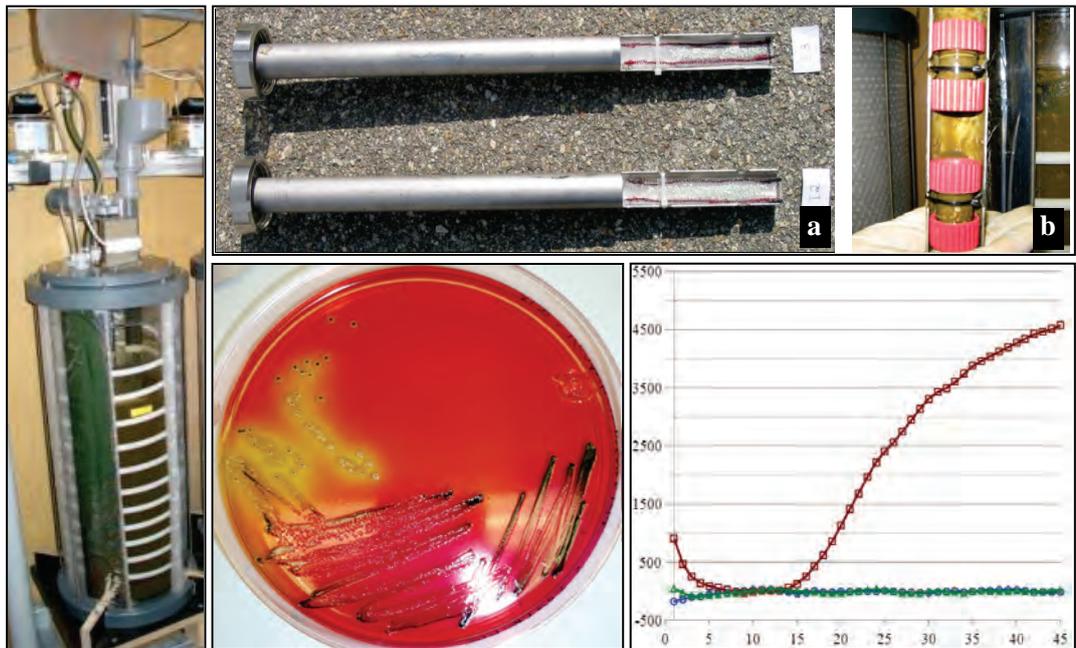




LfL

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess



LfL-Information

Impressum

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising-Weihenstephan
Internet: www.LfL.bayern.de

Redaktion: Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
Lange Point 4, 85354 Freising
E-Mail: AQU@LfL.bayern.de
Telefon: 08161-71-3600

1. Auflage: August 2012

Druck: Druckerei Lerchl, 85354 Freising

Schutzgebühr: 5,00 Euro

© LfL



LfL

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess

**Bianca Frösche
Dr. Michael Lebuhn**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung, Hintergrund und Zielsetzung7
2	Rechtliche Rahmenbedingungen9
2.1	Bioabfallverordnung (BioAbfV)9
2.2	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung (TierNebV)10
2.3	Düngemittelverordnung (DüMV)11
3	Material und Methoden12
3.1	Aufbau der Versuchsfermenter12
3.2	Untersuchungen auf Salmonellen.....13
3.2.1	Prinzip, Aufbau und Ablauf der Keimträgerversuche.....13
3.2.2	Mikrobiologischer Nachweis von Salmonellen durch klassische Kultivierungsmethoden14
3.2.3	Molekularbiologischer Nachweis von Salmonellen durch quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....16
3.2.4	Untersuchung von Gärresten aus Labor- und Praxis-Biogasanlagen auf Salmonellen17
4	Ergebnisse und Diskussion18
4.1	Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess - Keimträgerversuche.....18
4.1.1	Keimträgerversuche im thermophilen Temperaturbereich (60°C).....18
4.1.2	Keimträgerversuche im mesophilen Temperaturbereich (38°C)19
4.1.3	Keimreduktion in ein- und mehrstufigen ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktorsystemen20
4.1.4	Molekularbiologischer Nachweis von Salmonellen durch quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....22
4.2	Untersuchung von Gärresten aus Labor- und Praxis-Biogasanlagen auf Salmonellen27
5	Fazit und Empfehlungen für eine Umsetzung in die Praxis.....29
6	Literaturverzeichnis32
7	Verzeichnis der Gesetze und Verordnungen34

1 Einleitung, Hintergrund und Zielsetzung

Der Biogasprozess ist in den letzten Jahren im Zuge der Energiewende besonders ins öffentliche Interesse gerückt. Der Anteil des aus Biogas erzeugten Stroms steigt jährlich und betrug 2011 in Deutschland etwa 2,9% des Endenergieverbrauchs (2007: 1%, 2001: 0,1%; BMU, 2012). Nach Angaben des Deutschen Biomasseforschungszentrum waren Ende 2011 deutschlandweit rund 7.200 Biogasanlagen mit einer installierten elektrischen Leistung von ca. 2.850 MW el. in Betrieb (DBFZ, 2012). Davon stellt Bayern mit 2.372 Anlagen (674 MW el. installierte elektrische Leistung) im bundesweiten Vergleich die größte Anzahl (Strobl, 2012; DBFZ, 2011). Landwirtschaftliche Biogasanlagen, in denen nachwachsende Rohstoffe (NawaRo) zur Energiegewinnung vergoren werden, haben in den letzten Jahren stark zugenommen. Im Jahr 2011 waren laut DBFZ (2012) rund 82% der Energiebereitstellung in Biogasanlagen auf den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen zurückzuführen.

Schon länger als zur Energiegewinnung wird die anaerobe Vergärung zum Abbau organischen Materials auch in anderen Bereichen verwendet. Beispielsweise sind Kläranlagen mit speziellen Faulanlagen oder -türmen ausgestattet, in denen eine Klärschlammstabilisierung durchgeführt wird. Deren Gasproduktion ist ein positiver Nebeneffekt (Frey, 2012). Ein Abbau von organischer Substanz zu Biogas findet auch statt, wenn Bioabfälle anaerob behandelt werden. Daneben spielt hierbei der Effekt der Hygienisierung eine wichtige Rolle. Neben der Pasteurisierung ist die thermophile anaerobe Vergärung eine alternative Methode zur Behandlung von Bioabfällen (BioAbfV, 2012).

Dennoch werden Biogasanlagen in der Öffentlichkeit zuweilen als Ursache hygienischer Probleme dargestellt. Beispielsweise wurden sie in den Medien als Auslöser der jüngsten EHEC-Krise im Jahr 2011 verdächtigt. Auch toxinbildende Clostridien und Salmonellen waren immer wieder ein Thema. Dabei wurde sogar behauptet, dass sich Krankheitserreger im Biogasprozess vermehren würden, ohne dass die Behauptungen durch wissenschaftliche Untersuchungen belegt waren.

Dagegen haben Studien gezeigt, dass die anaerobe Vergärung des Biogasprozesses insbesondere bei thermophilem Betrieb über ein hohes Hygienisierungspotential verfügt. Entsprechende Ergebnisse aus Laborversuchen sowie aus Experimenten im Praxismaßstab finden sich bei Lebuhn und Wilderer (2006) sowie bei Lebuhn et al. (2007). Die zentrale Aussage aus den Untersuchungen war, dass die thermophile anaerobe Vergärung insbesondere bei Temperaturen $\geq 55^{\circ}\text{C}$ stark hygienisierend wirkt und einen Beitrag zum Gewässerschutz leisten kann. Bei thermophiler Prozessführung kann dabei sogar eine hygienische Gärrestqualität erreicht werden, die eine Ausbringung selbst in wasserwirtschaftlich sensiblen Zonen diskutabel macht. Salmonellen, die von rechtlicher Seite als Indikatororganismus zur Beurteilung des seuchenhygienischen Zustands herangezogen werden (siehe 2. Rechtliche Rahmenbedingungen), wurden in diesen Arbeiten nicht untersucht.

Salmonellen sind bakterielle Krankheitserreger. Die häufigste von ihnen ausgelöste Krankheit wird als Salmonellose oder Salmonella-Enteritis bezeichnet. Es handelt sich um eine Magen-Darm-Erkrankung, die mit Durchfall und Erbrechen verbunden ist. Die Erkrankung tritt üblicherweise in leichten Verlaufsformen auf und muss nicht mit Antibiotika behandelt werden. Schwerere Verlaufsformen kommen eher bei älteren oder abwehrschwächeren Personen vor. Eine Infektion mit Salmonellen erfolgt meist über die Aufnahme mit Lebensmitteln. Der Darmtrakt von Tieren gilt als Hauptreservoir für Salmonellen in der Umwelt. Diese sind in der Regel nur Träger der Keime und erkranken selten an ih-

nen (RKI, 2009). Über die Ausscheidungen solcher Träger-Tiere können Salmonellen in Biogasanlagen gelangen.

In dieser Informationsbroschüre werden Inhalte und Ergebnisse des Teilprojekts „Hygienisierung in Biogasanlagen“ im Forschungsprojekt „Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe“ (K/08/07) dargestellt. Die Bearbeitung erfolgte durch die Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) am Institut für Landtechnik und Tierhaltung (LfL-ILT) und an der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen (LfL-AQU) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz (LfL-IAB) und wurde durch das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten gefördert.

In dieser Studie sollte geprüft werden, inwieweit Salmonellen bei meso- und thermophiler Prozessführung durch den Biogasprozess abgetötet werden, und wie die seuchenhygienische Qualität des Gärrests angesichts der Maßgaben in Rechtsbestimmungen (Bioabfallverordnung, Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung und Düngemittelverordnung; siehe 2.) einzuschätzen ist. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich schnelle und spezifische molekularbiologische Methoden gewinnbringend in den Analysenablauf integrieren lassen. Es bestanden folgende Zielsetzungen:

1. Untersuchung der keimabtötenden Wirkung auf Salmonellen bei stabilem Fermenterbetrieb bei 38°C und 60°C
 - a) über eine konventionelle, kultivierungsbasierte Methode zum Salmonellen-Nachweis, die in der Bioabfallverordnung vorgeschrieben wird und auch in anderen Forschungsbereichen (z.B. Lebensmittelsicherheit) Anwendung findet.
 - b) über schnelle und spezifische qPCR-Analytik, die zu verschiedenen Zeitpunkten in den Ablauf der Kultivierung (a) eingebaut werden sollte, um die Analysezeit bis zum abschließenden Ergebnis abzukürzen.
2. Beurteilung der Hygienisierungsleistung des Biogasprozesses gegenüber Salmonellen bei thermophilem und mesophilem stabilem Fermenterbetrieb. Aus den Ergebnissen sollten Empfehlungen für die Praxis abgeleitet werden.
3. Durchführung von Produktprüfungen (Screening auf Salmonellen) in Gärgemischen und Gärresten verschiedener Praxis- und Technikumsbiogasanlagen.

Ausführliche Informationen zum Projekt und den erzielten Ergebnissen können dem Abschlussbericht entnommen werden (Marín Pérez et al., 2012). Weitere Informationen zum Thema Hygienisierung durch den Biogasprozess finden sich auch in der LfL-Information „Biogastechnologie für Hygiene und Umwelt in Wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten“ (Lebuhn et al., 2007) sowie in der LfL-Schrift: „Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten“ (Lebuhn und Wilderer, 2006).

2 Rechtliche Rahmenbedingungen

Von rechtlicher Seite her können drei Dokumente im Zusammenhang mit Hygiene- und Hygienisierungsvorschriften für die Verwertung von Stoffen in Biogasanlagen von Bedeutung sein: die Bioabfallverordnung (BioAbfV), die Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung (TierNebV) und die Düngemittelverordnung (DüMV).

Als Indikatororganismen für die Beurteilung des seuchenhygienischen Zustands werden in allen drei Verordnungen wiederkehrend *Salmonellen* (z.T. neben anderen) herangezogen.

2.1 Bioabfallverordnung (BioAbfV)

Die BioAbfV regelt auf der Grundlage des Kreislaufwirtschaftsgesetzes (KrWG) die Verwertung von Bioabfällen als Düngemittel auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden. Darunter fallen auch Regelungen über die Behandlung und Untersuchung solcher Bioabfälle. Sie wurde 1998 erstmalig ausgefertigt und erfuhr ihre letzte Novellierung im Frühjahr 2012. Die BioAbfV gilt nicht für die Eigenverwertung von Bioabfällen oder wenn andere Rechtsvorschriften übergeordnet sind (z.B. für Klärschlamm oder tierische Nebenprodukte).

