL+ LGL	LfL	stx1	stx2	eae	LGL	stx1
PB18-FI	10.01.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	-	neg	-	-	
PB18-N	10.01.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-GS	24.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-MS	24.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-FI	24.01.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-N	24.01.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB20-GS	24.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB20-MS	24.01.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB20-FI	24.01.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	pos	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB17-GS	06.02.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB17-MS	06.02.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB17-RiMi	06.02.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EPEC	-	-	+	EHEC	+	-	
PB17-HüMi	06.02.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB17-FI	06.02.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	+	neg	-	-	
PB17-N	06.02.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB17-E flüssig	06.02.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
PB21-GS	19.02.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-MS	19.02.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	neg	neg	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-F1	19.02.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	-	+	+	EHEC	-	+	
PB21-F2	19.02.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	+	neg	-	-	
PB21-N	19.02.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	pos	pos	n.a.	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB17-GS	01.08.2013	pSub	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB17-RiMi	01.08.2013	tSub	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB17-HüMi	01.08.2013	tSub	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB17-FI	01.08.2013	FI	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB17-N	01.08.2013	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB21-GS	01.08.2013	pSub	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB21-MS	01.08.2013	pSub	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB21-F1	01.08.2013	FI	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	pos	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB21-F2	01.08.2013	FI	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	pos	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB21-N	01.08.2013	GP	neg	n.a.	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	-	-	
PB17-GS	17.09.2013	pSub	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB17-RiMi	17.09.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	-	neg	-	-	
PB17-HüMi	17.09.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB17-FI	17.09.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB17-N	17.09.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-GS	17.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-GeSc	17.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-FI	17.09.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	-	+	+	neg	-	-	
PB18-E	17.09.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB21-GS	19.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-Ge	19.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
PB21-RiGü	19.09.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
PB21-F1	19.09.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	-	+	

Probenbezeichnung	Probenahme-Datum	Kategorisierung	<i>C. botulinum</i>			<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>			<i>C. novyi</i>	<i>C. haemolyticum, C. septicum, C. chauvoei</i>	EHEC/EPEC		qPCR			STEC/VTEC		qPCR	
			LfL+ LGL	LfL	LGL	LGL	LfL+ LGL	LfL	LGL	LGL	LGL	LfL+ LGL	LfL	stx1	stx2	eae	LGL	stx1	stx2	
PB21-F2	19.09.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	-	+	
PB21-N	19.09.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	+	+	
PB19-GS	24.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-GPS	24.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-RiGü	24.09.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	+	-	
PB19-FI	24.09.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-N	24.09.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-E	24.09.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
PB20-GS	24.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB20-LPG	24.09.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	-	+	-	neg	-	-	
PB20-FI	24.09.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB8-N	23.10.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB22-FI	23.10.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB23-N	23.10.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB24-N	23.10.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB25-N	23.10.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EPEC	EPEC	-	-	+	neg	-	-	
BGA5-N	23.10.2013	GP	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	
PB18-GS	27.11.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB18-MSc	27.11.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	-	EHEC	+	+	
PB18-FI	27.11.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	-	neg	-	-	
PB18-E	27.11.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-GS	28.11.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-MS	28.11.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-Gü	28.11.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	-	+	EHEC	+	-	
PB19-FI	28.11.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB19-N	28.11.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	EHEC	-	+	
PB20-GS	28.11.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB20-Gü	29.11.2013	tSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
PB20-FI	28.11.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB20-N	29.11.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-GS	05.12.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-MS	05.12.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-GeSc	05.12.2013	pSub	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	neg	neg	-	-	-	neg	-	-	
PB21-F1	05.12.2013	FI	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
PB21-F2	05.12.2013	FI	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	EHEC	EHEC	+	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	
PB21-N	05.12.2013	GP	neg	neg	neg	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	neg	neg	EHEC	EHEC	+	+	+	neg	-	-	
<b>Anzahl negativ</b>			157	106	154	29	37	14	23	148	154	110	67	84	85	73	124	133	133	
<b>Anzahl positiv</b>			0	0	0	1	37	15	22	6	0	53	45	28	27	39	23	14	14	
<b>davon EPEC</b>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	11	-	-	-	-	-	-	
<b>davon EHEC</b>			-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	34	-	-	-	23	-	-	
<b>Summe analysierte Proben</b>			157	106	154	30	74	29	45	154	154	163	112	112	112	112	147	147	147	

pSub: Substrat pflanzlicher Herkunft, tSub: Substrat tierischer Herkunft, FI: Fermenterinhalt aus dem Hauptfermenter, GP: Gärprodukt aus dem Fermenter nachgeschalteten Prozessstufen, n.a.: nicht analysiert, neg: negativ, pos: positiv, EHEC: EHEC-positiv, EPEC: EPEC-positiv, +: qPCR-Signal erhalten, -: kein qPCR-Signal

