

Aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene  
sowie Tiermedizin mit Tierklinik  
der Universität Hohenheim

Eingereicht über das Institut für Tier- und Umwelthygiene  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur seuchenhygienischen Unbedenklichkeit  
von Gärresten aus Bioabfällen nach der  
Behandlung in Anaerobanlagen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Veterinärmedizin an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt

von

**Katja Ade-Kappelmann, geb. Ade**

Tierärztin

aus Bietigheim

Berlin 2008

Journal-Nr. 3255

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunberg  
Erster Gutachter: Prof. Dr. G. Schlenker  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. R. Böhm  
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Karl-Hans Zessin

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

bioreactors, faeces, occupational hazards, manure, methane, bacteria, bacterial count, anaerobes, waste disposal, biodegradation, temperature, fermentation, gases, salmonella

Tag der Promotion: 06.02.09

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-553-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild © paul mitchell - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

nordendstr. 75 - 13156 berlin – 030-45494866  
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b>	<b>3</b>
2.1	Gesetzliche Grundlagen	3
2.1.1	Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (-KrW-/AbfG)	3
2.1.2	Bioabfallverordnung (BioAbfV)	4
2.1.3	Verordnung (EG) Nr.1774/2002	7
2.1.4	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG)	10
2.1.5	Düngemittelverordnung	12
2.2	Anaerobe Fermentation	13
2.2.1	Definition	13
2.2.2	Der Gärprozess	13
2.2.3	Verschiedene Anlagentypen	14
2.3	Übertragung von Krankheitserregern durch Sekundärrohstoffdünger	16
2.4	Substrate für Biogasanlagen	18
2.5	Indikatororganismen	19
2.5.1	Salmonellen	20
2.5.2	<i>Escherichia coli</i> (Fäkalcoliforme)	22
2.5.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	22
2.5.4	<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>	23
2.5.5	<i>Bacillus globigii</i>	26
2.5.6	<i>Campylobacter jejuni</i>	27
2.5.7	Phage T1	28
2.5.8	<i>Ascaris suum</i>	29
2.6	Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in Anaerobreaktoren	30
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Untersuchungen an halbtechnischen Anlagen und an einer Pasteurisierungseinheit (P)	32
3.1.1	Anaerobe Vergärungsanlage	32
3.1.2	Pasteurisierungseinheit (PE)	35
3.1.3	Versuchsdurchführung im halbtechnischen Maßstab	36

## II

3.1.4	Im halbtechnischen Maßstab verwendete Prüforganismen	37
3.2	Untersuchungen an Praxisanlagen	38
3.2.1	Anlage A	38
3.2.2	Anlage B	39
3.2.3	Anlage C	40
3.2.4	Anlage D	42
3.2.5	Anlage E	43
3.2.6	Anlage F	45
3.2.7	Anlage G	46
3.2.7.1	Pasteurisierungseinheit (PE) der Anlage G	46
3.2.7.2	Rohrfermenter der Anlage G	48
3.2.8	Anlage H	48
3.2.9	Gesamtübersicht zu den beprobten Anlagen A bis H	49
3.2.10	Versuchsdurchführung in den Praxisanlagen	50
3.2.11	In den Praxisanlagen verwendete Prüforganismen	52
3.3	Verwendete Prüfkörper	53
3.4	Mikrobiologisch-parasitologische Untersuchungsmethoden	56
3.4.1	Herstellung einer Mikroorganismensuspension	56
3.4.2	Herstellen einer Verdünnungsreihe	60
3.4.3	Most Probable Number (MPN) - Verfahren	61
3.4.4	Koch'sches Oberflächenverfahren	61
3.4.5	Plaque Test	62
3.4.6	Nachweis ausgewählter Mikroorganismen	62
3.4.6.1	Nachweis von Salmonellen	62
3.4.6.2	Nachweis von Gesamtcoliformen und Fäkalcoliformen ( <i>Escherichia coli</i> )	64
3.4.6.3	Nachweis von Enterokokken	65
3.4.6.4	Nachweis von <i>Campylobacter jejuni</i>	66
3.4.6.5	Nachweis von <i>Bacillus globigii</i>	67
3.4.6.6	Nachweis von <i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>	68
3.4.6.7	Nachweis von Coliphagen	69
3.4.6.8	Nachweis von Askarideneiern	69
3.5	Durchführung einer „Direkten Prozessprüfung“	70

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>71</b>
4.1	Ergebnisse an den halbertechnischen Anlagen und an einer Pasteurisierungseinheit (PE)	71
4.1.1	Ergebnisse der „Input-Output Analyse“	71
4.1.2	Tenazitätsversuche mit Prüforganismen in Laboranlagen	74
4.1.2.1	Prüforganismus: <i>Salmonella Senftenberg</i>	75
4.1.2.2	Prüforganismus: <i>Campylobacter jejuni</i>	76
4.1.2.3	Prüforganismus: <i>Enterococcus faecalis</i>	78
4.1.2.4	Prüforganismus: <i>Coliphage</i> „Wildstamm“	80
4.1.3	Tenazitätsversuche mit Prüforganismen an einer Pasteurisierungseinheit	83
4.1.3.1	Prüforganismus: <i>Enterococcus faecalis</i>	83
4.1.3.2	Prüforganismus: <i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>	84
4.1.3.3	Prüforganismus: <i>Coliphage T1</i>	86
4.1.3.4	Prüforganismus: <i>Coliphage</i> „Wildstamm“	87
4.1.3.5	Prüforganismen: Eier von <i>Ascaris suum</i>	89
4.1.4	Versuche zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit (Mindestaufenthalts- zeit) von Substratpartikeln in den beiden Laboranlagen	90
4.2	Ergebnisse der Praxisanlagen	92
4.2.1	Vorbemerkung	92
4.2.2	In- und Outputanalysen der Anlage A (mesophil 42 - 47 °C)	93
4.2.3	In- und Outputanalysen der Anlage B (mesophil 45 - 49 °C)	94
4.2.4	In- und Outputanalysen der Anlage C (mesophil 47 °C mit vorgeschnittener Hygienisierungseinheit)	95
4.2.5	In- und Outputanalysen der Anlage D (mesophil 43 °C)	96
4.2.6	In- und Outputanalysen der Anlage E (thermophil 55 °C)	97
4.2.7	In- und Outputanalysen der Anlage F (thermophil 55 °C)	98
4.2.8	Versuche an der Pasteurisierungseinheit der mesophilen Anlage G	99
4.2.8.1	Temperaturverlauf während der Pasteurisierung	99
4.2.8.2	Einwirkdauer der Temperatur während der Pasteurisierung	100
4.2.8.3	Tenazität der verschiedenen Mikroorganismen in der Pasteurierungs- einheit (PE) bei verschiedenen Zeit- und Temperaturstufen	102