Die thermophile (mindestens 50°C) anaerobe Vergärung innerhalb des Biogasprozesses ist ein mögliches hygienisierendes Behandlungsverfahren nach der BioAbfV. Die Anforderungen an ein solches Verfahren müssen zur Gewährleistung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit durch die Ergebnisse folgender Untersuchungen eingehalten werden:

Prozessprüfung

- Nachweis der Wirksamkeit der hygienisierenden Behandlung,
- Testkeim der Seuchenhygiene: *Salmonella enterica* sv. Senftenberg, untersucht wird das Ausmaß der Abtötung durch den Prozess,
- Zeitpunkt: einmalig nach Inbetriebnahme oder größeren, technischen Änderungen;

Prozessüberwachung

- Nachweis der Einhaltung der erforderlichen Behandlungstemperaturen
- sowie der Beschickungs- und Entnahmeintervalle,
- Zeitpunkt: ständig;

Prüfung der hygienisierten Bioabfälle (Produktprüfung)

- Nachweis der hygienischen Unbedenklichkeit der behandelten Bioabfälle,
- Testkeime der Seuchenhygiene: Bakterien der Gattung *Salmonella*,
- Zeitpunkt: wiederkehrend pro definierter Durchsatz-Menge.

Die BioAbfV findet für Biogasanlagen Anwendung, wenn Bioabfälle als Substrat zum Einsatz kommen. Eine ausführliche Auflistung der als Bioabfall geltenden Abfälle wird im Anhang der BioAbfV gegeben. Eine Sonderstellung nehmen hierbei Gülle und andere tierische Ausscheidungen ein, die zwar als Bioabfall eingestuft werden, aber von den oben beschriebenen Behandlungs- und Untersuchungspflichten freigestellt sind. Zu beachten ist aber, dass tierische Ausscheidungen wie Gülle auch der (EG) Nr. 1069/2009 (mit Hygie-

nevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte) und in der nationalen Umsetzung dem Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz bzw. der Tierischen Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung (s. 2.2) unterliegen.

2.2 Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung (TierNebV)

Die TierNebV ist eine Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes und nimmt stark Bezug auf die europäische Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 (mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte) Die aktuelle Fassung der TierNebV wurde im Jahr 2006 ausgearbeitet (letzte Novellierung im Frühjahr 2012) und gilt für den Umgang mit tierischen Nebenprodukten inkl. Küchen- und Speiseabfällen tierischer Herkunft, die jeweils in der europäischen Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 definiert wurden. Eine Novelle dieses Dokuments liegt in der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 mit der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 142/2011 vor. Es wurde eine Unterteilung der tierischen Nebenprodukte in drei Risiko-Kategorien vorgenommen (Biogashandbuch Bayern, 2007):

Material der Kategorie 1:

- hohes seuchenhygienisches Risiko
- z.B. Tiere mit Verdacht auf TSE (= BSE bei Rindern, Scrapie bei Schafen), spezifiziertes Risikomaterial
- generell keine Verwertung in Biogasanlagen zulässig

Material der Kategorie 2:

- seuchenhygienisches Risiko
- z.B. Tiermaterial mit Rückständen bestimmter Tierarzneimittel, Gülle, Magen- und Darminhalt, Kolostrum
- Verwertung in Biogasanlagen nach Drucksterilisation zulässig

Ausnahme: Gülle, Magen-/Darminhalt und Kolostrum dürfen in registrierten Biogasanlagen auch ohne Vorbehandlung eingesetzt werden, wenn sie a) als alleiniges tierisches Nebenprodukt eingesetzt werden, b) als seuchenhygienisch unbedenklich eingestuft werden, und c) der Rückstand der Vergärung als unbehandeltes Material angesehen wird

Material der Kategorie 3:

- geringes seuchenhygienisches Risiko
- z.B. nicht mehr verkäufliche Lebensmittel, bei der Herstellung von Lebensmitteln anfallende tierische Nebenprodukte, Speiseabfälle aus privaten Haushalten
- Verwertung in Biogasanlagen nach Pasteurisierung oder adäquater hygienisierender Behandlung zulässig

Zur Überwachung des Behandlungsverfahrens müssen Fermentationsrückstände von Biogasanlagen je nach der Art der eingesetzten tierischen Materialien gewisse Anforderungen erfüllen. Die TierNebV bezieht sich hierbei auf die Verordnung (EG) Nr. 1774/2002, in der u.a. die Untersuchung der Fermentationsrückstände auf Salmonellen ein wichtiger Parameter ist, der über die Zulassung einer Biogasanlage zur Verwertung tierischer Nebenprodukte entscheiden kann. Die zum Salmonellennachweis anzuwendenden Untersu-

chungsverfahren sind hierbei dieselben, die auch in der BioAbfV für die Prüfung der hygienisierten Bioabfälle gelten (s. 2.1).

Wird Gülle wie oben beschrieben ohne Vorbehandlung als alleiniges tierisches Nebenprodukt in einer Biogasanlage verarbeitet, schreibt die TierNebV für das behandelte Gülleprodukt beim Inverkehrbringen ebenso wie für die Gülle eine Untersuchung u.a. auf Salmonellen vor. Ausnahmen von der Untersuchungspflicht können unter Berufung auf die Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 zugelassen werden. Die Ausbringung von Gülle und Gülleprodukten ist durch die TierNebV nicht beschränkt. Es sind allerdings insbesondere beim Inverkehrbringen als Düngemittel die Vorgaben der Düngemittelverordnung (DüMV, 2.3) zu beachten (Biogashandbuch Bayern, 2007).

2.3 Düngemittelverordnung (DüMV)

Die DüMV ist eine Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln. Die aktuelle Fassung der DüMV wurde im Jahr 2008 ausgefertigt und im Frühjahr 2012 letztmalig novelliert.

Die DüMV regelt u.a. die Herstellung und Zulassung von Düngemitteln und das Inverkehrbringen von Wirtschaftsdüngern. Sie macht Angaben zu seuchen- und phytohygienischen Anforderungen an die abgegebenen Stoffe und zu entsprechenden Kennzeichnungsvorschriften.

Gärreste gelten als flüssige organische Düngemittel. Werden nur Stoffe, die im landwirtschaftlichen Betrieb anfallen, eingesetzt, werden sie als Wirtschaftsdünger bezeichnet (Düngegesetz (DüngG), 2012, §2, Abs. 2.). Bei der Verwendung und dem Inverkehrbringen fallen Gärreste somit in den Geltungsbereich der DüMV. Für die Zulassung von Düngemitteln nach der DüMV müssen diese so beschaffen sein, dass sie „bei sachgerechter Anwendung die Fruchtbarkeit des Bodens, die Gesundheit von Menschen, Haustieren und Nutzpflanzen nicht schädigen und den Naturhaushalt nicht gefährden“. Dies bedeutet, dass keine Krankheitskeime, Toxine und Schaderreger enthalten sein dürfen.

Die DüMV zieht wie auch die BioAbfV und die TierNebV den Gehalt an Salmonellen als ausschlaggebenden Faktor für die Beurteilung des seuchenhygienischen Zustandes des Materials heran. So dürfen in 50 g Probenmaterial keine Salmonellen nachweisbar sein. Allerdings sind auch Materialien, die Salmonellen enthalten, nicht vom Inverkehrbringen als Düngemittel ausgeschlossen, wenn sie unter bestimmten Bedingungen abgegeben werden: u.a. müssen Angaben zur Salmonellen-Belastung in der Kennzeichnung des Wirtschaftsdüngers enthalten sein und Auflagen hinsichtlich der Anwendung eingehalten werden (DüMV, 2012, §5, Abs. 3). Diese seuchenhygienischen Anforderungen gelten für Wirtschaftsdünger nur, wenn die Lagerung in einem gemeinschaftlichen Lager (z.B. Gülle- oder Gärrestlager) erfolgt und die Abgabe an einen Dritten vorgenommen werden soll, der nicht an der Nutzung des Lagers beteiligt ist.

3 Material und Methoden

3.1 Aufbau der Versuchsfermenter

Die Versuchsanlagen des LfL-ILT waren ein- bzw. zweistufig betriebene Biogasfermenter im Labormaßstab (s.a. Tabelle 1). Die einstufigen Fermenter (Abbildung 1) hatten ein Arbeitsvolumen von max. 35 L und konnten mesophil (hier 38°C) oder thermophil (hier 60°C) betrieben werden. Die zweistufigen Systeme (Abbildung 2) bestanden aus einem liegenden Hydrolysefermenter (HS) mit 35 L und einem stehenden methanogenen Fermenter (MS) mit 70 L Arbeitsvolumen. Die HS wurden in der Regel thermophil bei 55-60°C betrieben, die MS mesophil bei 38°C. Die Systeme wurden semikontinuierlich gerührt und in der Regel täglich gefüttert. Für die Untersuchung der Hygienisierungsleistung wurden Versuchsanlagen in verschiedenen Betriebsvarianten ausgewählt. Die meisten Versuche fanden in Fermentern statt, die mit Maissilage gefüttert wurden. Ein Versuch wurde in einem mit einer Mischung aus Grassilage und Gülle beschicktem Fermenter durchgeführt. Alle Fermenter wurden begleitend auch auf die üblichen chemischen Prozessparameter hin untersucht.



Abbildung 1: Anlagen-Beispiele für einstufige Durchfluss-Fermenter



Abbildung 2: Anlagen-Beispiel für zweistufig betriebene Fermenter

3.2 Untersuchungen auf Salmonellen

Zur Untersuchung der Hygienisierungsleistung des Biogasprozesses auf Salmonellen wurden, wie in der BioAbfV für Bioabfälle vorgegeben (siehe 2.1), zum einen Prozessprüfungen in Form von Keimträgerversuchen und zum anderen Produktprüfungen an behandelten Gärresten durchgeführt.

3.2.1 Prinzip, Aufbau und Ablauf der Keimträgerversuche

Bei den Keimträgerversuchen wird eine bestimmte Anzahl an krankheitserregenden Keimen innerhalb eines mit Gärrest befüllten Keimträgers in einen Fermenter eingebracht. Nach unterschiedlich langen Verweilzeiten (Inkubationszeiten) im Fermenter werden sie wieder entnommen. Die Anzahl an Keimen vor und nach der Inkubation wird verglichen. So ist es möglich, die Entwicklung der Keimzahlen eines Krankheitserregers innerhalb des Prozesses aufzunehmen und das Potenzial des Prozesses zur Hygienisierung zu bestimmen.

Die Keimträger bestanden aus einem Glasrohr mit etwa 2 cm Durchmesser, das zur Gewährleistung des osmotischen Austauschs von Nährstoffen und Produkten mit dem umgebenden Fermenterinhalt an beiden Enden mit bakteriendichten Filtern in Schraubverschlüssen versehen wurde (Abbildung 3b). Jeweils zwei Keimträger konnten mittels eines Keimträgerrohrs (Abbildung 3a) in einen Versuchsfermenter eingebracht werden.

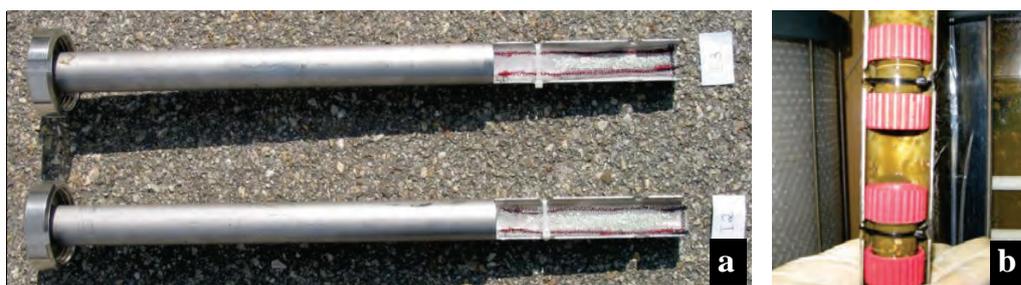


Abbildung 3: a: Keimträgerrohre zur Fixierung der Keimträger im Fermenter; b: Zwei in einem Keimträgerrohr befestigte Keimträger

Zur Befüllung der Keimträger wurde den LfL-ILT Versuchsanlagen Salmonellen-freier Fermenterinhalt entnommen und mit einer definierten Anzahl an Salmonellen versetzt. Hierzu wurde nach Vorschrift der BioAbfV der Stamm *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sv. Senftenberg W775 verwendet (Abbildung 4). Die Keimzahl betrug ca. 10^8 Salmonellenkeime pro mL Keimträgerinhalt. Die mit einer definierten Menge (< 10 g) des mit Salmonellen versetzten Gärgemischs befüllten Keimträger wurden mit Hilfe eines Trägerrohres (Abbildung 3a) in den Fermentern befestigt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (bis zu 2 Tage) wurden die Keimträger wieder entnommen und die Keimträgerinhalte mikrobiologisch (durch klassische Kultivierungsmethoden) und parallel dazu molekularbiologisch (mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)) untersucht.