## 8.2 Anhang 2: Abstract Fröschle und Lebuhn (2014)

### *Clostridium botulinum* – Vorkommen und Verhalten im Biogasprozess

**Bianca Fröschle, Michael Lebuhn**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Lange Point 6, 85354 Freising

#### **Einleitung**

*Clostridium botulinum* zählt zu den sporenbildenden, obligat anaerob wachsenden Bakterien. Durch die Bildung des Nervengifts Botulinum-Neurotoxin ist es in der Lage, schwerwiegende, u.U. tödliche Vergiftungen bei Mensch und Tier auszulösen: den sog. Botulismus. Neben einer akuten Form wurde seit den 1990er Jahren vermehrt auch von einer chronischen Form („viszeraler“ Botulismus) bei Rindern berichtet. Das Krankheitsbild und eine ursächliche Beteiligung von *C. botulinum* sind bisher wissenschaftlich nicht gesichert. (BfR, 2012). In den Medien wurde dennoch wiederholt behauptet, Biogasanlagen trügen zur Verbreitung von *C. botulinum* bei und stellten damit ein hygienisches Risiko für Mensch und Tier dar. Diese Vorwürfe sollten in dieser Studie mit wissenschaftlichen Untersuchungen und Daten aus der Praxis geprüft werden.

#### **Material und Methoden**

Der Nachweis des Erregers erfolgte über eine kombinierte Methode aus kultureller Anreicherung und molekularbiologischer Detektion mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR). In einem Screening-Ansatz wurden Einsatzstoffe, Fermenterinhalt (Hauptgärer) und Material aus nachgeschalteten Prozessstufen (Nachgärer und Endlager) ausgewählter bayerischer Biogasanlagen qualitativ auf die Anwesenheit von *C. botulinum* untersucht. In Keimträgerversuchen wurde das Verhalten des Keims im Biogasprozess quantitativ bestimmt. Dazu wurde *C. botulinum* in mesophile (38°C) sowie thermophile (55°C) Labor-Fermenter eingebracht und der Verlauf der Keimzahlen gemessen.

#### **Ergebnisse und Diskussion**

Im Screening wurden insgesamt 106 Proben aus Praxis-Biogasbetrieben untersucht. Davon waren 34,0% pflanzliche Substrate (z.B. Silagen), 12,3% tierische Substrate (z.B. Gülle, Festmist), 23,6% Gärgemische aus Fermentern und 30,2% Gärprodukte (z.B. Material aus Nachgärern). In keiner der untersuchten Proben konnte *C. botulinum* nachgewiesen werden. Die Keimträgerversuche ergaben, dass *C. botulinum* sowohl im mesophilen und noch wesentlich schneller im thermophilen Betrieb reduziert wurde. Die Zeit, die zur Reduktion um 90% benötigt wurde (D-Wert), betrug bei 38°C  $34,6 \pm 11,2$  d und bei 55°C  $1,0 \pm 0,2$  d.

#### **Schlussfolgerungen**

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass auch der durch die Fähigkeit zur Sporenbildung widerstandsfähige und wärmeliebende *C. botulinum* durch den Biogasprozess reduziert wird. Die hygienische Qualität ist damit im Gärprodukt gegenüber den unbehandelten Einsatzstoffen wie Gülle bzw. Mist verbessert. Eine Vermehrung der Keime wurde in keinem

Fall festgestellt. Die Abwesenheit von *C. botulinum* in den Proben von Praxisbetrieben belegt, dass dieser Organismus in diesem Umfeld bei guter fachlicher Praxis von untergeordneter Bedeutung ist.

### Literatur

BfR (2012): Fragen und Antworten zum chronischen Botulismus - Aktualisierte FAQ des BfR vom 10. Februar 2012.  
<http://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zum-chronischen-botulismus.pdf>.

Bianca Fröschle, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Lange Point 6, 85354 Freising, [bianca.froeschle@lfl.bayern.de](mailto:bianca.froeschle@lfl.bayern.de)



### 8.3 Anhang 3: Posterpräsentation Fröschle und Lebuhn (2014)



**Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft**  
**LFL** Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen



**Aufgabengruppe AQU 1c**  
**Mikro- und molekularbiologische Analytik von Stoffkreisläufen**

## *Clostridium botulinum* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen?

Bianca Fröschle, Michael Lebuhn

**Hintergrund:** In den Medien wird behauptet, landwirtschaftliche Biogasanlagen würden den Krankheitserreger *C. botulinum* verbreiten.