## IV

4.2.9	Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlagen A (mesophil 44 - 47 °C)	103
4.2.10	Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage B (mesophil 46 – 48 °C)	104
4.2.11	Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage C (Hygienisierungseinheit ca. 60°C)	105
4.2.12	Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage D (mesophil 38,5 - 40 °C)	107
4.2.13	Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage E (thermophil 52 - 55 °C)	108
4.2.14	Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage F (thermophil 54 - 55 °C)	109
4.2.14.1	Erster Beprobungsdurchgang	109
4.2.14.2	Zweiter Beprobungsdurchgang	110
4.2.15	Bestimmung der realen Aufenthaltszeit an den Praxisanlagen A, G und H	111
4.2.15.1	Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in der Anlage A	111
4.2.15.2	Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in der Anlage G	112
4.2.15.3	Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in der Anlage H	112
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	114
5.1	Vorbemerkung	114
5.2	Beurteilung der verwendeten Probebehältnisse	115
5.3	Untersuchungen an den Laboranlagen	116
5.3.1	Tenazitätsversuche	116
5.3.2	Reale Aufenthaltszeit des Materials	120
5.4	Untersuchungen an den großtechnischen Anlagen	121
5.4.1	Direkte Prozessprüfung an den großtechnischen Anlagen A-F	121
5.4.2	Reale Aufenthaltszeit des Materials	123
5.5	In- und Outputanalysen (Produktprüfungen) in den Laboranlagen sowie in den Anlagen A–G	123
5.6	Beurteilung der Prüforganismen im Vergleich zu <i>Salmonella Senftenbeg</i> W775 H <sub>2</sub> S negativ	125

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	127
<b>7</b>	<b>Summary</b>	130
<b>8</b>	<b>Schriftum</b>	133
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	149

## Abbildungen

Abbildung 1:	Seitenansicht der Biogasanlage im halbtechnischen Maßstab (ohne Holzmantel)	33
Abbildung 2:	Frontalansicht der Biogasanlage (Holzmantel im Bau)	34
Abbildung 3:	Schema der Biogasanlage	34
Abbildung 4:	Fermenter und Blockheizkraftwerk (BHKW) der Anlage A	39
Abbildung 5:	Ansicht Fermenter 1 auf Fermenter 2 der Anlage C	41
Abbildung 6:	Anlage D, Fermenter mit Schauglas	46
Abbildung 7:	Anlage E, Gesamtansicht	45
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Hygienisierungseinheit der Anlage G (Darstellung vom Betreiber zur Verfügung gestellt)	47
Abbildung 9:	Schematischer Aufbau des Prüfkörpers Typ 1 (RAPP, 1995)	54
Abbildung 10:	Prüfkörper Typ 1 (RAPP, 1995)	55
Abbildung 11:	Herstellung von Gaze-Säckchen	56
Abbildung 12:	Spulwurmpräparation zur Gewinnung von befruchteten Eiern von <i>Ascaris suum</i> (SCHWARZ, 2003)	59
Abbildung 13:	In- und Outputanalysen an der Anlage A (42 - 47 °C)	93
Abbildung 14:	In- und Outputanalysen an der Anlage B (45 - 49 °C)	94
Abbildung 15:	In- und Outputanalysen an der Anlage C (mesophil 47 °C mit vorgeschalteter Pasteurisierungseinheit)	95
Abbildung 16:	In- und Outputanalysen an der Anlage D (mesophil 43 °C)	96
Abbildung 17:	In- und Outputanalysen an der Anlage E (thermophil 55 °C)	97
Abbildung 18:	In- und Outputanalysen an der Anlage F (thermophil 55 °C)	98



## VII

Abbildung 19: Temperaturverlauf während des Hygienisierungsprozesses	100
Abbildung 20: Grafische Darstellung der Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenahmen im Hygienisierungsbehälter	101
Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der Tenazität der verwendeten Mikroorganismen während des Hygienisierungsprozesses	102

## Tabellen

Tabelle 1:	Unterscheidungsmerkmale von Vergärungsverfahren (KERN, 1999; WEILAND, 1999)	15
Tabelle 2:	Gesamtübersicht zu den beprobten Anlagen A bis H	49
Tabelle 3:	Ergebnis des Bakterienstatus im Beschickungsmaterial (Input) der Laboranlagen (Angaben in KBE/g)	73
Tabelle 4:	Ergebnis des Bakterienstatus nach der anaeroben mesophilen (35 °C) Faulung (Output) in Laboranlagen (Angaben in KBE/g)	73
Tabelle 5:	Ergebnis des Bakterienstatus nach der anaeroben thermophilen (55 °C) Faulung (Output) in den Laboranlagen (Angaben in KBE/g)	74
Tabelle 6:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Salmonella Senftenberg</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	75
Tabelle 7:	Ergebnisse nach 24 Stunden Kontaktzeit von Salmonellen* im mesophil (35 °C) betriebenen Reaktor (Angaben in KBE/g)	76
Tabelle 8:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Campylobacter jejuni</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	77
Tabelle 9:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Campylobacter jejuni</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	78
Tabelle 10:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Enterococcus faecalis</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	79
Tabelle 11:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Enterococcus faecalis</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	80

Tabelle 12:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Coliphagen</i> „Wildstamm“ in den Prüfkörpern A und B* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)	81
Tabelle 13:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Coliphagen</i> „Wildstamm“ in den Prüfkörpern A und B* nach 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)	82
Tabelle 14:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Enterococcus faecalis</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 10, 20, 30 und 60 Minuten Kontaktzeit in der Pasteurisierungseinheit bei 70 °C und nach 10 Minuten bei 80 °C an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	84
Tabelle 15:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Mycobacterium avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i> in den Prüfkörpern A und B* nach 30 und 60 Minuten Kontaktzeit in der Pasteurisierungseinheit (70 °C und 90 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)	85
Tabelle 16:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Coliphagen</i> T1 in den Prüfkörpern A und B* nach 10, 20, 30 und 60 Minuten Kontaktzeit bei einer Betriebstemperatur der Pasteurisierungseinheit von 70 °C und nach 10 und 20 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 80 °C an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)	86
Tabelle 17:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Coliphagen</i> „Wildstamm“ in den Prüfkörpern A und B* nach 10, 20, 30 und 60 Minuten bei einer Betriebstemperatur der Pasteurisierungseinheit von 70 °C und nach 10 und 20 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 80 °C an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)	88
Tabelle 18:	Ergebnisse der Tenazität von <i>Ascaris suum</i> (180.000 Eier/ml) in den Prüfkörpern A und B nach 30 und 60 Minuten Kontaktzeit in Laborpasteur (70 °C und 90 °C) an je 4 Folgetagen	89
Tabelle 19:	Ergebnisse zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit (Mindestaufenthaltszeit) mit Hilfe von <i>Bacillus globigii</i> -Sporensuspension (Konzentration 10 <sup>8</sup> Sporen/ml) an zwei Laboranlagen, Zeitspanne zwischen Einbringen der Sporensuspension und Nachweis am Austrag (Output) der Anlagen	91