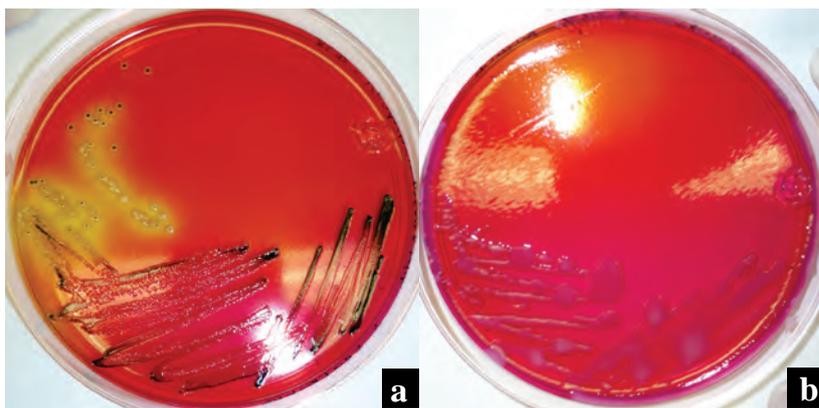


Abbildung 4: *Salmonella enterica ssp. enterica sv. Senftenberg W775* im Ausstrich auf Nährböden (XLD-Agar (a) und BPLS-Agar (b))

3.2.2 Mikrobiologischer Nachweis von Salmonellen durch klassische Kultivierungsmethoden

Der konventionelle mikrobiologische Nachweis von Salmonellen verläuft über einen Kultivierungsansatz. In einer Umweltprobe, wie z.B. dem Fermenterinhalt, lebt eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Mikroorganismen. Durch das Einstellen optimaler Wachstumsbedingungen (Temperatur, Nährboden, Sauerstoffverfügbarkeit, etc.) für den gesuchten Organismus (in diesem Fall Salmonellen) wird versucht dessen Wachstum im Verhältnis zum Wachstum der vielen anderen Mikroorganismen zu fördern (selektive Kultivierung). Für eine Vielzahl von Keimen existieren solche selektiven Kultivierungsmethoden. Sie erlauben den Nachweis des lebenden, wachstumsfähigen Keims in einer Probe. Da meist mehrere Kultivierungsschritte nötig sind, sind diese Methoden häufig sehr arbeitsaufwändig und dauern oft mehrere Tage, bis ein vorläufiges Ergebnis über die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Keims vorliegt. Das Ergebnis muss in der Regel noch mit ebenfalls zeitaufwendigen biochemischen oder serologischen Tests bestätigt werden.

Der klassische, selektive Kultivierungsnachweis für Salmonellen ist standardisiert worden (SN EN ISO 6579, 2002). Diese Methode, die abgeleitet auch in der BioAbfV Eingang gefunden hat, beinhaltet drei Kultivierungsschritte in unterschiedlichen Nähr-Lösungen (Medien) bzw. Nähr-Agar-Böden (Abbildung 5): zunächst erfolgt eine eintägige, unspezifische bzw. seit der Fassung der BioAbfV von 2010 durch Zugabe des Antibiotikums Novobiocin leicht selektive Voranreicherung der Salmonellen in Peptonwasser (PW). Es folgt eine eintägige selektive Kultivierung zur Hauptanreicherung in Rappaport-Vassiliadis-Medium (RV) und eine eintägige Kultivierung auf einem selektiven Agarboden (XLD oder BPLS, Abbildung 4). Gewachsene Keime müssen anschließend biochemisch oder serologisch als Salmonellen identifiziert werden. Die klassische Nachweisprozedur für Salmonellen dauert meist deutlich mehr als drei Tage und weist vor allem bei höheren Probeanzahlen einen erheblichen Arbeitsaufwand auf. Durch die 2010 erneuerte Fassung der BioAbfV wurde der Arbeitsaufwand durch das Einführen weiterer Arbeitsschritte vervierfacht (Abbildung 5).

Die Konzentration der Salmonellen wurde im Rahmen der kultivierungsbasierten Detektion über eine statistische Methode als die am wahrscheinlichsten in der Probe enthaltene Keimkonzentration (Most Probable Number; MPN) bestimmt.

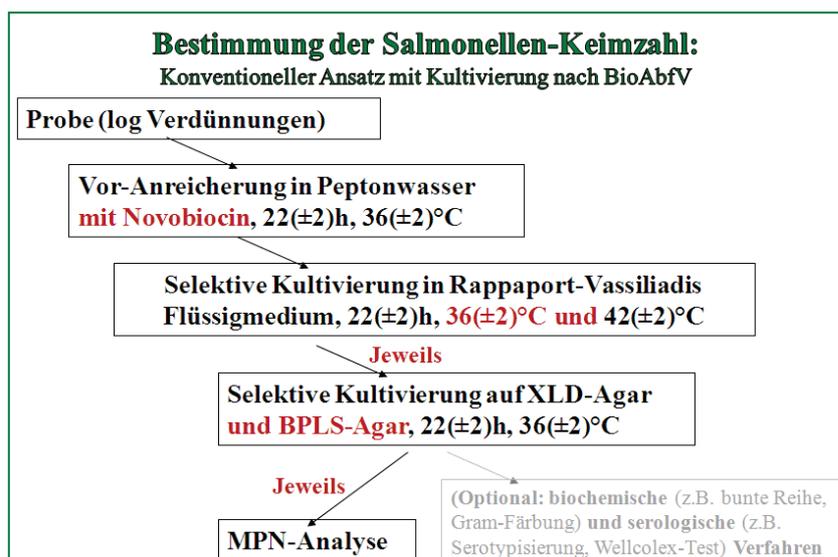


Abbildung 5: Änderungen im konventionellen, kultivierungsabhängigen Ansatz zum Salmonellen-Nachweis seit der Novelle der BioAbfV im Jahr 2010 (rot hervorgehoben)

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Keimträgerexperimente zur direkten Prozessprüfung, sowie die zugehörigen Fermenter-Informationen und Untersuchungsdetails. Die verwendete Farbgebung wurde innerhalb dieser Broschüre auch für die beschriebenen Untersuchungsergebnisse beibehalten. Die mesophile Temperatur (38°C) wurde gewählt, da die meisten Praxisanlagen in diesem Temperaturbereich vergären, die thermophile (60°C), um die unter diesen Bedingungen als hoch eingeschätzte Hygienisierungsleistung für die Testorganismen Salmonellen zu überprüfen.

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Keimträgerexperimente, sowie Prozess- und Untersuchungsparameter

Keimträger-Experiment*	Fermenter-Beschickung	Fermenter-Art (untersuchte Stufe)	Prozess-Temperatur	Inkubationszeiten	Methodik nach
KT38 (1)	Mono-Maissilage	1-stufig	38°C	1d, 2d	BioAbfV (1998)
KT60 (1)	Mono-Maissilage	2-stufig (HS)	60°C	1d, 2d	BioAbfV (1998)
KT38 (2)	Mono-Maissilage	1-stufig	38°C	1h, 4h, 12h	BioAbfV (1998)
KT60 (2)	Mono-Maissilage	1-stufig	60°C	0,5h, 1h, 4h, 12h	BioAbfV (1998)
KT38 (3)	Hydrolysat der Maissilage	2-stufig (MS)	38°C	1d, 2d	BioAbfV (2010)
KT38 (4)	70% Grassilage, 30% Gülle	1-stufig	38°C	1d, 2d	BioAbfV (2010)

HS: Hydrolysestufe, MS: Methanogene Stufe; * die verwendete Farbgebung findet sich in den Ergebnissen wieder.

Die ersten Keimträgerversuche (KT38 (1) und KT60 (1)) sollten zunächst Unterschiede in der Hygienisierungsleistung der Fermenter gegenüber Salmonellen bei mesophilen und thermophilen Bedingungen untersuchen. Die Keimträger wurden dabei 1 bzw. 2 Tage in den Fermentern belassen. In den Versuchen KT38 (2) und KT60 (2) wurde die Zeit im Fermenter für eine exaktere zeitliche Auflösung besonders im thermophilen Bereich auf Inkubationszeiten kleiner 12 h verringert. Die Keimträgerversuche KT38 (3) und KT38 (4) sollten die Datenlage zum mesophilen Betrieb bezüglich eines anderen wichtigen Substrats erwei-

tern. KT38 (4) testete deshalb die Hygienisierungsleistung in einem mit Grassilage und Gülle beschickten Fermenter im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Experimenten in ausschließlich mit Maissilage betriebenen Fermentern.

3.2.3 Molekularbiologischer Nachweis von Salmonellen durch quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Besonders vor dem Hintergrund der generellen Langwierigkeit und des hohen Arbeitsaufwands des kultivierungsabhängigen Ansatzes zum Nachweis von Salmonellen war eine Abkürzung des Verfahrens durch eine Vorschaltung bzw. den Einbau schneller und spezifischer molekularbiologischer Methoden (qPCR-Analysen) ein wichtiges Ziel der Studie.

Die Methode der (q)PCR weist molekularbiologisch die DNA eines bestimmten Gens des Zielorganismus (Salmonellen) nach und ermöglicht die Ermittlung der DNA- und damit der Salmonellen-Konzentration. Eine positive qPCR-Reaktion zeigt die Anwesenheit von Salmonellen-DNA im untersuchten Material an. Weil aber mittels (q)PCR nachgewiesene DNA auch von abgetöteten Organismen stammen kann (Lebuhn und Wilderer, 2006), wird bei positiven qPCR-Ergebnissen der kultivierungsabhängige Nachweis von Salmonellen durchgeführt, da zumindest bislang nur über den Nachweis der Wachstumsfähigkeit ermittelt werden kann, ob bzw. wie viele Salmonellen in der Probe noch potenziell krankheitserregend sein können. Bei einem negativen Befund kann bei einer den statistischen Ansprüchen entsprechenden Anzahl analysierter Proben und optimaler Probenaufbereitung von Salmonellenfreiheit ausgegangen werden. Grundidee war, dass Material mit negativem qPCR-Befund (Salmonellen-Freiheit) wesentlich schneller freigegeben werden könnte, wenn die Versuchsergebnisse zeigten, dass nur in Fällen eines positiven qPCR-Nachweises eine konventionelle, kultivierungsbasierte Nachuntersuchung erforderlich ist.

Der besondere Vorteil der qPCR liegt in der Schnelligkeit und der Spezifität des Nachweises. Ein einzelner qPCR-Lauf kann in weniger als 3 Stunden durchgeführt werden und weist sehr spezifisch nur die DNA der Zielorganismen (z.B. Salmonellen) nach. Dagegen können bei der selektiven Kultivierung (s. 3.2.2) durchaus auch andere Organismen als Salmonellen Wachstum zeigen, die dann durch weitere zeitaufwendige und z.T. wenig eindeutige biochemische und serologische Untersuchungsergebnisse identifiziert werden müssen.

Mit den in dieser Informationsbroschüre vorgestellten Versuchsreihen sollte zunächst geprüft werden, ob der Einsatz der qPCR zum Schnellnachweis von Salmonellen (Screening) möglich ist und dadurch das langwierige, klassische Verfahren insofern abgekürzt werden kann, dass nur qPCR-positive Proben mit kultivierungsabhängigen Methoden weiter untersucht werden müssen.

Dazu wurden qPCR-Analysen zum einen alternativ zum Kultivierungs-Nachweis der Salmonellen durchgeführt und zum anderen in den Ablauf des Kultivierungsnachweises nach Anreicherungs-schritten eingebaut. Es fanden folgende qPCR-Analyse-Varianten Anwendung (Abbildung 6):

- a. qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe
- b. MPN-qPCR aus dem Voranreicherungsschritt (Peptonwasserkultur)
- c. MPN-qPCR aus dem Hauptanreicherungsschritt (Kultur in RV-Flüssigmedium)
- d. qPCR zur Identifizierung der auf Nährböden gewachsenen Bakterien als Salmonellen oder Nicht-Salmonellen (XLD- und BPLS-Agar)

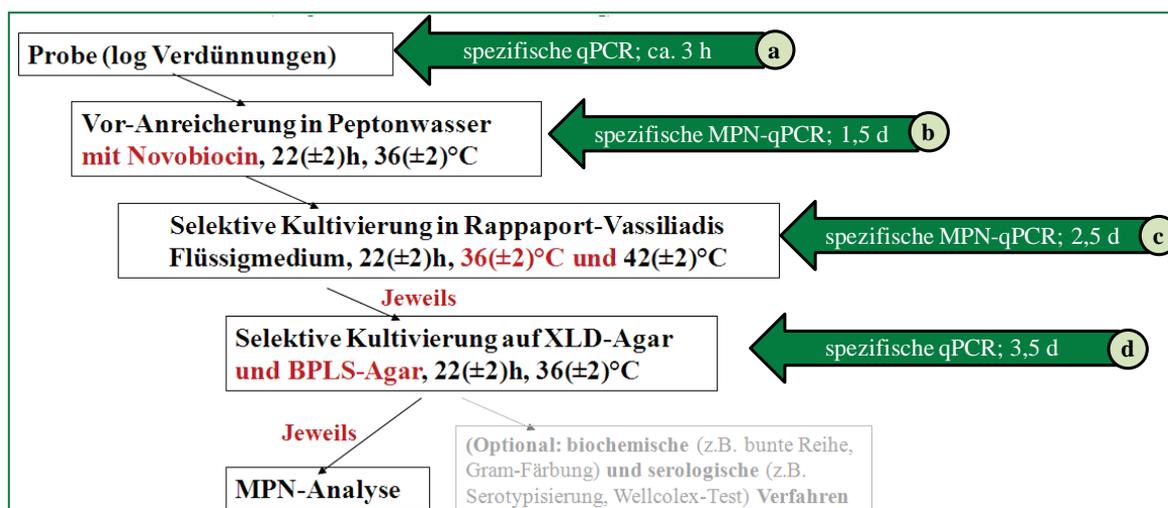


Abbildung 6: Ablauf des Kultivierungsnachweises (vgl. Abbildung 5) mit möglichen Zeitpunkten (a, b, c, d) zum Einbau der qPCR-Untersuchungen und der Dauer der kombinierten Nachweisverfahren

In den Keimträgerversuchen KT38 (1) und KT60 (1) (Tabelle 1) wurde die qPCR-Analyse-Variante a getestet (Abbildung 6). In KT38 (2) und KT60 (2) (Tabelle 1) kamen Varianten a und b und in KT38 (3) und KT38 (4) (Tabelle 1) die Varianten a bis d zum Einsatz. Die Ergebnisse wurden jeweils den Ergebnissen aus der rein kultivierungsbasierten Methode gegenübergestellt. Ziel dieses parallelen Ansatzes war es festzustellen, ob sich die qPCR-Ergebnisse in gleichem Maß wie die Anzahl kultivierbarer Salmonellen veränderten, oder ob die Keimkonzentration z.B. durch die Messung übrig gebliebener DNA toter Salmonellen oder durch andere Effekte vom Kultivierungsergebnis abweicht.