#### *Clostridium botulinum*

- obligat anaerob wachsendes Bakterium
- ubiquitär verbreitet (z.B. im Boden)
- durch Bildung von Überdauerungsformen (Sporen) relativ widerstandsfähig
- Auslöser des Botulismus durch Bildung des Nervengifts **Botulinum-Neurotoxin** (auch: „BoNT“ oder „Botox“)



#### Botulismus – akute Form

schwerwiegende, u.U. tödliche Vergiftung bei Mensch und Tier



#### „viszeraler“ Botulismus – chronische Form

bei Rindern; Krankheitsbild und ursächliche Beteiligung von *C. botulinum* wissenschaftlich nicht gesichert

### Vorkommen im Biogasprozess



Untersucht wurden:  
106 Proben aus Praxis-Biogasanlagen (Abb. 1) mit unterschiedlicher Substratmischung, vorwiegend Einsatz von Grassilage oder Gülle

Das Screening ergab durchwegs negative Befunde; *Clostridium botulinum* wurde **nicht nachgewiesen**.

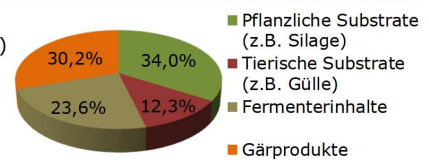


Abb. 1: Anteile der analysierten Probenmatrices

### Verhalten im Biogasprozess

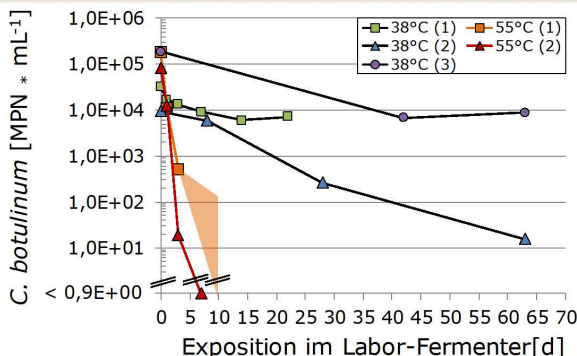


Abb. 2: Reduktion von *C. botulinum* in Laborfermentern bei 38 bzw. 55°; MPN= most probable number, wahrscheinlichste Anzahl

#### Thermophil (55°C):

- Nach **3 d** Exposition fand bereits eine deutliche **Reduktion** um mindestens **99,7%** statt.
- Die **dezimale Reduktionszeit**, d.h. die Zeit in der die Keimzahl auf ein Zehntel zurückgeht, betrug **1,0 ± 0,2 d**.

#### Mesophil (38°C):

- Im Vergleich zum thermophilen Betrieb erfolgte die Keimreduktion langsamer.
- Im Prozess waren nach **63 d** mindestens **95,4%** der eingesetzten Bakterien von *C. botulinum* abgetötet.
- Die **dezimale Reduktion** erfolgte innerhalb von **34,6 ± 11,2 d**.



#### Reduktion im Prozess

Auch der durch die Fähigkeit zur Sporenbildung widerstandsfähige und wärmeliebende *C. botulinum* wird im Biogasprozess reduziert.



#### Verbesserte hygienische Qualität

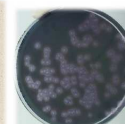
Die hygienische Qualität ist im Gärprodukt gegenüber den Einsatzstoffen wie Gülle oder Mist verbessert.

#### Keine Vermehrung

Eine Vermehrung der Keime wurde in keinem Fall festgestellt.

#### Abwesenheit in der Praxis

Bei guter fachlicher Praxis scheint *C. botulinum* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen von untergeordneter Bedeutung zu sein.



Lange Point 6, 85354 Freising, www.Lfl.bayern.de  
bianca.froeschle@lfl.bayern.de, michael.lebuhn@lfl.bayern.de  
Tel.: 08161-71-3978

## 8.4 Anhang 4: Abstract Fröschle et al. (2014a)

### Incidence of pathogenic clostridia and fate of *Clostridium botulinum* in biogas processes

**Bianca Fröschle\***, **Ute Messelhäuser\*\***, **Christiane Höller\*\***, and **Michael Lebuhn\***

\* Bavarian State Research Center for Agriculture, Department for Quality Assurance and Analytics, Lange Point 6, 85354 Freising, Germany. \*\* Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinärstraße 2, 85764 Oberschleißheim, Germany.