Tabelle 20:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775 im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage A	103
Tabelle 21:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775 (12 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage B (46 °C – 48 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 bzw. 48 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)	104
Tabelle 22:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775 (2 Parallelansätze), <i>Coliphagen</i> „Wildstamm“ (4 Parallelansätze) und <i>Enterococcus faecalis</i> (4 Parallelansätze) in der Pasteurisierungseinheit (60 °C) der Anlage C nach einer Aufenthaltszeit von 30 bzw. 60 Minuten (Angaben in KBE/PFU/g)	105
Tabelle 23:	Inaktivierung von <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775 und <i>Enterococcus faecalis</i> (je 4 Parallelansätze) im Hygienisierungstrank (70 °C) durch die Temperaturerhöhung nach einer Aufenthaltszeit von 30 und 60 Minuten (Angaben in KBE/g)	106
Tabelle 24:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775, <i>Coliphage T1</i> und <i>Enterococcus faecalis</i> (je 8 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage D (38,5 °C – 40 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)	107
Tabelle 25:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775, <i>Coliphage T1</i> und <i>Enterococcus faecalis</i> (je 8 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage E (52 °C – 55 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)	108
Tabelle 26:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775, <i>Coliphage T1</i> und <i>Enterococcus faecalis</i> (je 8 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage F (54 °C – 55 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)	109
Tabelle 27:	Ergebnisse der direkten Prozessprüfung (zweiter Beprobungsdurchgang) mit <i>Salmonella Senftenberg</i> W 775, <i>Coliphage</i> „Wildstamm“, <i>Coliphage T1</i> und <i>Enterococcus faecalis</i> (je 8 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage F (54 °C – 55 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)	110

Tabelle 28: Aufenthaltszeit (Zeit zwischen Einbringung mit dem Beschickungsmaterial und erstem Auftreten am Auslauf) von *Bacillus globigii* in den Anlagen A, G und G

113

## Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
BioAbfV	Bioabfallverordnung
ca.	cirka
DüMV	Düngemittelverordnung
d.h.	das heißt
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FCF	Fäkalcoliforme
GCF	Gesamtcoliforme
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
KBE	koloniebildende Einheiten
l	Liter
MPN	most-probable-number
Mio.	Milion(en)
ml	Milliliter
m	Meter
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU	Plaque forming units
pH	Wasserstoffionenkonzentration
sog.	so genannt(e)
spp.	Subspezies
T	Tonne(n)
TGB	Trypton-Glucose-Bouillon
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
TPTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TS	Trockensubstanzgehalt
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer

## 1 Einleitung

Mit der Einführung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) im April 2000 und deren Novellierung in 2004 hat die Biogasbranche einen regelrechten Boom erlebt, wobei in Deutschland seit Ende 2007 mehr als 3.700 Biogasanlagen mit einer Gesamtleistung von rund 1.270 MW circa 6,4 Millionen Megawattstunden Strom pro Jahr erzeugen. Diese Menge entspricht etwa 1,3 Prozent der gesamten Stromproduktion (ANONYM, 2007). Dabei wurden bevorzugt sog. Kofermentationsanlagen installiert, die heute immer weniger Gülle, stattdessen mehr und mehr Kofermentate verwerten. Unter Kofermentation versteht man die gemeinsame Vergärung von Gülle, Jauche oder Festmist zusammen mit Bio- und Grünabfällen, Speiseresten- und Lebensmittelabfällen sowie energiereichen Pflanzen (nachwachsende Rohstoffe, NawaRos) und Pflanzenabfällen.

Die verschiedenen Abfallstoffe unterschiedlichster Herkunft und Zusammensetzung können eine Vielzahl von Erregern aus den Gruppen der Bakterien, Viren und Parasiten enthalten mit zum Teil langen Überlebenszeiten. Dies führt zu einem verstärkten seuchen- und umwelthygienischen Risiko bei der Verwertung der Abfälle als Dünger in der Landwirtschaft, sofern nicht gewährleistet wird, dass durch eine verlässliche Behandlung dieser Stoffe, wie z. B. der Pasteurisierung, der Kompostierung oder der Anaerobbehandlung relevante Infektionserreger für Mensch, Tier und Pflanze sicher abgetötet werden (BÖHM, 2003).

Während sich bisherige Untersuchungen hauptsächlich auf die Tenazität von Salmonellen, *Escherichia coli*, Enterokokken sowie Entero- und Parvoviren in den Verfahren der Kompostierung und der Anaerobbehandlung (Biogasanlagen) beschränkten (RAPP, 1995; HOFERER, 2001; STÖCKLEIN, 2005), erlangten Mikroorganismen, wie z. B. *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, insbesondere vor dem Hintergrund der am 3. Oktober 2002 in Kraft getretenen Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (ANONYM, 2002a) zur Regelung von tierischen Nebenprodukten in Fachkreisen vermehrt Interesse. Die Verordnung enthält strenge tierseuchen- und hygienerechtliche Vorschriften für die Abholung und Sammlung, Beförderung, Lagerung, Behandlung, Verarbeitung und Verwendung oder Beseitigung sämtlicher tierischer Nebenprodukte. Seit dem 1. Mai 2003 gelten nun in der gesamten EU diese Vorschriften. National dient das Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG) vom 25. Januar 2004 der Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002.

Im Vorfeld der Umsetzung der oben genannten EU-Verordnung und der nationalen Rechtsbereiche waren die wissenschaftliche Untersuchungen unter Verwendung bisher nicht in biotechnologischen Behandlungsverfahren angewandten Prüforganismen ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus sollte die Tenazität der Prüforganismen in Kofermentationsanlagen im Zusammenhang der Novellierung der Bioabfallverordnung (ANONYM, 1998) untersucht werden, um möglicherweise Alternativen zu den bisher vorgeschriebenen Prüforganismen zu erarbeiten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ergänzend zu den bisherigen Untersuchungen in Anaerobanlagen (Kofermentation) durch gezielte Untersuchungen seuchenhygienisch relevanter Prüforganismen in halbtechnischen Anlagen und in Praxisanlagen, Aussagen zur Tenazität der Prüforganismen durch die Prozesseinflüsse der anaeroben Behandlung und der Hygienisierung bei unterschiedlichen Temperaturen und Aufenthaltszeiten geben zu können. Daher wurden im Jahr 2002 vergleichende Untersuchungen zur Tenazität von *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Senftenberg*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, *Ascaris suum*-Eier, *Coliphage T1* und *Coliphage „Wildstamm“* durchgeführt.