3.2.4 Untersuchung von Gärresten aus Labor- und Praxis-Biogasanlagen auf Salmonellen

Im Rahmen von Produktprüfungen wurden Gärreste aus Labor- und Praxis-Biogasanlagen auf Salmonellen untersucht. Dabei fand der Kultivierungsnachweis für Salmonellen nach der BioAbfV (1998) (vgl. Abbildung 5) sowie z.T. die qPCR-Analyse-Varianten a und d (Abbildung 6) Anwendung. Produktprüfungen wurden zum einen an Gärresten aus Praxisanlagen des Biogasmessprogramms (22 Fermenterproben aus 11 Praxisanlagen zu zwei unterschiedlichen Entnahmzeitpunkten; FNR, 2005) und zum anderen an 23 Gärgemischen aus LfL-ILT-Versuchsanlagen mit unterschiedlichen Betriebsarten und Substraten durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess - Keimträgerversuche

Die Routine der konventionellen Kultivierungs-Nachweismethode bis zum Erhalt der Ergebnisse war sehr arbeitsintensiv und langwierig. Sie dauerte typischerweise über 3 Tage und konnte sich aber bei unsicheren Ergebnissen bis zu 2 Wochen ausdehnen.

4.1.1 Keimträgerversuche im thermophilen Temperaturbereich (60°C)

Die mit der Kultivierungsmethode erzielten Ergebnisse der Keimträgerversuche in thermophil mit Maissilage betriebenen Fermentern (60°C) sind in Abbildung 7 zusammengestellt. Gezeigt ist die Konzentration lebensfähiger Salmonellen in Abhängigkeit von der Expositionszeit der Keimträger im Fermenter. Die y-Achse trägt als geringsten Wert „< 0,3“, da dies bei Bestimmungen nach der MPN-Methode die geringste, statistisch gesicherte Konzentration ist, die erreicht werden kann. Sie muss angegeben werden, selbst wenn keine Salmonellen mehr nachgewiesen wurden. Als Anfangszellkonzentrationen (0 h-Wert) wurden in Abbildung 7 und folgenden Abbildungen jeweils die Salmonellenkonzentrationen im Inokulum (Salmonellen-Suspension zum Ansatz der Keimträger) auf die tatsächliche Keimkonzentration im Keimträger hochgerechnet.

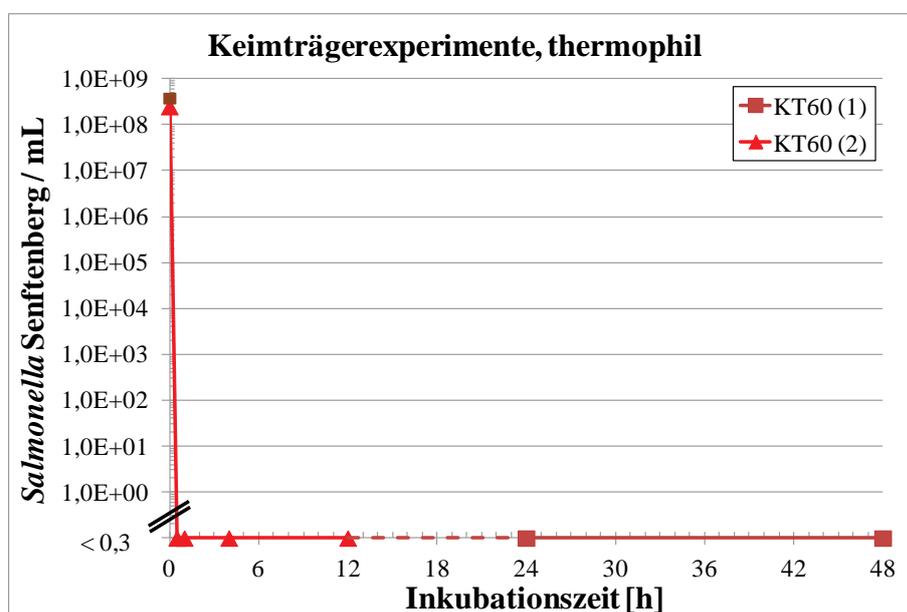


Abbildung 7: Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Nachweis-Methode aus den Keimträgerversuchen bei 60°C mit Maissilage

In den Keimträgerversuchen im thermophilen Temperaturbereich (60°C, KT60 (1) und (2), Abbildung 7) konnten schon nach 30 min Inkubationszeit keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Keimabtötung bzw. -inaktivierung von deutlich mehr als 99,999999% innerhalb dieser kurzen Zeit. Auch nach den weiteren untersuchten Verweilzeiten im Fermenter (1, 4, 12, 24 und 48 h; s.a. Tabelle 1) war keine von den anfänglich ca. $3 \cdot 10^8$ eingesetzten Salmonellen mehr nachweisbar.

Häufig wird die Abtötungs- bzw. Hygienisierungsgeschwindigkeit durch die dezimale Reduktionszeit (D-Wert) angegeben. Der D-Wert gibt den Zeitraum an, innerhalb dessen eine Abnahme der Zellzahl um 90% bzw. auf ein Zehntel der ursprünglichen Zellzahl stattgefunden hat. Im Fall der Keimträgerversuche bei 60°C wurde der D-Wert auf einen Zeitraum von max. 3,2 min bestimmt. Es handelt sich hier um einen Maximum-Wert, weil die Salmonellen möglicherweise in noch kürzerer Zeit komplett inaktiviert wurden, als in den 30 min, die als kürzeste Inkubationszeit untersucht wurden (Abbildung 7).

4.1.2 Keimträgerversuche im mesophilen Temperaturbereich (38°C)

Im mesophilen Betrieb (38°C) verlief die Keimreduktion wesentlich langsamer. Die Konzentrationsverläufe der Salmonellen in den mesophilen Keimträgerversuchen (KT38) sind in Abbildung 8 dargestellt.

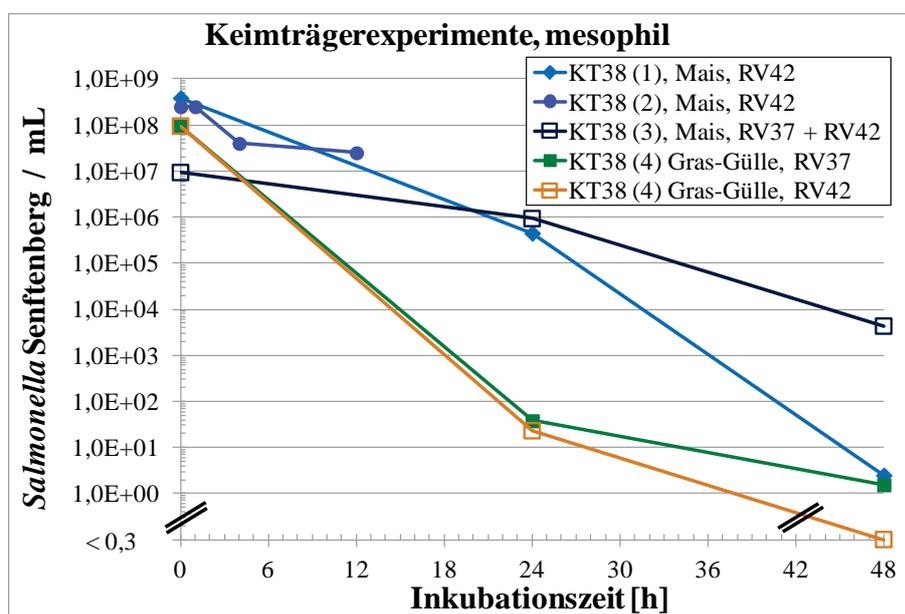


Abbildung 8: Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Nachweis-Methode aus den Keimträgerversuchen im mesophilen Temperaturbereich

Beim Keimträgerversuch KT38 (1) wurden die eingesetzten Salmonellen (ca. 4×10^8 pro mL) nach 48 h um mehr als 8 Zehnerpotenzen (log-Stufen) auf (rechnerisch) 2,5 pro mL reduziert. In den Versuchen KT38 (3) und (4) wurden die Untersuchungsansätze im Ablauf der Kultivierung nach den seit 2010 veränderten Vorgaben der BioAbfV bei unterschiedlichen Temperaturen in RV-Medium bebrütet (RV37“: 37°C; „RV42“: 42°C; Abbildung 5). Die Ergebnisse der Kultivierungsmethode mit RV37- bzw. RV42-Kultivierung sind in Abbildung 8 nur für KT38 (4) getrennt dargestellt, da im Versuch KT38 (3) identische Ergebnisse für beide Kultivierungsvarianten erhalten wurden.

Beim Versuch KT38 (3) wurden die Salmonellen von anfänglich knapp 10^7 pro mL nach 48 h lediglich um ca. 3,5 log-Stufen reduziert. Im Versuch KT38 (4) fand nach 24 h eine Abnahme von zunächst knapp 10^8 auf 38 Salmonellen pro mL und nach 48 h auf 1,6 pro mL im Ansatz RV37 (Hauptanreicherung bei 37°C bebrütet, vgl. Abbildung 5) statt. Beim Ansatz RV42 (Hauptanreicherungsschritt bei 42°C) des Keimträgerversuchs KT38 (4) wurde nach 24 h im Fermenter eine Reduktion auf 23 Salmonellen pro mL festgestellt, nach 48 h waren keine Salmonellen mehr kultivierbar. Die Ergebnisse der Bebrütung der Hauptanrei-

cherung bei 37°C (RV37) bzw. 42°C (RV42) waren kaum verschieden. Der Unterschied zwischen dem Ergebnis „keine Salmonellen“ detektierbar bzw. „wenige Salmonellen enthalten“ nach 48 h kann dennoch von großer rechtlicher Bedeutung sein (vgl. Kapitel 2). Die BioAbfV schreibt seit der Fassung im Jahr 2010 die Bebrütung der Hauptanreicherung parallel bei beiden Temperaturen vor. Salmonellen dürfen in keinem der Ansätze (RV37 und RV42) nachgewiesen werden.

Nach 48 h Inkubationszeit lagen in den mesophilen, mit Maissilage betriebenen Fermentern noch zwischen $< 0,3$ und maximal und 4.300 Salmonellen pro mL vor. Dies entsprach noch einer Keimabnahme von mindestens 99,95% und maximal 99,999999%. Im Keimträgerversuch KT38 (2) mit geringeren Inkubationszeiten wurde die anfängliche Salmonellenkonzentration von $2,5 \cdot 10^8$ pro mL innerhalb von 12 h um eine log-Stufe auf $2,5 \cdot 10^7$ pro mL reduziert. Das bedeutet, dass bereits nach 12 h 90% der Salmonellen inaktiviert worden waren.