#### Introduction

Clostridia are ubiquitous bacteria. Some species are pathogens and cause severe human and animal diseases such as botulism, gas gangrene and blackleg in cattle and sheep. Since the mid 1990s, a multifactorial disease involving *Clostridium botulinum* has been referred to as “visceral” or “chronic botulism”. Since no defined disease pattern is scientifically assured, it is not acknowledged officially as animal disease (BfR, 2012).

Pathogenic clostridia might be present in substrates and digester contents (DC) of biogas plants. Contamination of biogas substrates with higher numbers of *C. botulinum* (i. e. by cadavers) and input into biogas digesters might occur, but only very few data characterizing the incidence and fate of the pathogen in biogas digesters are available. Thus, the first objective of this study was to evaluate the fate of *C. botulinum* during anaerobic digestion at 38°C and 55°C in sentinel chamber experiments. The second objective was to collect data on the existence of pathogenic clostridia in different biogas plant compartments. We analysed input substrates, DCs and digestates of 9 Bavarian agricultural biogas plants for the presence of *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* and *C. septicum*.

#### Materials and Methods

For enrichment of *C. botulinum*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* and *C. septicum*, samples from biogas plants were dissolved in Trypticase peptone glucose yeast extract (TPGY) broth. Prior to anaerobic incubation, the mixture was heated (60°C, 15 min) to initiate germination of spores. The same procedure was done for enrichment of *C. difficile*, but modified TPGY containing taurocholic acid sodium salt and selective antibiotic supplement was used. After enrichment and DNA extraction using a commercial stool kit, DNA extracts were analysed by 5' nuclease qPCR routines. *C. botulinum* was detected in multiplex qPCR targeting the botulinum neurotoxin genes A, B, E, F (ISO/TS 17919:2013), C and D or in a qPCR targeting *ntnH*, a protein part of the progenitor toxin complex (East and Collins, 1994). This system was developed within this study. *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* and *C. septicum* were detected by multiplex qPCR targeting the triosephosphate isomerase gene (*tpi*) and *C. novyi* by multiplex qPCR targeting the species specific gene for phospholipase C and the *C. novyi* alpha toxin (Ziegler, 2013). If the qPCR diagnosis of the enrichment culture was positive, the TPGY culture was streaked on different (partially) selective agar plates and colonies were analysed by qPCR.

Inlay experiments with sentinel chambers were performed in steadily working laboratory scale, mesophilic (38°C) or thermophilic (55°C) biogas digesters fed with renewable resources (predominantly grass silage). DC was spiked with cells of *C. botulinum* (strain LGL E2625) to a final concentration of 10<sup>4</sup> to 10<sup>5</sup> per mL<sub>DC</sub> and exposed to the digester conditions

within sentinel chambers allowing osmotic exchange. Exposure times of the sentinel chambers ranged between 1 and 63 days. Before and after exposure, sentinel chamber contents were analyzed by determining the MPN of *C. botulinum* LGL E2625 using a combined method of cultivation and qPCR targeting *ntnH*. Spores (S) and vegetative cells (V) were differentiated by TPGY enrichment in two aliquots: one (S) was heated (60°C, 15 min) before incubation and the other (V) remained unheated. The results of V and S approaches were summarized to a total MPN \* mL<sup>-1</sup>. Decimal reduction times (D-values) were calculated.

## Results and discussion

The results of mesophilic and thermophilic sentinel chamber experiments with *C. botulinum* strain LGL E2625 are shown in Figure 1. Numbers of *C. botulinum* were reduced in each experiment. The reduction proceeded substantially more slowly in the mesophilic experiments. It ranged between 1.3 and 2.8 orders of magnitude (95.4 and 99.8%, respectively) after 63 d of exposure in mesophilic digesters and amounted  $\geq 2.7$  orders of magnitude ( $\geq 99.7\%$ ) after 3 d of exposure in both thermophilic experiments. Decimal reduction was accomplished in 34.6 d and 1.2 d in mesophilic and thermophilic digester conditions, respectively.