Bei der Überprüfung der Inaktivierungsrate von Mikroorganismen durch die Prozesse der anaeroben Fermentation sowie unterschiedlicher Hygienisierungsverfahren wurden ausgewählte Prüforganismen mit Hilfe von Prüfkörpern in die Anlagen eingebracht.

Parallel zu den Tenazitätsuntersuchungen mit den speziell entwickelten Prüfkörpern wurden mikrobiologische Untersuchungen des In- und Outputmaterials durchgeführt. Dabei wurden die Substrate aus unterschiedlichen Anlagen auf ihren Gehalt an Salmonellen, Enterokokken und Gesamtcoliforme sowie Fäkalcoliforme untersucht. Das Ziel der In- und Outputuntersuchungen lag darin, die Effektivität der in den untersuchten Anlagen ablaufenden Prozesse der anaeroben Fermentation sowie der angewandten Hygienisierungsverfahren zu überprüfen.



## **2 Literatur**

### **2.1 Gesetzliche Grundlagen**

Im Bereich der Sekundärrohstoffverwertung verfolgt die Umweltpolitik von Bund und Ländern zwei Ziele: Auf der einen Seite die weitgehende und umweltgerechte Verwertung von Bioabfällen, auf der anderen Seite den Auf- und Ausbau der Energiegewinnung aus Biomasse als Element einer verantwortungsvollen, zukunftsorientierten Energiepolitik mit der Maßgabe einer sachgerechten Einbettung der Energiegewinnung aus Biomasse in den Umwelt- und Naturschutz sowie unter der Prämisse verwaltungsrechtlicher Rahmenbedingungen (HÖCHST, 2002). Im landwirtschaftlichen Bereich sind bei der Errichtung von Biogasanlagen unter Berücksichtigung der möglichen Auswirkungen auf die Umwelt eine Vielzahl gesetzlicher Vorgaben sowie Sicherheitsanforderungen und die in den erforderlichen Genehmigungsbescheiden und Erlaubnissen festgelegten Regularien zu beachten. Von großer Bedeutung sind daher die wasserrechtlichen Anforderungen an die Errichtung der Lagerbehälter, Vorlage- und Gärbehälter, Endlagerbehälter, Rohrleitungssysteme, Abtankflächen und Einrichtungen für die unterschiedlichen Lager- und Behandlungsbereiche. Die Aufbringung der Endprodukte (Gärprodukt / Kompost) auf landwirtschaftliche Nutzflächen wird hingegen durch die Bioabfallverordnung (BioAbfV) und das einschlägige Düngemittelrecht bestimmt. Auch hier sind jedoch die wasserrechtlichen Vorschriften zu beachten (ANONYM, 2002b). Um den Bau und Betrieb von Biogasanlagen zu steuern und zu überwachen, bzw. die Genehmigung und Überwachung in einen geordneten Rahmen zu stellen, gelten eine Vielzahl an Gesetzen und Vorschriften. Erläuterung finden hier jedoch nur die Gesetze, die für die beschriebenen Untersuchungen von Relevanz sind.

#### **2.1.1 Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (KrW-/AbfG)**

Gemäß der Vorgabe des EU-Abfallrechts (ANONYM, 1991) hat das nach deutschem Recht geltende Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (ANONYM, 1994) die Abfallnomenklatur des „European Waste Catalogue-EWC“ übernommen.

Dieses bietet dadurch eine einheitliche Grundlage für die Bezeichnung von Abfällen in der Europäischen Union. Gemäß den Begriffsdefinitionen des EWC sind Speisereste

Nahrungsmittelabfälle tierischer und pflanzlicher Herkunft aus Einrichtungen der Gemeinschaftsverpflegung und privater Haushalte. Überlagerte Nahrungsmittel haben das gesetzlich vorgeschriebene Verfallsdatum erreicht oder überschritten.

### **2.1.2 Bioabfallverordnung (BioAbfV)**

Die Bioabfallverordnung (ANONYM, 1998) ist eine Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden.

Im Einvernehmen mit dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMVEL) und dem Bundesministerium für Gesundheit (BMG) hat das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) am 21. September 1998 auf Grund des § 8 Abs. 1 und 2 des Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes (KrW-/AbfG) vom 27. September 1994 die so genannte Bioabfallverordnung erlassen (BGBl. I S. 2705). Diese gilt für unbehandelte und behandelte Bioabfälle und Gemische, die zur Verwertung auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzten Böden aufgebracht werden sollen oder zum Zweck der Aufbringung abgegeben werden. Der Geltungsbereich erstreckt sich darüber hinaus auch auf die Behandlung und Untersuchung solcher Bioabfälle und Gemische.

Diese Verordnung gilt für die folgenden Anwendungsbereiche:

- öffentlich-rechtliche Entsorgungsträger und Dritte, Verbände oder Selbstverwaltungskörperschaften der Wirtschaft, denen nach § 16 Abs. 2, § 17 Abs. 3 oder § 18 Abs. 2 des Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes Pflichten zur Verwertung von Bioabfällen übertragen worden sind (Entsorgungsträger),
- Erzeuger oder Besitzer von Bioabfällen oder Gemischen, soweit sie diese Abfälle nicht einem Entsorgungsträger überlassen,
- Denjenigen, der Bioabfälle behandelt (Bioabfallbehandler),
- Hersteller von Gemischen unter Verwendung von Bioabfällen (Gemischhersteller),
- Bewirtschafter von landwirtschaftlich, gärtnerisch oder forstwirtschaftlich genutzten Böden, auf denen unbehandelte oder behandelte Bioabfälle oder Gemische aufgebracht werden sollen oder aufgebracht werden.

Die Behandlung, welcher die Bioabfälle zugeführt werden, muss demnach die seuchen- und phytohygienische Unbedenklichkeit gewährleisten. Dies ist dann gegeben, wenn in Vergärungsanlagen das Material so behandelt wird, dass eine Mindesttemperatur von 55 °C über einen zusammenhängenden Zeitraum von 24 Stunden sowie eine hydraulische Verweilzeit im Reaktor von mindestens 20 Tagen erreicht wird. Bestehen niedrigere Betriebstemperaturen oder eine kürzere Einwirkungszeit, muss entweder eine thermische Vorbehandlung der Inputmaterialien durch Erhitzung auf 70 °C für eine Stunde oder eine entsprechende Nachbehandlung der Produkte bzw. eine aerobe Nachrotte der separierten Gärrückstände (Kompostierung) durchgeführt werden. Inputmaterialien, die noch nicht hygienisiert sind, sind dabei so aufzubewahren, dass sie nicht mit bereits vergorenen, kompostierten oder erhitzten Materialien in Berührung kommen können („Schwarz-Weiß-Trennung“).