Die Ergebnisse der kultivierungsbasierten Analytik für die im mesophilen Temperaturbereich durchgeführten Keimträgerversuche bewegten sich in einer relativ weiten Spanne. Hier ergab sich zu Beginn (24 h-Werte, Abbildung 8) eine zunächst effektivere Keimreduktion im mesophil betriebenen Gras-Gülle-Fermenter (KT38 (4)) als in den mesophil betriebenen Mais-Fermentern (KT38 (1) – (3)). Dies müsste noch durch weitere Versuche überprüft werden. Eine Ursache kann die bei der Vergärung der Grassilage-Gülle-Mischung im Vergleich zur Maissilage-Vergärung erhöhte Konzentration an Ammoniak (insbesondere bei thermophiler Temperaturführung; Andrade et al., 2009; Lebuhn et al., 2010) sein. Dieser Hemmstoff könnte die Salmonellen vom Zeitpunkt der Zugabe an beeinträchtigt und zu einer anfangs schnelleren Abnahme als in den Maisfermentern geführt haben. Innerhalb des zweiten Tages verlief die Abnahme nicht mehr ganz so schnell.

Auch zwischen den verschiedenen Keimträgerversuchen in mesophilen Mais-Fermentern waren die Unterschiede teilweise beträchtlich (Abbildung 8). Die stärkere Reduktion in Versuch KT38 (1) gegenüber KT38 (3) nach 48 h könnte ihre Ursache ebenfalls in der unterschiedlichen Chemie der Fermenterinhalt im einstufigen Betrieb gegenüber der methanogenen Stufe des zweistufigen Betriebs haben (z.B. geringerer pH-Wert von 7,6 in KT38 (1) gegenüber 7,9 und etwas höhere Ammoniak-Konzentration von ca. 100 gegenüber 77 mg pro L Fermenterinhalt in KT38 (3)). Die chemische Zusammensetzung des Fermenterinhalt scheint also auch einen bedeutenden Einfluss auf die Abnahme der Krankheitserreger zu haben.

Über eine biostatistische Auswertung wurde die dezimale Reduktionszeit (90% der Salmonellen abgetötet) für die Versuche KT38 (1) - (4) in mesophilen Fermentern auf 6,7 h bestimmt. Dabei lag die dezimale Reduktionszeit für die Versuche in Maissilage-vergärenden Fermentern (KT38 (1) – (3)) mit 8,3 h etwas höher und für den Grasfermenter mit 5,7 h etwas niedriger als der gemeinsame D-Wert aller mesophilen Versuche - vermutlich auf Grund der oben beschriebenen Effekte durch die sich unterscheidende Chemie der Gras-vergärenden Fermenter.

4.1.3 Keimreduktion in ein- und mehrstufigen ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktorsystemen

Im Modellsystem eines ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktors, bzw. einer 2-stufigen Abfolge zweier ideal, gleichmäßig durchmischter Durchflussreaktoren kann die Keimreduktion in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D-Wert) dargestellt werden (Abbildung 9). Hierbei wurde von einem Reaktorvolumen von 275 m^3 pro Verfah-

rensstufe und einem täglichen Fütterungsvolumen von 7 m^3 für die 2-stufige Variante sowie von einem Reaktorvolumen von 550 m^3 und einem täglichen Fütterungsvolumen von 7 m^3 für die einstufige Verfahrensführung ausgegangen. Die Fütterungsintervalle und damit die minimale (gesicherte) Verweilzeit wurde auf 1 h festgelegt. Damit betrug die hydraulische Verweilzeit der einstufigen Verfahrensführung knapp 40 Tage und in der zweistufigen Verfahrensvariante knapp 80 Tage.

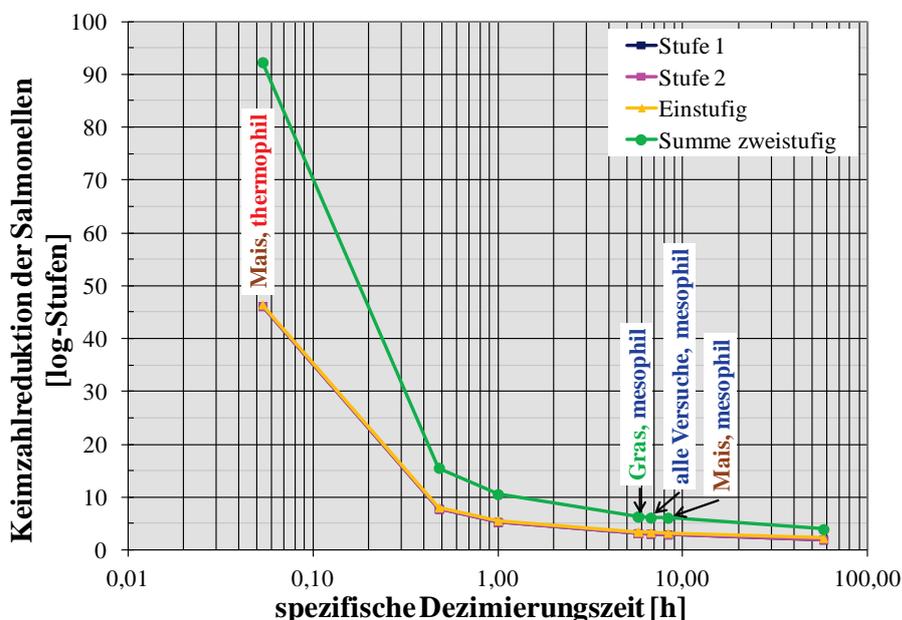


Abbildung 9: Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der spezifischen Dezimierungszeit (D -Wert) in ein- und mehrstufigen, ideal, gleichmäßig durchmischten Durchflussreaktorsystemen

Für die thermophilen Keimträgerexperimente wurde eine Reduktion um 1 log-Stufe (90%, D -Wert) in weniger als 3,2 min erreicht (s. 4.1.1). Bei dieser spezifischen Dezimierungszeit wäre theoretisch in der einstufigen Anlage bzw. in den einzelnen Stufen der zweistufigen Anlage jeweils eine Keimzahlreduktion von mehr als 46 log-Stufen zu erwarten, in der zweistufigen Anlage wären es mehr als 92 log-Stufen (Abbildung 9). Für die Keimträgerexperimente in mesophilen Fermentern wurde eine dezimale Reduktionszeit von ca. 6,7 h errechnet. Damit wäre eine Keimzahlreduktion von ca. 3,4 log-Stufen pro Verfahrensstufe bzw. von ca. 6,1 log-Stufen in der Summe der zweistufigen Verfahrensführung zu erwarten (Abbildung 9). Hier wird deutlich, dass sich die Abnahme der Keimzahl bei zweistufigem Betrieb multipliziert, obwohl die hydraulischen Verweilzeiten nur addiert werden.

Die hier beschriebene Behandlung würde also bereits im einstufigen Durchflussreaktor bei 60°C Betriebstemperatur in jedem Fall ausreichen, um Salmonellen selbst bei starker Durchseuchung des Substrats (10^8 Keime pro mL) abzutöten.

Anders gestaltet sich die Behandlung stark mit Salmonellen durchseuchten Substrats bei 38°C Betriebstemperatur. Im einstufigen Prozess würden 10^8 Salmonellen pro mL rechnerisch auf $10^{4,6}$ (ca. 40.000) bzw. auf $10^{1,9}$ (ca. 80) im zweistufigen System reduziert werden. Bei starker Durchseuchung ist es also möglich, dass der Prozess nicht zur vollständigen Abtötung der Salmonellen führt.

Weiterhin ist die tatsächliche Verweilzeit bei Vorliegen von Kurzschlussströmen in den Fermentern verringert und die Abtötung damit reduziert. Auch wenn Krankheitserreger in

eine grobkörnige, solide Matrix (z.B. Pflanzenknollen) eingebettet sind, muss mit einer geringeren Abtötung gerechnet werden.

4.1.4 Molekularbiologischer Nachweis von Salmonellen durch quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Im Abschnitt 3.2.3 sind die getesteten qPCR-Analyse-Varianten beschrieben. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Varianten dargestellt und die Anwendbarkeit für die Praxis diskutiert.

a. qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe

Diese qPCR-Analysevariante wurde bei allen Keimträgerversuchen durchgeführt. Abbildung 10 stellt die Ergebnisse durch qPCR aus den DNA-Extrakten der Keimträgerversuchsreihen (1) und (2) den kultivierungsbasierten Ergebnissen gegenüber. Bei einer Betriebstemperatur von 60°C (KT60 (1) bzw. (2), Abbildung 10) konnten mittels Kultivierungsmethode bereits nach 30 min Inkubation im Fermenter keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden. Auch mit dem qPCR-Nachweis aus dem DNA-Extrakt deutete sich in beiden thermophilen Versuchen eine Abnahme der Salmonellen an, allerdings war das Ausmaß der DNA-Reduktion im Vergleich zum kultivierungsbasierten Ergebnis um Größenordnungen geringer (Unterschied von ca. 6 log-Stufen in KT60 (1), Abbildung 10a). Die qPCR-Ergebnisse aus den DNA-Extrakten der Proben unterschätzten also den Grad der Abtötung und hatten demnach wenig Aussagekraft. Die Methode der PCR weist spezifisch DNA nach und unterscheidet nicht zwischen DNA aus lebenden und toten Zellen. Offenbar wurde im vorliegenden Versuch übrig gebliebene DNA bereits toter Salmonellen in beträchtlichem Ausmaß nachgewiesen.

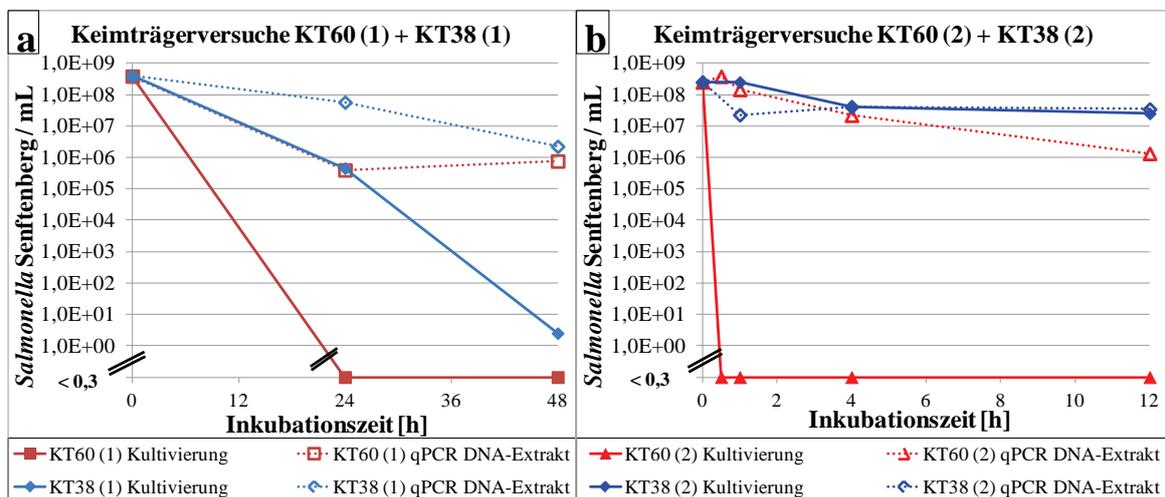


Abbildung 10: Gegenüberstellung von Ergebnissen der kultivierungsabhängigen Methode (durchgezogene Linien) und der qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe (gepunktete Linien) der ersten (a) und der zweiten (b) Keimträgerversuchsreihe

In KT38 (1) wurde durch die Kultivierungsmethode nach 48 h eine Keimreduktion um ca. 8 Zehnerpotenzen gemessen. Dagegen bestimmte die qPCR aus dem DNA-Extrakt eine deutlich höhere Salmonellen-(DNA-)Konzentration im Ansatz und eine Reduktion um nur etwa 2 Zehnerpotenzen nach 48 h (Abbildung 10a). Auch hier wurde also wie im thermophilen

Betrieb DNA toter Salmonellen nachgewiesen und dadurch das Ausmaß der Inaktivierung deutlich unterschätzt. Ähnliche Unterschätzungen wurden auch durch die qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe in den in Abbildung 10 nicht dargestellten Versuchen KT38 (3) und (4) erhalten.

Im Versuch KT38 (2) wurden in der kurzen Zeit von 12 h nur wenige Salmonellen abgetötet. Hier wurde deutlich, dass die qPCR aus der Probe an sich verlässliche Ergebnisse liefert, die denen aus der Kultivierungsmethode vergleichbar sind, unter der Voraussetzung, dass die DNA im Ansatz nur von lebenden Salmonellen stammt und keine DNA von toten Salmonellen mehr vorliegt. Beide Konzentrationen waren nach 4 und 12 h Inkubationszeit nahezu identisch (Abbildung 10b).