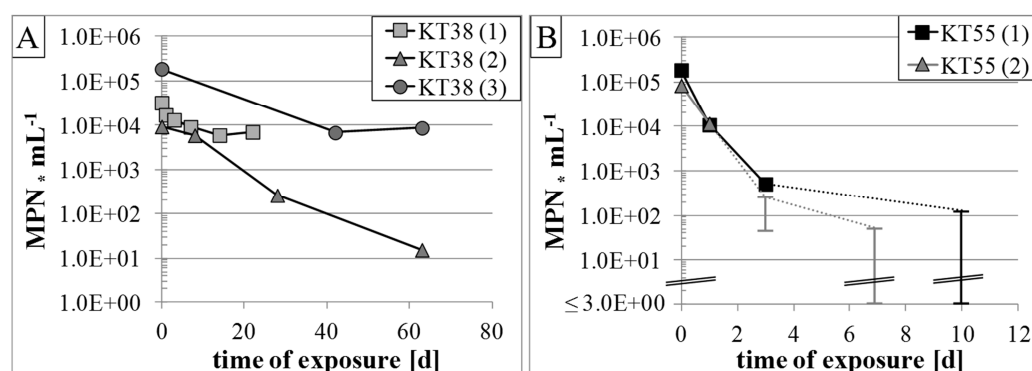


Figure 1: Reduction of *C. botulinum* strain LGL E2625 in sentinel chamber experiments in mesophilic (38°C, A) and thermophilic (55°C, B) anaerobic digesters. Error bars (B) indicate that MPN \* mL<sup>-1</sup> were less than the detection limit of the respective approach.

The screening of plant substrates (PS) and animal substrates (AS), DCs and digestates (D) resulted in detection of *C. difficile* in 5,3% of 38 PS, 64,3% of 14 AS, 53,7% of 42 DC and 72,3% of 48 D. *C. novyi* was detected in 6 (4,4%; 1 PS, 3 DC, 2 D) of 136 analysed samples in total. *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* and *C. septicum* were not found in any of the 142 analysed samples (42 PS, 16 AS, 41 DC, 51 D).

## Conclusions

*C. botulinum* strain LGL E2625 was reduced in sentinel chamber experiments in mesophilic and more pronounced in thermophilic anaerobic digestion. Screening of samples from biogas plants revealed no incidence of *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum* and *C. septicum*. *C. novyi* was marginally found and *C. difficile* was more frequently detected in animal substrate digestion lines.

## References

BfR (2012) Questions and answers on chronic botulism.. The Federal Institute for Risk assessment. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Germany. <http://www.bfr.bund.de/cm/>

349/questions-and-answers-on-chronic-botulism.pdf. 19.02.2014.

East, A. K. and Collins, M. D. (1994) Conserved Structure of Genes Encoding Components of Botulinum Neurotoxin Complex M and the Sequence of the Gene Coding for the Nontoxic Component in Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Type F. *Curr. Microbiol.* 29 (1994), 69-77.

ISO/TS 17919:2013. Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Ziegler, J. S. 2013 Comparative differentiation of *Clostridium* spp. with biochemical and molecular methods and MALDI-TOF mass spectrometry. Vergleichende Differenzierung von *Clostridium* spp. mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie. Ph.D thesis. Ludwig-Maximilians-Universität, Munich.

## 8.5 Anhang 5: Abstract Fröschle et al. (2014b)

### Fast quantification of viable EHEC/EPEC involving qPCR methodology

**Bianca Fröschle, Isabella Kinker and Michael Lebuhn**

\* Bavarian State Research Center for Agriculture, Department for Quality Assurance and Analytics, Lange Point 6, 85354 Freising, Germany.

#### Introduction

Although DNA targeted biomolecular methods such as quantitative real-time PCR (qPCR) are highly specific, sensitive and time saving, they can confer problems if only viable organisms are of interest. If regulatory requirements demand the absence of certain pathogenic germs in biological material, only the presence of DNA of viable germs is relevant, whereas the detection of DNA of dead germs can overestimate this fraction. We developed a fast method to differentiate between qPCR signals caused by DNA of viable and nonviable EHEC/EPEC and to quantify the viable fraction.

#### Materials and Methods

An exponentially growing EPEC strain LGL 38122 (*stx*-, *eae*+, *Ehly*+) was diluted in biogas digester content, poured into sentinel chambers and exposed to the conditions in laboratory biogas digesters fed with renewable resources. After exposure, the sentinel chamber contents were enriched by cultivation on the basis of LFGB method L07.18. This method includes a pre-enrichment step in modified Tryptic Soy Broth with Novobiocin (mTSB+N) followed by an enrichment step (inoculation of 4 volumes of mTSB with 1 volume of pre-enrichment culture). The enrichment culture was streaked on Endo agar. Cultivation was performed in log dilutions and in triplicate allowing quantification by MPN analysis. qPCR analyses were done before and after pre-enrichment and enrichment steps as well as with colonies from agar suspended in sterile water. Strain LGL 38122 was detected by qPCR targeting the gene for enterohemolysin (*E-hly*). The 5' nuclease qPCR system was developed using bioinformatical routines and evaluated with a strain collection.