Die genannten Behandlungsprozesse müssen entsprechend der Verordnung zudem mit einer Überwachungsmöglichkeit ausgestattet sein. So muss die Möglichkeit der Einbringung und der Entnahme von Proben des Materials über Öffnungen erfolgen.

Die Risiken einer Übertragung von epidemiologisch relevanten Krankheitserregern sind bei bestimmungsgemäßer Anwendung von hygienisch unbedenklichen Produkten aus der biologischen Abfallbehandlung minimiert. Falls der Anwendungszweck es erfordert, dass auch Mikroorganismen höherer Chemo- und/oder Thermoresistenz inaktiviert sein müssen, so muss dies durch eine validierte zusätzliche Behandlung erfolgen. Mit Hilfe von direkten und indirekten Prozessprüfungen und mit Produktprüfungen wird die hygienische Unbedenklichkeit von Produkten aus der biologischen Abfallbehandlung festgestellt. Erst wenn alle Prüfungsanforderungen erfüllt sind, können die Produkte als hygienisch unbedenklich eingestuft werden. Haben Produkte die Prüfungen nicht bestanden, müssen sie einer erneuten keimabtötenden Behandlung unterzogen werden.

Mit der direkten Prozessprüfung wird durch Einbringen von Prüf- oder Indikatororganismen der Wirkungsgrad des Verfahrens aus hygienischer Sicht für den gesamten Verfahrensablauf ermittelt. Die direkte Prozessprüfung erfolgt mit dem Prüforganismus *Salmonella Senftenberg* W775 H<sub>2</sub>S negativ. Eine direkte Prozessprüfung ist innerhalb von zwölf Monaten nach Inbetriebnahme einer neu errichteten Bioabfallbehandlungsanlage durchzuführen. Dies gilt entsprechend für bereits geprüfte Anlagen bei Einsatz neuer Verfahren oder wesentlicher technischer Änderung der Verfahren oder Prozessführung.

Mit der direkten Prozessprüfung wird durch Einbringen von Test- oder Indikatororganismen der Wirkungsgrad des Verfahrens aus hygienischer Sicht für den gesamten Verfahrensablauf ermittelt. Die Indikatororganismen werden dafür in die für die thermische Inaktivierung der Prüforganismen repräsentativen Prozessabschnitte und nach entsprechend zeitlich angepasster Entnahme auf überlebende bzw. infektiöse Prüforganismen geprüft.

Geeignete Abfallbehandlungstechniken und die dazu notwendigen baulichen Voraussetzungen können das Gesundheitsrisiko im Umgang mit tierischen Abfällen wesentlich reduzieren (BÖHM, 1999; COLE et al., 1999). Zum Ausschluss der Beteiligung von Biogasanlagen an der Verbreitung von Tierseuchengeschehen ist es daher notwendig, alle erforderlichen Rahmenbedingungen beim Bau und Betrieb einer solchen Anlage zu erfüllen. Anaerob-Anlagen müssen aus hygienischer Sicht folgende Bedingungen für eine direkte Prozessprüfung erfüllen:

- Zugangsöffnungen am Reaktor und/oder an der Vor- bzw. Nacherhitzungseinrichtung zum Einbringen der Prüfkörperproben,
- Messfühler für Temperatur an den für die thermische Inaktivierung der Prüforganismen relevanten Anlagenteilen (Hygienisierung),
- pH- und Temperaturmessung im Bereich der Prüfkörperproben,
- errechnete bzw. an der Anlage gemessene Angaben zur realen Verweilzeit der Substratpartikel (BÖHM, 1999).

Bei indirekten Prozessprüfungen sind lediglich über den Temperaturverlauf an repräsentativen Stellen der Anlage, z.B. Kernzonen der Hygienisierungseinrichtung, bzw. des Anaerobreaktors, und die Beschickungsintervalle der anaeroben Behandlungsanlagen Aufzeichnungen zu führen und fünf Jahre aufzubewahren.

Die „indirekte Prozessprüfung“ kommt dann zum Einsatz, wenn die oben genannten Kriterien bei Anlagen nicht erfüllt werden können, welche sich schon im Betrieb befinden. Als Übergangslösung gibt es die erweiterte „Input- / Outputkontrolle“, d.h. das Material wird sowohl vor als auch nach der Anlage zur Kennzeichnung des hygienischen Wirkungsgrades monatlich durch ein Referenzlabor überprüft. Nach der Novellierung der Bioabfallverordnung gibt es diese Möglichkeit nicht mehr (PHILIPP, 2005).

Die Produktprüfungen (Endproduktkontrollen) im Rahmen der Fremdüberwachung sollen gewährleisten, dass das Endprodukt hygienisch unbedenklich ist. In jeder Kompostierungs- und Vergärungsanlage sind mindestens halbjährliche bzw. vierteljährliche Produktprüfungen durchzuführen.

### **2.1.3 Verordnung (EG) Nr. 1774/2002**

In Reaktion auf die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) - und Maul- und Klauenseuche (MKS) - Krise wurden auch für risikofreie Rückstände aus der Lebensmittelbranche hohe hygienische Anforderungen an den Betrieb und die Ausstattung von Kompostierungs- und Vergärungsanlagen bestimmt (ANONYM, 2002a).

Innerhalb der Europäischen Union werden mit dieser Verordnung hygiene- und tierseuchenrechtliche Vorschriften hinsichtlich

- Verarbeitung und Verwendung oder Beseitigung,
- Abholung und Sammlung sowie
- Beförderung, Lagerung und Behandlung

von tierischen Nebenprodukten erlassen.

Die Verordnung dient, wie die Bioabfall- (BioAbfV) und Düngemittelverordnung (DüMV), dem Schutz und der Sicherheit der Gesundheit von Mensch und Tier im Umgang mit tierischen Nebenprodukten, wobei Küchen- und Speiseabfälle eine besondere Bedeutung zugemessen werden: „Küchen- und Speiseabfälle, die Erzeugnisse tierischen Ursprungs enthalten, können ebenfalls ein Kanal für die Verbreitung von Seuchen sein. Küchen- und Speiseabfälle, die innerhalb der Gemeinschaft anfallen, sollten nicht für die Verfütterung an Nutztiere, ausgenommen Pelztiere, verwendet werden.“

In Artikel 4 bis 6 erfolgen genaue Begriffsbestimmungen der tierischen Nebenprodukte mit einer Einteilung in drei Kategorien:

1. Kategorie 1: TSE-verdächtige Tiere, spezifisches Risikomaterial (SRM), Gemische von Kategorie 1 Materialien mit Materialien der Kategorien 2 und/oder 3.
2. Kategorie 2: andere tierische Nebenprodukte als Materialien der Kategorie 1, inkl. Gülle und Magen- und Darminhalte, sowie Gemische von Materialien der Kategorien 2 und 3.