Die Methode der qPCR aus dem DNA-Extrakt einer Probe war innerhalb der Keimträgerversuche nicht geeignet, um die Konzentrationen der lebenden Salmonellen zu bestimmen. Allerdings ist ihr Einsatz für andere Anwendungen dennoch sinnvoll: beispielsweise ließe sich diese Methode gut für ein schnelles Screening von Gärresten auf Salmonellen (vgl. Untersuchung zur Prüfung der hygienisierten Bioabfälle, BioAbfV, siehe 2.1) einsetzen. Proben, die keine Salmonellen-DNA enthalten, könnten schon mit einem kurzen qPCR-Test als negativ eingestuft werden und müssten nicht mit der zeitaufwendigen Kultivierungsmethode untersucht werden. Fällt das Ergebnis der qPCR aus dem DNA-Extrakt positiv aus, folgt in jedem Fall eine Nachuntersuchung mit der Kultivierungsmethode. Diese zeigt, ob die in der qPCR nachgewiesene DNA von toten oder lebenden Salmonellen stammte. Ein falsch-negatives Ergebnis (d.h. eine Probe die Salmonellen enthält, aber als Salmonellen-frei eingestuft wird) wäre damit ausgeschlossen. Dies gilt allerdings mit einer Einschränkung: Die bisher in dieser Studie verwendeten Probenmengen sind sehr gering (0,04 mL). Die gesetzlichen Anforderungen in BioAbfV, VO (EG) Nr. 142/2011, TierNebV und DüMV liegen mit 25 bis 50 g zu untersuchender Probe deutlich darüber. Es müssen also methodische Wege gefunden werden, solche großen Probenmengen zu untersuchen, um eine ausreichend repräsentative Aussage der qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe zu erhalten. Solche methodischen Verbesserungen sind möglich.

b. MPN-qPCR aus dem Voranreicherungsschritt (Peptonwasserkultur)

Um das oben beschriebene Problem der zu geringen Probenmenge zu umgehen und nur die lebensfähigen (und nicht tote und nicht mehr krankheitserregende) Salmonellen zu bestimmen, wurden in den Versuchen KT60 (2) und KT38 (2) – (4) MPN-qPCR-Analysen nach der Voranreicherung in Peptonwasser (PW) durchgeführt (Abbildung 11).

Dabei können auch größere Probenmengen ohne großen methodischen Mehr-Aufwand für die Voranreicherung eingesetzt werden. In diesem ersten Kultivierungsschritt in PW werden die in der untersuchten Probe befindlichen lebenden und wachstumsfähigen Salmonellen vermehrt. Die Menge an DNA toter Salmonellen wird dagegen durch die Verdünnung mit PW und den allmählich einsetzenden Abbau verringert. Der Nachweis von übrig gebliebener DNA inaktiver oder toter Salmonellen sollte deshalb bei der qPCR-Analysevariante aus der Voranreicherung ein geringeres Problem darstellen als bei der qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe.

In den Versuchen KT38 (2) und (3) (blaue Kurven, Abbildung 11) lagen die durch MPN-qPCR aus der PW-Voranreicherung bestimmten Salmonellen-Konzentrationen sehr nahe an den maßgebenden Kultivierungsergebnissen. Das bedeutet, dass die vergleichsweise kurzweilige Methode (1,5 d) in diesen beiden Versuchen in der Lage, war die Ergebnisse der langwierigen Methode (3 - 14 d) der Kultivierung ausreichend genau wiederzugeben.

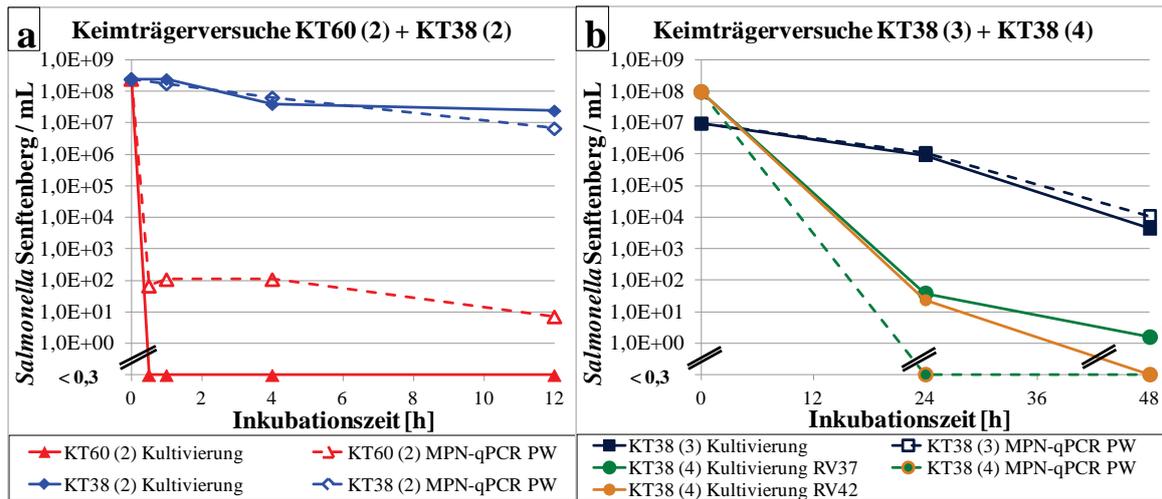


Abbildung 11: Gegenüberstellung von Ergebnissen der kultivierungsabhängigen Methode (durchgezogene Linien) und der MPN-qPCR aus der Voranreicherung in Peptonwasser (PW, unterbrochene Linien) in Keimträgerversuchen mit Inkubationszeiten von 12 h (a) und 48 h (b)

In Versuch KT60 (2) wurde mit der MPN-qPCR-Methode (PW) zwar ein Rückgang der Salmonellen-DNA um mehr als sechs Zehnerpotenzen innerhalb von 30 min Inkubationszeit gemessen. Dennoch lag die ermittelte Konzentration mit knapp 100 bzw. 10 Kopien Salmonellen-DNA pro mL nach 4 h bzw. 12 h Inkubationszeit immer noch über dem Kultivierungsergebnis, bei dem keine Salmonellen detektiert wurden (rote Kurven, Abbildung 11a). Die mit MPN-qPCR aus der Voranreicherung nachgewiesene DNA stammt damit wie bei der qPCR direkt aus dem DNA-Extrakt der Probe von nicht mehr lebensfähigen Salmonellen. In den Keimträgerinhalten lagen nach den untersuchten Inkubationszeiten hohe Konzentrationen an DNA toter Salmonellen vor, da die Abtötung sehr schnell stattfand. Bei der Übertragung des Keimträgerinhaltes in das Peptonwasser gelangte diese DNA auch in die Peptonwasserkultur und wurde bei der MPN-qPCR-Analyse nachgewiesen. Daher überschätzte die Methode bei dieser Versuchskonstellation die Anzahl lebensfähiger Salmonellen in der Probe und unterschätzte die Hygienisierungsleistung.

Zu einer leichten Überschätzung der Hygienisierungsleistung kam es dagegen im Versuch KT38 (4) (Abbildung 11b). Durch die qPCR aus dem Voranreicherungsschritt wurde bereits nach 24 h keine Salmonellen-DNA nachgewiesen, während mit der maßgebenden Kultivierungsmethode nach 24 h und z.T. noch nach 48 h lebensfähige Salmonellen gefunden wurden. Der Unterschied ist wahrscheinlich darin begründet, dass die etwas aggressivere Umwelt (z.B. erhöhte Ammoniak-Gehalte, siehe auch 4.1.2) bei der Vergärung der Grassilage-Gülle-Mischung im Vergleich zur Maissilage-Vergärung die Salmonellen vorgeschädigt oder vorübergehend inaktiviert hatte. Dieses Phänomen ist auch bei Salmonellen bekannt. Sie können in einen sog. VBNC-Zustand (engl. Viable Bt Non-Culturable, lebensfähig aber nicht kultivierbar bzw. aktuell vermehrungsfähig) verfallen, aus dem sie bei günstigeren Umweltbedingungen wiederaktiviert werden können. Nach 1-tägiger Kultivierung in der Voranreicherung in Peptonwasser wurden sie nicht reaktiviert und vermehrten sich nicht, wohl aber nach der kompletten, 3-tägigen Kultivierungsprozedur in verschiedenen Nährmedien. Diese unterschiedliche Reaktivierungsrate und Wachstumsfähigkeit könnte ihre Ursache in der Länge der Kultivierungszeit nach dem Aufenthalt in der hemmenden Umgebung des Gras-Gülle-Fermenters und in der Art der Nährmedien zur Kultivierung gehabt haben. Allerdings muss beachtet werden, dass die Unterschiede mit ca. 35 Salmonellen pro mL

Fermenterinhalt nach 24 h bzw. weniger als 2 nach 48 h sehr gering sind. Dies wird durch die logarithmische y-Achse (Auftragung in Zehnerpotenzen) in der Darstellung in Abbildung 11b überdeutlich dargestellt.

Eine Unterschätzung der Hygienisierung (wie in KT38 (2)) ist insofern weniger problematisch, da ein falsch-positives Ergebnis (Salmonellen-DNA gemessen, obwohl keine lebensfähigen Salmonellen mehr vorhanden) durch die dann ohnehin nötige Fortführung der Kultivierungsmethode erkannt werden würde. Ein falsch-negatives Ergebnis (wie in KT38 (4)), bei dem keine Salmonellen-DNA nachgewiesen wird, obwohl lebensfähige Salmonellen in der Probe enthalten sind, ist eher problematisch. Die Überschätzung der Hygienisierung tritt aber wahrscheinlich nur dann auf, wenn vorübergehend inaktivierte Salmonellen bereits im Ansatz vorliegen. Es ist nicht auszuschließen, dass einige VBNC-Salmonellen durch die gesamte Kultivierungsprozedur nicht gänzlich reaktiviert und dann auch im klassischen Ansatz nicht oder nicht vollständig nachgewiesen werden.

Die Methode der MPN-qPCR aus einem Voranreicherungsschritt ist demnach nicht unproblematisch, soll aber Inhalt weiterer Untersuchungen bleiben. Hiermit wäre eine Verkürzung des Salmonellen-Nachweises von mehr als 3 Tagen auf 1,5 Tage möglich. Auch in anderen Anwendungsbereichen wird eine Kombination von Voranreicherung und anschließender PCR (Analysevariante b) für den Routine-Nachweis von Salmonellen eingesetzt.

c. MPN-qPCR aus dem Hauptanreicherungsschritt (Kultur in RV-Flüssigmedium)

Da die maßgebenden Ergebnisse aus der Kultivierung durch die MPN-qPCR aus der Voranreicherung (3.2.3b) nicht immer korrekt wiedergegeben wurden, wurde in den Keimträgerversuchen KT38 (3) und (4) untersucht, ob mit einer MPN-qPCR nach dem nächsten Kultivierungsschritt (Hauptanreicherung in Rappaport-Vassiliadis-Medium, Analysevariante c, Abbildung 6) ein besseres Ergebnis erzielt werden kann. Dabei könnte die Analysezeit noch immer von meist mehr als 3 d (kultivierungsabhängige Methode) auf 2,5 d verkürzt werden.

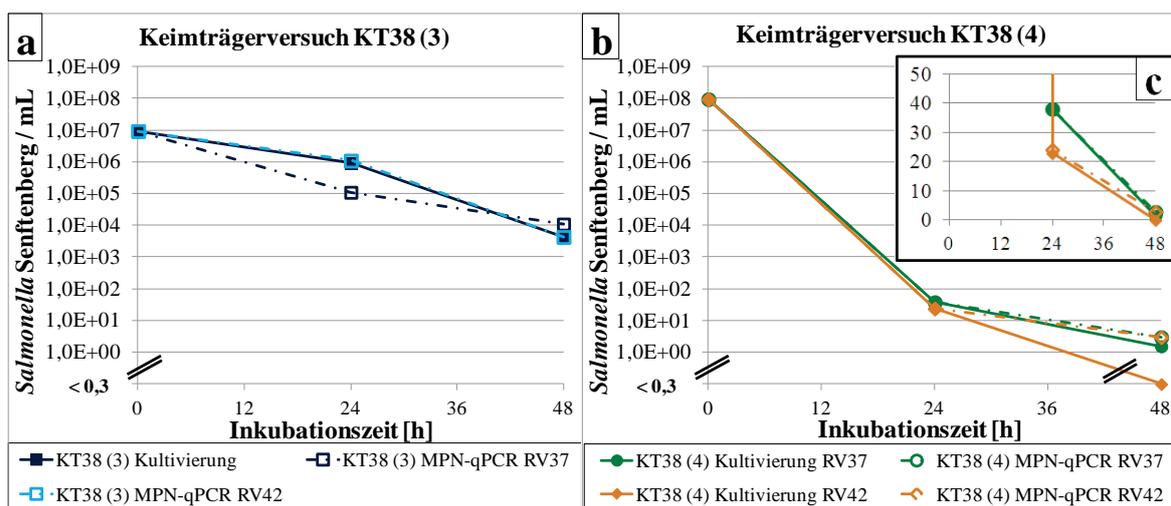


Abbildung 12: Gegenüberstellung von Ergebnissen der kultivierungsabhängigen Methode (durchgezogene Linien) und der MPN-qPCR aus der Hauptanreicherung in Rappaport-Vassiliadis Medium (RV, unterbrochene Linien) in den Keimträgerversuchen KT38 (3) (a) und KT38 (4) (b), (c) [(c) stellt Abb. (b) lediglich mit nicht-logarithmierter y-Achse dar, gleiche Achsenbeschriftung]

Im Keimträgerversuch KT38 (3) war der mit MPN-qPCR aus der Hauptanreicherung bei 37°C (RV37) bestimmte Verlauf der Salmonellenkonzentration nahezu identisch mit den Kultivierungsergebnissen. Im RV42-Ansatz kam es zu geringfügigen Abweichungen (Abbildung 12a). Im Keimträgerversuch KT38 (4) lagen die Konzentrationsverläufe der MPN-qPCRs aus den Hauptanreicherungen RV37 sowie RV42 sehr nah an den entsprechenden Kultivierungsergebnissen von RV37 und RV42 (Abbildung 12b und c). Wie gering die Unterschiede in den niedrigen Konzentrationsbereichen, die in Abbildung 12b überzeichnet erscheinen, tatsächlich sind, ist in Abbildung 12c mit linearer Scala dargestellt.