#### Results and discussion

Exposure to the conditions in laboratory digesters caused a reduction of viable EPEC strain LGL 38122 to a variable extent, providing material with DNA either of exclusively viable, viable and nonviable or exclusively nonviable cells. Dilutions of pre-enrichment cultures without viable cells resulted either in no qPCR signal if DNA was eliminated by dilution or degradation within the laboratory digesters, or qPCR signals arose due to the presence of dead cells. This was verified by comparison of  $C_q$ -values after incubation ( $C_q$ [mTSB+N]) to  $C_q$ -values of the analogue dilution in mTSB+N before incubation ( $C_q$ [BI]). If  $C_q$ [mTSB+N] -  $C_q$ [BI]  $\geq 0$  was correct, detected DNA originated from dead EPEC. If  $C_q$ [mTSB+N] -  $C_q$ [BI]  $< 0$  was true, viable cells of strain LGL 38122 proliferated and caused increase of DNA. A similar approach was successfully conducted by comparing  $C_q$ [mTSB+N] and  $C_q$  of the mTSB culture  $C_q$ [mTSB], taking account of the dilution at inoculation of the enrichment culture. Results were verified by qPCR of cell suspensions from Endo agar. Further studies should reveal if the method is applicable with other gene markers of EHEC like *stx* or *eae*.

## **Conclusions**

Applying the comparative method allowed to differentiate between qPCR signals from DNA of viable and nonviable EHEC/EPEC and to quantify the viable fraction involving MPN statistics.

Quantification was accomplished within 24 h. This shortened the analysis time by 1.5 d compared to the reference method.



8.6 Anhang 6: Posterpräsentation Fröschle et al. (2014)

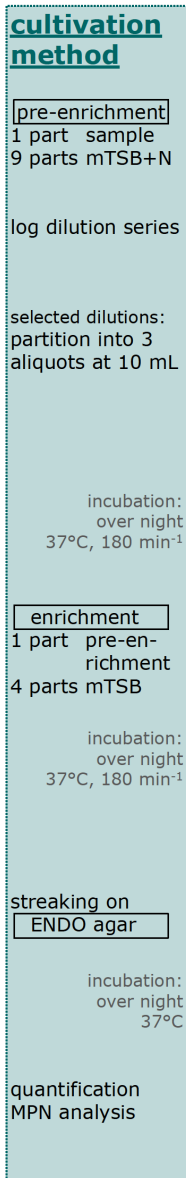
# Fast quantification of viable EHEC/EPEC in digestate involving qPCR methodology

Bianca Fröschle, Isabella Kinker and Michael Lebuhn

**Introduction**

Although DNA targeted biomolecular methods such as quantitative real-time PCR (qPCR) are highly specific, sensitive and time saving, they can confer problems if only viable organisms are of interest. If regulatory requirements demand the absence of certain pathogenic germs in

biological material, only the presence of DNA of viable germs is relevant, whereas the detection of DNA of dead germs can overestimate this fraction. We developed a fast method to differentiate between qPCR signals caused by DNA of viable and non-viable EHEC/EPEC and to quantify the viable fraction.

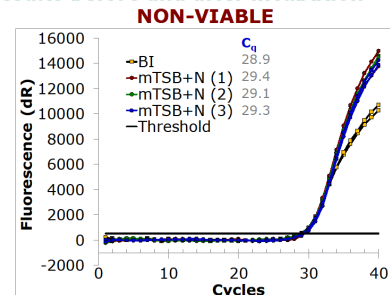
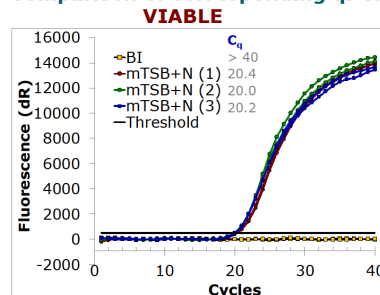


**Materials and Methods**

- exposure of digestate spiked with EPEC cells to the conditions in laboratory biogas digesters fed with renewable resources in sentinel chambers
- enrichment of the sentinel chamber contents by cultivation on the basis of the German Food and Feed Code (LFGB) method L07.18 adapted for MPN analysis
- qPCR analyses targeting the gene for enterohemolysin (*Ehly*) before and after pre-enrichment and enrichment steps as well as of colonies from agar
- MPN analysis