3. Kategorie 3: Nebenprodukte gesunder Tiere, die zum menschlichen Verzehr geschlachtet wurden, ehemalige Lebensmittel, Küchen- und Speiseabfälle u. a.

Gülle wird beispielsweise in Kategorie 2 eingeteilt und darf damit nur noch nach Vorbehandlung unter Drucksterilisation in Biogas- und Kompostanlagen verwertet werden. Dies führt zu einer Fülle an Ausnahme- und Übergangsbestimmungen (KEHRES, 2003).

Die Verordnung enthält weiterhin spezielle Vorschriften für die Zulassung von Biogas- und Kompostieranlagen im Anhang VI unter Kapitel II, geändert durch die **Verordnung (EG) Nr. 208/2006** der Kommission vom 7. Februar 2006 (ANONYM, 2006a).

Entsprechend Abschnitt A müssen Biogasanlagen über nachfolgende Einrichtungen verfügen:

1. unumgehbare Pasteurisierungs-/Entseuchungsabteilung mit
  - Geräte zur Überwachung der Temperaturentwicklung,
  - Aufzeichnungsgeräten zur kontinuierlichen Aufzeichnung der oben genannten Messergebnisse
  - einem angemessenem Sicherheitssystem zur Vermeidung einer unzulänglichen Erhitzung
2. geeignete Einrichtungen zur Reinigung und Desinfektion von Fahrzeugen und Behältern beim Verlassen der Biogasanlage.

In der Verordnung (EG) Nr. 208/2006 unter Abschnitt B, C und D wird zudem detailliert auf die Hygienevorschriften, Verarbeitungsnormen und Fermentationsrückstände und Kompost eingegangen:

1. Material der Kategorie 3, das in mit einer Pasteurisierungs-/Entseuchungsabteilung ausgestatteten Biogasanlage als Rohmaterial verwendet wird, muss folgende Mindestnormen erfüllen:
  - Höchstteilchengröße vor Eingang in die Abteilung: 12 mm,
  - Mindesttemperatur des gesamten Materials in der Abteilung 70 °C und
  - Mindestzeit in der Abteilung ohne Unterbrechung: 60 Minuten
2. Validierung des geplanten Verfahrens durch Messung der Verminderung der Lebensfähigkeit/Infektiosität von:
  - endogenen Indikatororganismen während des Verfahrens, wobei der Indikator:
  - im Rohmaterial ständig in hoher Anzahl vorhanden ist,

- nicht weniger hitzeresistent gegenüber den letalen Aspekten des Behandlungsverfahrens ist, jedoch auch nicht signifikant resistenter als die Pathogenen, zu deren Überwachung er verwendet wird,
- relativ leicht zu quantifizieren sowie relativ leicht zu ermitteln und zu bestätigen ist; oder
- einem gut beschriebenen Testorganismus oder Virus während der Exposition, der in einen geeigneten Testkörper im Ausgangsmaterial eingebracht wird;

3. Mit der Validierung des in oben genannten geplanten Verfahrens muss nachgewiesen werden, dass das Verfahren folgende Gesamtrisikominderungen erreicht:

- bei thermischen und chemischen Verfahren durch:
  - Verminderung von 5 log<sub>10</sub> von *Enterococcus faecalis* oder *Salmonella Senftenberg* (775W, H<sub>2</sub>S negativ);
  - Verminderung des Infektiositätstiters von thermoresistenten Viren, wie etwa Parvovirus um mindestens 3 log<sub>10</sub> immer dann, wenn sie als relevante Gefahr ermittelt werden;
- bei chemischen Verfahren auch durch:
  - Verminderung resistenter Parasiten wie etwa Eiern von *Ascaris spp.* um mindestens 99,9 % (3 log<sub>10</sub>) der lebensfähigen Stadien;

4. Repräsentative Proben von Fermentationsrückständen bzw. Kompost, die während oder unmittelbar nach der Verarbeitung aus der Biogas- oder Kompostieranlage zur Überwachung des Verfahrens entnommen werden, müssen folgende Normen erfüllen:

- *Escherichia coli*: n = 5, c = 1, m = 1 000, M = 5 000 in 1 g oder
- *Enterococcaceae*: n = 5, c = 1, m = 1 000, M = 5 000 in 1 g; und

Repräsentative Proben von Fermentationsrückständen bzw. Kompost, die während oder unmittelbar nach der Auslagerung aus der Biogas- oder Kompostieranlage entnommen werden, müssen folgende Normen erfüllen:

*Salmonella*: in 25 g nicht nachweisbar: n = 5; c = 0; m = 0; M = 0 wobei

- n = Anzahl der zu untersuchenden Proben;
- m = Schwellenwert der Anzahl Bakterien; das Ergebnis gilt als zufriedenstellend, wenn die Keimzahl in allen Proben m nicht überschreitet;
- M = Höchstwert der Anzahl Bakterien; das Ergebnis gilt als nicht zufriedenstellend, wenn die Keimzahl in einer oder mehreren Proben größer oder gleich M ist;

- $c$  = Anzahl der Proben, bei denen die Keimzahl zwischen  $m$  und  $M$  liegen kann, wobei die Probe noch als zulässig gilt, wenn die Keimzahl in den anderen Proben  $m$  oder weniger beträgt.

Fermentationsrückstände oder Kompost, der die in diesem Kapitel genannten Anforderungen nicht erfüllt, ist erneut zu verarbeiten.

Die Anzahl der aufgeführten Gesetze und Verordnungen, die bei einer Verwertung der organischen Substanzen in einer Biogasanlage umgesetzt werden müssen, ist beachtlich. Um die geforderten Auflagen einzuhalten, sind umfangreiche anlagenspezifische Installationen wie die geforderte Hygienisierungseinrichtung sowie Mess-, Steuer- und Regeltechnik erforderlich. Dies erhöht in jedem Fall die Investitionskosten beim Bau der Biogasanlage.

Die einzuplanende Genehmigungsdauer einer neu zu errichtenden Anlage wird zudem länger als bei einer Standard - Anlage zur ausschließlichen Vergärung von landwirtschaftlichen Reststoffen und Kofermenten auf Basis nachwachsender Rohstoffe sein.