Durch die Analysevariante c (Abbildung 6), die MPN-qPCR aus der Rappaport-Vassiliadis-Hauptanreicherung, wurden die jeweils entsprechenden Ergebnisse der vollständigen, kultivierungsbasierten Methode gut wiedergegeben. Mit dieser Variante ließe sich noch immer Analysezeit einsparen. Das Nachweis-Verfahren könnte von meist deutlich mehr als 3 auf 2,5 Tage verkürzt werden.

d. qPCR zur Identifizierung der auf Nährböden gewachsenen Bakterien als Salmonellen oder Nicht-Salmonellen

In einigen Keimträgerversuchen wurde am Ende des Kultivierungsnachweises zusätzlich eine spezifische qPCR-Analyse der auf XLD- bzw. BPLS-Agar gebildeten bakteriellen Kolonien durchgeführt. Diese überprüft, ob es sich bei den gewachsenen Bakterien um potentiell infektiöse Salmonellen handeln kann oder nicht. Damit ließen sich die zeitaufwändigen und manchmal nicht eindeutigen biochemischen bzw. serologischen Untersuchungen zur Identifizierung ersetzen (siehe Abbildung 5). Mit dieser Analysevariante wäre der Zeitaufwand noch auf 3,5 d begrenzt.

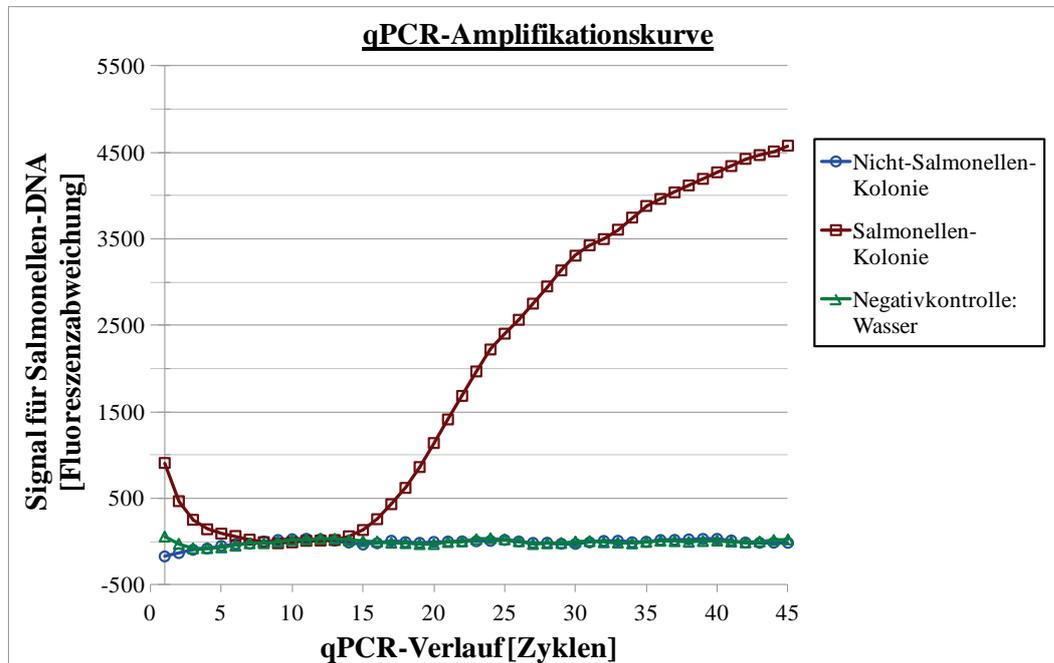


Abbildung 13: qPCR-Amplifikationskurven bei der Überprüfung jeweils einer Salmonellen-Kolonie und einer Kolonie anderer Bakterien (Nicht-Salmonellen)

Abbildung 13 zeigt ein Beispiel für ein deutlich ansteigendes qPCR-Signal einer Salmonellen-Kolonie im Vergleich zum Signal einer Kolonie anderer Bakterien, das genau wie das Signal für Wasser (Negativkontrolle) nicht anstieg.

Auf diese Weise konnten Salmonellen-Kolonien in den Versuchen eindeutig von Kolonien anderer Bakterien unterschieden werden.

4.2 Untersuchung von Gärresten aus Labor- und Praxis-Biogasanlagen auf Salmonellen

a. Praxisanlagen

Beim Screening der 22 Fermenterproben aus 11 Praxisanlagen des Biogasmessprogramms (FNR, 2005; doppelte Probenahme im Abstand von vier Wochen) wurden mit der Analysevariante d (Kultivierung und Überprüfung gewachsener bakterieller Kolonien mit qPCR) in keinem der untersuchten Gärreste Salmonellen nachgewiesen. Tabelle 2 stellt diesem Ergebnis einige relevante Prozess- und Fermenterdaten gegenüber.

Tabelle 2: Ergebnisse der Produktprüfungen an Gärresten aus Praxisbiogasanlagen auf Salmonellen mit einigen relevanten Prozess- und Fermenterdaten

Anlage n-Nr.	Substrate			Prozessführung			Salmonellen enthalten?	
	Tierische Exkremente	Massen-%	Kosubstrate (Anteil > 2%)	Temperatur	Anzahl Stufen	Sonstiges	Produktprüfung 1	Produktprüfung 2
BMP 01	Schweinegülle	82	Futterschlempe	mesophil	1		nein	nein
BMP 04	Schweinegülle	23	Silomais, Getreideausputz, Wasser, Molke, Zuckerrübenblatt, Kartoffel	mesophil	2		nein	nein
BMP 11	Rindergülle, Rinderfestmist	68	Schlempe, Grassilage	mesophil	2		nein	nein
BMP 16	Rindergülle, Schweinegülle, Hühnerfestmist, Schweinefestmist	38	Flotat-Fett, Silomais	mesophil	2		nein	nein
BMP 17	Rindergülle, Rinderfestmist	65	Molke, Silomais, Grassilage, Kartoffel	mesophil	1		nein	nein
BMP 19	Rindergülle, Rinderfestmist	93	Silomais	mesophil	1		nein	nein
BMP 22	Rindergülle	50	Speisereste, Fett	mesophil	2	mit Pasteurisierung	nein	nein
BMP 37	Rindergülle	88	Silomais, Grassilage	mesophil	2		nein	nein
BMP 38	Rindergülle, Rinderfestmist	99	Grüngut	mesophil	1		nein	nein
BMP 39	Rindergülle, Hühnertrockenkot	97	Silomais	mesophil	2	mit Hydrolyse	nein	nein
BMP 41	Schweinegülle	33	Fett, Silomais, Melasse, Hundefutter	mesophil + thermophil	2	mit Pasteurisierung	nein	nein

b. Labor-Biogasanlagen

Verschiedene Gärreste aus LfL-ILT-Versuchsanlagen (siehe einstufige Systeme in Abschnitt 3.1) wurden im Rahmen einer Produktprüfung auf Salmonellen untersucht. Tabelle 3 fasst diese Ergebnisse der Produktprüfung zusammen und stellt relevante Prozessdaten gegenüber.

Einige der Proben wurden mit Analysevariante a (qPCR aus dem DNA-Extrakt) untersucht. In keinem der untersuchten Extrakte wurde Salmonellen-DNA nachgewiesen (Tabelle 3).

Auch mit der Analysenvariante d (Kultivierung und Überprüfung gewachsener, bakterieller Kolonien mit qPCR) wurden in keinem der Fermenter Salmonellen nachgewiesen. Zwar war ein Wachstum unterschiedlicher Mikroorganismen auf XLD-Agar zu beobachten, diese wurden aber in keinem Fall durch die qPCR als Salmonellen identifiziert (Tabelle 3).

Lediglich bei Fermenter IBMN-A1 wurde keine Überprüfung der gewachsenen, bakteriellen Kolonien durchgeführt. Höchstwahrscheinlich beruht die Koloniebildung aber auf Wachstum von anderen, thermophilen Bakterien und nicht von Salmonellen, da die thermophile Vergärung stark abtötend auf Salmonellen wirkt (siehe auch: 4.1.1 thermophile Keimträgerversuche).

Tabelle 3: Ergebnisse der Produktprüfung auf Salmonellen an Gärresten aus LfL-ILT-Versuchsanlagen

Fermenter-Bezeichnung	Datum der Probenahme	Substrat: (Mono-vergärung)	Prozess-temperatur	Analysevariante a	Analysevariante d	
				qPCR aus dem DNA-Extrakt: Salmonellen enthalten?	Wachstum von Kolonien (XLD)	Kolonieüberprüfung mittels qPCR: Salmonellen enthalten?
IBMN-C3	26.08.2009	Maissilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-H1	26.08.2009	Grassilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-B3	26.08.2009	Maissilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-B1	26.08.2009	Maissilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-G2	26.08.2009	Grassilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-H2	26.08.2009	Grassilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-B2	26.08.2009	Grassilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-G3	26.08.2009	Grassilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-G1	26.08.2009	Grassilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-B1	03.02.2009	Maissilage	mesophil	nein	nein	
IBMN-B2	03.02.2009	Maissilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-B3	03.02.2009	Maissilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-C1	03.02.2009	Maissilage	mesophil	nein	nein	
IBMN-C3	03.02.2009	Maissilage	mesophil	nicht bestimmt	nein	
IBMN-A1	18.12.2008	Grassilage	thermophil	nein	ja →	nicht bestimmt
IBMN-A2	18.12.2008	Grassilage	thermophil	nein	nein	
IBMN-A3	18.12.2008	Grassilage	thermophil	nein	nein	
IBMN-B2	18.12.2008	Maissilage	mesophil	nein	ja →	nein
IBMN-B3	18.12.2008	Grassilage	thermophil	nein	ja →	nein
IBMN-C1	18.12.2008	Maissilage	mesophil	nein	ja →	nein
IBMN-E1	18.12.2008	Grassilage	mesophil	nein	ja →	nein
IBMN-E2	18.12.2008	Grassilage	mesophil	nein	ja →	nein
IBMN-E3	18.12.2008	Grassilage	mesophil	nein	nein	

5 Fazit und Empfehlungen für eine Umsetzung in die Praxis

1. Durch die anaerobe Vergärung im Rahmen des Biogasprozesses kommt es zur Abtötung der Salmonellen (Hygienisierung). In keinem der unterschiedlichen Keimträgerversuche wurde eine Zunahme der Salmonellen im Keimträgerversuch gemessen.
2. Das Ausmaß der Abtötung hängt wesentlich von den Prozessfaktoren (Temperatur, Verweilzeit) ab und wird offenbar auch von der chemischen Zusammensetzung (Substrate, Ammoniak- und Säuregehalte, etc.) des Gärgemischs beeinflusst:
 - Bei thermophiler Temperatur sterben die Salmonellen sehr schnell ab: In den Versuchen wurden die dotierten Salmonellen bei 60°C im Gärgemisch in 3,2 min um 90% reduziert. Nach 30 min konnten im Fermenterinhalt keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Reduktion um mehr als 8 Zehnerpotenzen.
 - Bei mesophiler Temperaturführung (38°C) verlief die Abtötung langsamer: Nach 6,7 h waren in den Keimträgerversuchen 90% der Salmonellen abgestorben. Nach 48 Stunden im Fermenter betrug die Abnahme lebender Salmonellen zwischen 99,95% und 99,999999%.
 - Die Reduktion der Salmonellen war in einem Grassilage und Gülle vergärenden Fermenter im Vergleich zur Maissilage-Vergärung initial beschleunigt. Vermutlich war die verschiedene chemische Umgebung (v.a. erhöhter Ammoniak-Gehalt) die Ursache.
3. Die anaerobe Vergärung im Biogasprozess besitzt demnach insbesondere bei thermophiler Temperatur ein hohes Hygienisierungspotenzial gegenüber Salmonellen.
4. Verschiedene Gärreste aus Versuchs- und Praxis-Biogasanlagen wurden auf Salmonellen untersucht. In keinem der Gärreste waren lebensfähige Salmonellen nachweisbar.
5. Eine Abkürzung der klassischen Nachweismethode für Salmonellen (Kultivierung) durch den Einbau molekularbiologischer Untersuchungen (qPCR) ist möglich.
 - Bei den Analysenvarianten a und b bestanden z.T. noch methodischen, aber lösbare Schwierigkeiten:

Analysevariante a: Die qPCR aus dem DNA-Extrakt der Fermenterprobe kann ein Ergebnis innerhalb weniger Stunden liefern, wenn bei der Untersuchung die rechtlich geforderten Probemengen (25 bis 50 g) eingesetzt werden können. Ist das Ergebnis positiv (Nachweis von Salmonellen-DNA), müssen die Kultivierungsschritte durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die DNA von lebenden oder bereits toten Salmonellen stammt. Ist das Ergebnis negativ, könnte die Probe sehr schnell als Salmonellen-frei eingestuft werden.