**Results**

**Comparison of corresponding qPCR results before and after incubation**



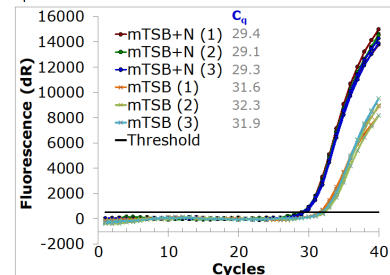
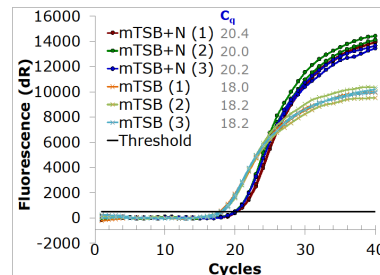
$C_q[mTSB+N] < C_q[BI]$   
viable cells proliferated and caused increase of DNA

$C_q[mTSB+N] \geq C_q[BI]$   
detected DNA originated from non-viable EPEC

no qPCR signal for BI due to elimination of DNA by dilution

or: no qPCR signal if DNA was eliminated by dilution or degradation within the laboratory digesters

A similar approach was successfully conducted by comparing qPCR results before and after incubation of the enrichment, taking account of the dilution (1:5) at inoculation of the enrichment culture. →  $C_q[mTSB+N] + 2.3$



$C_q[mTSB] < C_q[mTSB+N] + 2.3$

$C_q[mTSB] \geq C_q[mTSB+N] + 2.3$

Verification of results by qPCR of cell suspensions from ENDO agar

**Conclusions**

Applying the comparative method allowed

- to differentiate between qPCR signals from DNA of viable and nonviable EHEC/EPEC
- therefore, to quantify the viable fraction involving MPN statistics already after one over night incubation step (< 24 h) → shortening of the analysis time by > 1.5 d compared to the reference method (values from ENDO agar)

This study was realized by financial support of the Bavarian State Ministry for Nutrition, Agriculture and Forestry.



Bavarian State Research Center for Agriculture,  
Central Department for Quality Assurance and Analytics, Micro- and Molecular Biology  
Lange Point 6, 85354 Freising, Germany, www.LFL.bayern.de  
bianca.froeschle@lfl.bayern.de



## 8.7 Anhang 7: Abstract Messelhäusser et al. (2014)

### Detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in biogas plants in combination with germ carrier experiments

Ute Messelhäusser<sup>1</sup>, Bianca Fröschle<sup>2</sup>, Michael Lebuhn<sup>2</sup>, Christiane Höller<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleissheim, Germany; <sup>2</sup> Bavarian State Research Center for Agriculture, Department for Quality Assurance and Analytics, Lange Point 6, 85354 Freising, Germany

There exist only few scientific studies concerning the behavior of human and animal pathogens like Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in biogas plants. This is one of the reasons why from time to time biogas plants are in the public focus with people suspecting that the concentration of pathogenic microorganisms can increase during the fermentation process, thus probably leading to human or animal infections when the fermentation substrates are spread in the environment. Therefore the aim of our study was (1) to analyze the material at the different steps of the biogas process for the presence of STEC and EPEC in different biogas plants in Bavaria and (2) to test the ability of EPEC to survive under controlled conditions in mesophilic anaerobic digesters. Data of both investigations should be used for a comprehensive risk assessment concerning the incidence of STEC and EPEC during the biogas process and the risk that these pathogens contaminate the environment via fermentation substrates.

#### Materials and methods

Between the years 2012 – 2013 nine Bavarian biogas plants were sampled at the different steps of the biogas process. Samples were taken from different substrates like corn silage, poultry manure or cattle liquid manure, the contents of the fermenter and the final depot and were investigated with a combined microbiological and molecular method. The toxin genes, *stx1* and *stx2* and the intimin (*eae*) gene were detected by real-time-PCR according to Pavlovic et al, 2010. In case of a positive real-time-PCR result isolation of the bacteria was performed with DNA-colonyblot hybridization to confirm the viability of the detected organisms.

For germ carrier experiments, digester content (DC) was taken from steadily working 32 L digester systems and ca. 8 mL DC were spiked with exponentially growing EPEC cells (strain LGL 38122, isolated from a soil sample in immediate vicinity of a cattle farm) to a final concentration of approximately  $10^8$  per mL<sub>DC</sub>. Spiked DC was poured into a germ carrier and exposed to the digester conditions (mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of renewable resources, predominantly grass silage). Germ carriers consisted of a glass tube which was fitted with filters of 0.2 µm pore size in a screw cap on each end allowing osmotic exchange. Exposure times of the germ carriers within the digesters ranged between 30 min and 3 d. Before and after exposure, the germ carrier contents were analyzed by determining the MPN of viable EPEC 38122 using a combination of cultivation and qPCR methods. Decimal reduction times (D-values) were calculated. EPEC strain LGL 38122 was detected by qPCR targeting *Ehly*, the EHEC hemolysin. The 5' nuclease qPCR system with a hydrolysis probe was developed in this study.