#### **2.1.4 Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG)**

Da die EG Verordnung Nr. 1774/2002 unmittelbar anwendbares Gemeinschaftsrecht ist, musste gleichlautendes oder entgegengesetztes nationales Recht aufgehoben werden; in diesem Fall das deutsche Tierkörperbeseitigungsgesetz, die Tierkörperbeseitigungsanstalten-Verordnung sowie die Futtermittelherstellungs-Verordnung. Es bedurfte gleichzeitig ergänzender nationaler Regelungen, da im EG-Recht bestimmte Tatbestände, wie zum Beispiel die Zuständigkeiten oder die zur Beseitigung Verpflichteten, nicht geregelt sind. Als Weiteres mussten die Regelungsspielräume, die die EG-Verordnung den Mitgliedsstaaten lässt, den nationalen Gegebenheiten entsprechend genutzt werden. Mit dem Gesetz zur Durchführung gemeinschaftsrechtlicher Vorschriften über die Verarbeitung und Beseitigung von nicht für den menschlichen Verzehr bestimmten tierischen Nebenprodukten ist dies erfolgt (Artikel 1 des TierNebG).

Das Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz bildet neben der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (2.1.3) den rechtlichen Rahmen für die Kategorisierung der tierischen Nebenprodukte gemäß ihrem potentiellen Risiko für die Gesundheit von Mensch und Tier.



Zur näheren Spezifizierung haben die Dienststellen der Europäischen Kommission nachfolgende Verordnungen erarbeitet:

- Verordnung (EG) Nr. 12/2005 (ANONYM, 2005a) vom 6. Januar 2005 (Übergangsmaßnahmen zum Verarbeitungsstandard für Material der Kategorie 3 und Gülle in Kompostierungs- und Biogasanlagen),
- Verordnung (EG) Nr. 79/2005 (ANONYM, 2005b) vom 19. Januar 2005 (Ausnahmemöglichkeiten für die Verfütterung von Milch – und Milcherzeugnissen der Kategorie 3),
- Verordnung (EG) Nr. 92/2005 (ANONYM, 2005c) vom 19. Januar 2005 (Durchführungsverordnung zur Verfahrenssicherheit bei der Entsorgung von tierischen Nebenprodukten der Kategorie 1, 2 und 3),
- Verordnung (EG) Nr. 93/2005 (ANONYM, 2005d) vom 19. Januar 2005 (Durchführungsverordnung für die Anforderungen zur Herstellung von Fischmehl).

Weitere Bestimmungen sind in der auf der Basis des Tierische Nebenprodukte Gesetzes erlassenen Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte- Beseitigungsgesetzes (Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung - TierNebV) enthalten. Ziel der vorliegenden Verordnung ist es die Vorgaben der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 zu konkretisieren, Ermächtigungen, die an den Mitgliedstaat adressiert sind, auszuschöpfen sowie den Geltungsbereich der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 zum nationalen Abfallrecht abzugrenzen. Darüber hinaus dient sie naturgemäß der Durchführung von Bestimmungen des Tierische Nebenprodukte- Beseitigungsgesetzes. Dementsprechend stützt sie sich auf Ermächtigungen des Tierische Nebenprodukte- Beseitigungsgesetzes, des Düngemittelgesetzes, des Tierseuchengesetzes und des Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes. Wichtig sind in diesem Zusammenhang die Bestimmungen des §3 der TierNebV, der die Verwendung von Küchen- und Speiseabfällen aus privaten Haushalten regelt (Abgrenzung zwischen Abfallrecht und Tierkörperbeseitigungsrecht). Denn für Küchen- und Speiseabfälle der Kategorie 3, die in privaten Haushaltungen anfallen und die in einer Biogas- oder Kompostierungsanlage behandelt werden, sind die Vorschriften über die Überlassung an den öffentlich-rechtlichen Entsorgungsträger im Sinne des § 13 Abs. 1 und § 15 Abs. 1 Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz sowie die Bioabfallverordnung entsprechend anzuwenden. Biogas- und Kompostierungsanlagen, in denen ausschließlich Küchen- und Speiseabfälle eingesetzt werden, bedürfen nicht der

Zulassung nach Artikel 15 Abs. 1 und 2 der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002, also hier gilt die Bioabfallverordnung. Allerdings gibt es für bestimmte Fälle tierseuchenrechtlich bedingte Einschränkungen, denn immer dann, wenn diese Küchen- und Speiseabfälle zur Verarbeitung in eine Biogas- oder Kompostierungsanlage befördert werden, die sich auf einem Betrieb mit Nutztieren befindet ist folgendes zu beachten:

- Die Küchen- und Speiseabfälle müssen vor dem Befördern in den Betrieb pasteurisiert werden.
- Die Biogas- oder Kompostierungsanlage muss sich zum Schutz vor der Übertragung von Seuchenerregern in ausreichenden Abstand von dem Bereich befinden, in dem die Tiere gehalten werden.
- Die Biogas- und Kompostierungsanlage ist von Tieren, Tierfutter und Einstreu vollständig räumlich zu trennen, um sicherzustellen, dass die Nutztiere weder unmittelbar noch mittelbar mit den genannten Abfällen in Berührung kommen.
- Die Verordnung enthält darüber hinaus für alle genannten tierischen Nebenprodukte die unter die Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 fallen differenzierte Bestimmungen.

### **2.1.5 Düngemittelverordnung (DüMV)**

Die Düngemittelverordnung (ANONYM, 2003) ist eine Verordnung über die Zulassung von Düngemitteltypen sowie Anforderung an Düngemittel, Natur- und Hilfsstoffe.

Nach der Düngemittelverordnung dürfen Düngemittel und Stoffe, die organische Bestandteile enthalten, nur dann in Verkehr gebracht werden, wenn sichergestellt ist, dass sie bei der Ausbringung nicht für die Übertragung von Krankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich gemacht werden können und keine Schäden an Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und Böden verursachen. Durch die DüMV werden aktuelle Entwicklungen im Hinblick auf die Zulassung von Düngemitteltypen sowie erforderliche rechtliche Präzisierungen einzelner Regelungen berücksichtigt (PHILIPP, 2002). Ziel der Verordnung ist unter anderem die Verwertung von Gärresten aus Anaerobanlagen als Dünger in der Landwirtschaft sicherzustellen.

## **2.2 Anaerobe Fermentation**

### **2.2.1 Definition**

Organische Substanzen lassen sich mikrobiell sowohl aerob (mit Luftzufuhr) als auch anaerob (ohne Luftzufuhr) abbauen. Aerobier wandeln ca. 50 % der abgebauten Trockensubstanz in CO<sub>2</sub> und Wasser um. Die anderen 50 % des Substrates werden zum Aufbau von Zellsubstanz genutzt. Im Anaerobprozess werden hierfür lediglich 4 % verwendet und der Rest kann für die Umwandlung in Biogas genutzt werden (BEHMEL und GLEIXNER, 1995). Bei der Entstehung von Biogas findet ein vierstufiger Abbauprozess organischer Substanzen durch verschiedene Bakteriengruppen statt. Hierbei entstehen Methan, CO<sub>2</sub> und Spurengase. Sowohl aus Eiweißen, Fetten oder Kohlenhydraten kann Methan gewonnen werden (SORLINI und BONFATI, 1989; WELLINGER et al., 1991; BEHMEL und GLEIXNER, 1995 ). In der Natur entsteht Biogas an Orten, an denen sich organische Stoffe häufen und nicht genügend Sauerstoff für den aeroben Abbau vorhanden ist (WELLINGER et al., 1991).