Analysevariante b: Die MPN-qPCR aus der Voranreicherung kann innerhalb 1,5 Tagen ein Ergebnis liefern. Problematisch ist eine eventuelle Unterschätzung der Salmonellen, wenn sie vorübergehend inaktiviert (VBNC) sind, und der Nachweis der DNA toter Salmonellen (wie in Variante a), sofern solche DNA in hoher Konzentration in der Originalprobe vorlag.
 - **Analysevariante c** (MPN-qPCR aus der Hauptanreicherung) war dagegen problemlos einsetzbar: Mit dieser konnten die aus der reinen Kultivierungsmethode erhaltenen Ergebnisse (Dauer: mehr als 3 Tage) in nur 2,5 Tagen sehr gut wiedergegeben werden. Der Nachweis der DNA toter Salmonellen konnte bei diesem Verfahren praktisch ausgeschlossen werden. Auch VBNC-Salmonellen konnten nach zwei Kul-

tivierungsschritten ebenso gut wie durch die gesamte Kultivierungsmethode nachgewiesen werden.

- **Analysevariante d** (Überprüfung der Kolonien mittels Salmonellen-spezifischer qPCR) erleichterte die Untersuchungen durch die deutlich schnelleren und eindeutigeren Ergebnisse als die der herkömmlichen biochemischen bzw. serologischen Tests.

Empfehlungen für Anlagenbetreiber

Schon bei der Planung einer Biogasanlage sollte sich der Anlagenbetreiber sehr genau über die geltenden rechtlichen Vorgaben informieren. In Zweifelsfällen, die häufig mit dem Einsatz schwer kategorisierbarer Substrate verbunden sind, sollte er die Zusammenarbeit mit den zuständigen Behörden suchen.

Ein wichtiges Ziel der relevanten Verordnungen ist es, seuchenhygienisch relevante Krankheitserreger für Mensch, Tier und Pflanze aus dem Prozess zu eliminieren. Das bedeutet jedoch nicht, dass sämtliche in den Bioabfällen vorhandenen Keime beseitigt werden müssen (Sterilisation). Das Ziel ist eine (aus wissenschaftlicher Sicht) ausreichende Reduktion seuchenhygienisch bedeutsamer Keime zu erreichen (Hygienisierung).

Die Verordnung (EU) Nr. 142/2011 schreibt bei alternativen thermischen und chemischen Umwandlungsverfahren in Biogasanlagen für eine ausreichende Reduzierung biologischer Risiken u.a. den Nachweis einer Verminderung von *Salmonella* Senftenberg (775W, H₂S negativ) um 5 log-Stufen vor. Dies entspricht einer Abtötung von 99,999%. Lebuhn und Wilderer (2006) sahen bereits eine Reduktion um 4 log -Stufen (bzw. 99,99%) als Hygienisierung aus wissenschaftlicher Sicht an. Nach den in den Keimträgerversuchen erhaltenen Ergebnissen wären diese Anforderungen an den Prozess bei thermophiler Vergärung (60°C) bereits bei einer minimal gesicherten Verweilzeit von weniger als einer halben Stunde erfüllt. Im mesophilen Betrieb (38°C) war eine Abnahme um 4 bzw. 5 Zehnerpotenzen innerhalb des Untersuchungszeitraums von 2 Tagen dagegen nicht in allen Fällen gewährleistet. Hier müsste die gesicherte Verweilzeit noch gesteigert werden. Die Einführung einer Pasteurisierung oder eine Aufteilung des Prozesses in zwei Stufen trägt dazu bei, dass die Abtötung von Krankheitserregern vervielfacht wird.

Abhängig von der geltenden rechtlichen Verordnungen ist der Biogasprozess und der Gärrest der Kontrolle durch bestimmte Untersuchungen unterworfen. Beispielsweise wird in der BioAbfV gefordert, dass die Hygienisierung durch Prozessprüfung, Prozessüberwachung und Produktprüfung kontrolliert werden. Die Prozessprüfung sollte die Reduktion der Salmonellen zumindest einmalig nach Inbetriebnahme nachweisen. Die BioAbfV fordert für Prozessprüfungen streng die Abtötung aller eingesetzten Salmonellen (ca. 10⁶ bis 10⁷ pro mL Fermenterinhalt) nach Durchlaufen des gesamten Prozesses. Dies entspricht einer Reduktion um mindestens 99,9999%.

Daneben sollte die Prozessüberwachung genau eingehalten werden. Dies umfasst die ständige Aufzeichnung und Kontrolle der Prozesstemperatur (nach BioAbfV für thermophile Vergärungsanlagen: ≥ 50°C) und der Mindest-Verweilzeit. Produktprüfungen sollten in gewissen Abständen bestätigen, dass der Gärrest nach der Behandlung frei von Salmonellen ist.

Zudem darf keine Wieder-Verunreinigung des behandelten Gärrests mit Krankheitserregern durch Kontakt mit unbehandeltem Material oder Substrat erfolgen (Schwarz-Weiß-Trennung).

Empfehlungen zur Methodik des Salmonellen-Nachweises

Den erzielten Untersuchungsergebnissen entsprechend kann für eine kombinierte Nachweismethode aus mikro- und molekularbiologischer Kultivierung die Anwendung der MPN-qPCR aus der Rappaport-Vassiliadis-Hauptanreicherung empfohlen werden. Dabei wird der Arbeitsaufwand eines Kultivierungsschritts sowie der biochemischen und serologischen Tests zur Identifizierung der Salmonellen eingespart. Die Methode nimmt in der vorgeschlagenen Form bis zum abschließenden Ergebnis etwa 2,5 Tage in Anspruch.

Es ist ebenfalls empfehlenswert, die im Rahmen des konventionellen Kultivierungsnachweises auf den Selektivnährböden gewachsenen Kolonien mittels eines Salmonellen-spezifischen qPCR-Nachweises auf Salmonellen zu überprüfen. Dieser kann die Ergebnisse der biochemischen bzw. serologischen Identifizierung gleichwertig ersetzen, sofern keine genaue Bestimmung des Serotyps benötigt wird. Der Zeitaufwand ist geringer und das Ergebnis eindeutiger.

Eine wichtige Voraussetzung für die Gewährleistung der Spezifität und Selektivität der Nachweissysteme ist deren Aktualität. Es ist normal, dass in der Umwelt bisher unbekanntere Varianten von Mikroorganismen gefunden und charakterisiert werden – auch von krankheitserregenden Salmonellen. Der Referenz- bzw. Validierungsdatensatz ist daher ständig hinsichtlich solcher neuer Varianten zu aktualisieren. Die Nachweissysteme müssen ggf. entsprechend den Variationen modifiziert oder sogar neu konstruiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Andrade, D., Marin-Pérez, C., Heuwinkel, H., Lebuhn, M., Gronauer, A. (2009): Biogasgewinnung aus Grassilage: Untersuchungen zur Prozessstabilität. In: Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, Band 3: 529-538; Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.), Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Freising, http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37630.pdf.
- Biogashandbuch Bayern (2007): Biogashandbuch Bayern - Materialienband, Kapitel 2.2.6, Stand März 2007, Bayerisches Landesamt für Umwelt (Hrsg.) Augsburg, <http://www.lfu.bayern.de/abfall/biogashandbuch/index.htm>.
- BMU (2012): Zeitreihen zur Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland unter Verwendung der Daten der Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat). Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Stand 08. März 2012, http://www.erneuerbare-energien.de/erneuerbare_energien/datenservice/zeitreihen/doc/45919.php
- DBFZ (2011): Monitoring zur Wirkung des Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) auf die Entwicklung der Stromerzeugung aus Biomasse, Deutsches Biomasseforschungszentrum, Leipzig, März 2011. http://www.dbfz.de/web/fileadmin/user_upload/Userupload_Neu/Stromerzeugung_aus_Biomasse_Zwischenbericht_Maerz_2011.pdf.
- DBFZ (2012): Zubau der Kapazitäten bei Biogasanlagen übertrifft 2011 die Vorjahre. Pressemitteilung vom 19.04.2012. http://www.dbfz.de/web/fileadmin/user_upload/Presseinformationen/2012/PM_Biogasanlagen_FINAL.pdf.
- FNR (2005): Ergebnisse des Biogas-Messprogramms, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR, Hrsg.), <http://mediathek.fnr.de/ergebnisse-des-biogas-messprogramms.html>.
- Frey, W. (2012): Stand und Trends bei der Faulgasverwertung auf Kläranlagen. Wiener Mitteilungen (2012), Institut für Wassergüte, TU-Wien, http://www.aabfrey.com/wp-content/uploads/2012/03/TU_Sem_2012_Text.pdf.
- Lebuhn, M., Wilderer, P. (2006): Abschlussbericht des StMUGV-Projekts: Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten, Projektteil B: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft. <http://www.lfl.bayern.de/ilt/umwelttechnik/23185/>.
- Lebuhn, M., Effenberger, M., Bachmaier, J., Gronauer, A. (2007): Biogastechnologie für Hygiene und Umwelt in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten. LfL-Information, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Vöttinger Straße 38, D-85354 Freising-Weißenstephan. Lerchl Druck, Freising, http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/informationen/p_27458.pdf.
- Lebuhn, M., Andrade, D., Bauer, C., Gronauer, A. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen. Abschluss-

- bericht. Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR),
<http://www.lfl.bayern.de/itt/umwelttechnik/biogastechnik/40725/>
- Marín Pérez, C., Fröschle, B., Lebuhn, M. (2012): Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe. Abschlussbericht. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT), Freising-Weihenstephan (in Druck). In Kürze auf: <http://www.lfl.bayern.de/ilt/umwelttechnik/03551/index.php?context=/lfl/itt/umwelttechnik/>
- RKI (2009): Epidemiologisches Bulletin Nr. 13/2009 des Robert Koch Instituts – RKI-Ratgeber für Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte – Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis),
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/epid_bull_form.html bzw.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/Ausgaben/13_09.pdf?blob=publicationFile.
- SN EN ISO 6579:2002-07: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln- Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonellen spp. (ISO 6579:2002).
- Strobl, M. (2012): Biogas in Zahlen –Bayern zum 31.12.2011 Auszug aus der Biogasanlagen-Betreiber-Datenbank Bayern (BBD). Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Agrarökonomie, München,
http://www.lfl.bayern.de/ilb/technik/35144/linkurl_0_74.pdf.

7 Verzeichnis der Gesetze und Verordnungen

Verordnungen und Gesetze, die dem Bundesrecht entstammen, werden im Internet vom Bundesministerium für Justiz bereitgestellt unter: www.gesetze-im-internet.de.

Zugang zum Recht der Europäischen Union besteht durch das Amt für amtliche Veröffentlichungen der Europäischen Gemeinschaften unter: www.eur-lex.europa.eu.

BioAbfV (2012): Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung - BioAbfV), Bioabfallverordnung vom 21. September 1998 (BGBl. I S. 2955), die zuletzt durch Artikel 1 u. Artikel 4 der Verordnung vom 23. April 2012 (BGBl. I S. 611) geändert worden ist.

DüMV (2012): Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV), Düngemittelverordnung vom 16. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2524), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 23. April 2012 (BGBl. I S. 611) geändert worden ist.

DüngG (2012): Düngegesetz *) vom 9. Januar 2009 (BGBl. I S. 54, 136), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 15. März 2012 (BGBl. I S. 481) geändert worden ist.

KrWG (2012): Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Bewirtschaftung von Abfällen (Kreislaufwirtschaftsgesetz - KrWG) vom 24. Februar 2012 (BGBl. I S. 212).

TierNebV (2012): Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes (Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung - TierNebV), vom 27. Juli 2006 (BGBl. I S. 1735), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 23. April 2012 (BGBl. I S. 611) geändert worden ist.

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).

Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des europäischen Parlaments und des Rates vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte (ABl. L 273 vom 10.10.2002, S. 1).

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.