## Results and discussion

In the samples taken from Bavarian biogas plants, *stx1*, *stx2* and *eae*-genes were regularly detected in the different substrates and also in the fermenter samples. Overall 36 samples were tested positive for the presence of the *stx1* or the *stx2* genes and 11 samples for the presence of the *eae*-gene. However, using DNA-colonyblot hybridization viable STEC or EPEC could not be detected in the real-time-PCR positive samples. In order to see, if there is any indication that STEC or EPEC can survive the whole biogas process, germ carrier experiments were carried out with an EPEC strain in mesophilic anaerobic digesters.

Three germ carrier experiments were performed in mesophilic anaerobic digesters. In each experiment the concentration of EPEC LGL 38122 was reduced (Figure 1). In experiment KT38 (2) the quantified MPN were less than the detection limit of  $300 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$  after 24 h and  $3 \text{ MPN} \cdot \text{mL}^{-1}$  after 48 and 72 h of exposure which is indicated by the grey area in Figure 1. After  $23 \pm 1$  h of exposure the extent of reduction ranged from nearly two to more than 6 orders of magnitude. This corresponds to a germ reduction of 97.6 to 99.9999%. Decimal reduction times of 14.9,  $\leq 4.3$  and 3.2 h were calculated for experiments KT38 (1), (2) and (3), respectively. The variation to experiment KT38 (1), which showed a considerably slower reduction, could probably be explained by differences in ammonia concentrations. They were calculated to be 172, 305 and 491  $\text{mg NH}_3\text{-N} \cdot \text{kg}_{\text{DC}}^{-1}$  for experiment KT38 (1), (2) and (3), respectively. Two germ carrier experiments were performed under thermophilic conditions (KT55 (1) and (2), Figure 1). Already after 30 min exposure time the spiked EPEC strain LGL 38122 ( $> 10^8 \cdot \text{mL}_{\text{DC}}^{-1}$ ) could not be detected anymore. Due to missing data for exposure times less than 30 min, the D-value could not be precisely defined, but it was less than 3.4 min. The ammonia concentration was 1170 and 780  $\text{mg NH}_3\text{-N} \cdot \text{kg}_{\text{DC}}^{-1}$  for experiment KT55 (1) and (2), respectively.

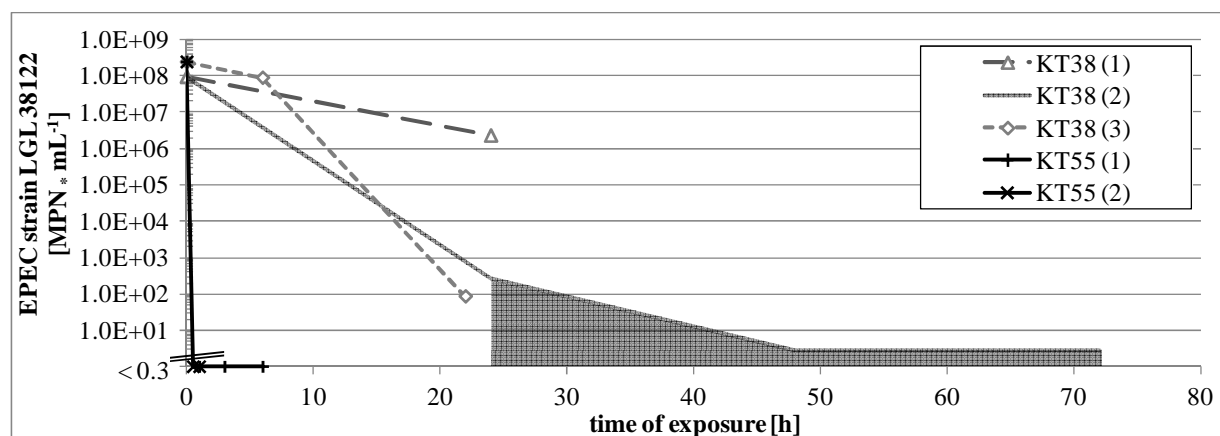


Figure 2: Reduction of EPEC strain LGL 38122 in mesophilic and thermophilic biogas processes

## Literature

Pavlovic M, Huber I, Skala H, Konrad R, Schmidt H, Sing A, Busch U. 2010. Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Foodborne Pathog Dis.* 7(7):801-8.