### **2.2.2 Der Gärprozess**

Die Biogasproduktion wird als ein anaerober Prozess bezeichnet, weil hierbei eine mikrobielle Zersetzung der organischen Substanzen unter Luftausschluss stattfindet (WELLINGER et al., 1991). Ein Gemisch verschiedener Mikroorganismen baut in mehreren Stufen Biomasse zu Biogas um. Obwohl der Vergärungsprozess anaerob ist, beinhaltet das mikrobielle System bis zu 50 % aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien. Bei so genannten Archebakterien handelt es sich um strikt anaerobe Bakterien, die sich wegen deutlicher Eigenheiten im Zellwandaufbau und Stoffwechsel von den übrigen Bakterien unterscheiden (HOBSON und SHAW, 1974; SPOELSTRA, 1983; WELLINGER et al., 1991). Das Redoxpotential ist ausschlaggebend für das Wachstum von Anaerobbakterien. Es ist ein Maß für die Tendenz von chemischen Verbindungen oder Elementen, Elektronen abzugeben oder aufzunehmen. Es wird in mVolt angegeben. Anaerobe Bakterien benötigen ein sehr niedriges Redoxpotential für ihr Wachstum. Sauerstoff hingegen besitzt ein äußerst hohes Redoxpotential (810 mV) (WELLINGER et al., 1991).

Die Biogasproduktion, bei der die organische Substanz von verschiedenen Bakteriengruppen zerlegt wird, verläuft in 4 Schritten:

#### 1. Schritt: Hydrolyse

Hierbei werden Eiweiße, Fette und Kohlenhydrate durch Exoenzyme gespalten (Hydrolysephase). Dieser erste Schritt stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Teil des Anaerobprozesses dar. Bei den Produkten, die hierbei entstehen, handelt es sich um einfache Zweier- und Einerverbindungen (Dimere und Monomere).

#### 2. Schritt: Versäuerungsphase

In diesem Schritt werden die in Schritt 1 gebildeten Mono- bzw. Dimere von Bakterien aufgenommen und weiter abgebaut. Bei den Produkten, die in diesem Abbauschritt anfallen, handelt es sich um Alkohol, Milchsäure und Karboxylsäure. Außerdem entsteht zu einem kleineren Teil auch Kohlendioxid und Wasserstoff.

#### 3. Schritt: acetogene Phase

In dieser Phase werden Butter- und Propionsäure von obligat protonenreduzierenden Bakterien zu Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid abgebaut.

#### 4. Schritt: methanogene Phase

Dies ist der entscheidende Schritt bei der Biogasproduktion, weil hier die eigentlichen Methanbakterien aus Wasserstoff, Kohlenstoff und Essigsäure Methan bilden.

### **2.2.3 Verschiedene Anlagentypen**

Die in Europa vorherrschenden Fermentertypen zur Anaerobvergärung der organischen Substanzen sind vielfältig und mit verschiedensten Güllemischeinrichtungen versehen (WELLINGER et al., 1991). Die Hauptunterscheidungsmerkmale der einzelnen Anlagen sind die Temperatur, bei der die Vergärung durchgeführt wird, der Wassergehalt, die Prozessführung, die Betriebsweise und die Technik, mit der die Reaktordurchmischung erfolgt (siehe Tabelle 1).

Ob es sich um eine Nass-, Trocken- oder Semi-Trocken-Vergärung handelt, ist abhängig vom Wassergehalt im Fermenter. Bei der Nassvergärung wird durch Rückführung von Prozesswasser eine Abfallmaische von bis zu 15 % Trockensubstanzgehalt (TS) her-

gestellt, die noch pump- und rührfähig ist. Beträgt der Feststoffgehalt hingegen zwischen 20 % und 40 % TS, handelt es sich um eine Trockenvergärung. Hierbei können viele Abfallstoffe unmittelbar mit ihrem Ausgangswassergehalt verarbeitet werden. Bei einem TS, der oberhalb 40 % liegt, treten aufgrund von Wassermangel biologische Prozessstörungen auf. Semi-Trocken-Vergärung kommt wegen der erschwerten Handhabung selten zum Einsatz.

Tabelle 1: Unterscheidungsmerkmale von Vergärungsverfahren (KERN, 1999; WEILAND, 1999)

<b>Verfahrensmerkmal</b>	<b>Verfahrensvarianten</b>		
<b>Wassergehalt im Methanreaktor</b>	Nassvergärung < 15 % TS	Semi-Trockenvergärung 15 % < TS < 20 %	Trockenvergärung > 20 % TS
<b>Temperatur</b>	psychrophil < 25 °C	mesophil 33 – 37 °C	thermophil 55 - 60 °C
<b>Prozessführung</b>	einstufig	zweistufig mit Feststoffseparierung nach 1. Stufe	zweistufig ohne Feststoffseparierung nach 1. Stufe
<b>Betriebsweise</b>	Batch	Repeated Fed Batch (Sequencing Batch)	kontinuierlich
<b>Durchmischung</b>	mechanisch	hydraulisch	pneumatisch
<b>Inputmaterialien</b>	Monovergärung		Kovergärung

Bezüglich der Betriebstemperatur von Vergärungsanlagen muss gesagt werden, dass eine psychrophile Betriebsweise (< 25 °C) nur für sehr einfache Reaktoren (Speicheranlagen) in Frage kommt, da die Vergärung hier sehr langsam verläuft. Die Abbaurate und die Gasausbeute sowie der Grad der Hygienisierung sind von der Gärtemperatur abhängig. Obwohl bei der thermophilen (55 - 60 °C) im Vergleich zur mesophilen (33 - 37 °C) Betriebsweise eine Erhöhung der Abbaurate und somit eine höhere Gasausbeute erreicht werden kann, muss berücksichtigt werden, dass ein höherer Anteil des produzierten Biogases für die Aufrechterhaltung der Betriebstemperatur benötigt wird. Somit sinkt die Nettoenergieausbeute (KERN, 1999; WEILAND, 1999).

Verschiedene Bakteriengruppen sind über mehrere Abbauschritte an der Methangärung beteiligt. Deshalb kann die Methanisierung mit ein- oder zweistufiger Prozessführung durchgeführt werden. Bei zweistufiger Betriebsweise erfolgt die Beschickung der Methanstufe entweder mit oder ohne eine Zwischenabtrennung der nicht hydrolysierten Feststoffe (WEILAND, 1999). Um eine gleichmäßige Gasproduktion und einen weitestgehend automatisierten Anlagenbetrieb zu erzielen, wird in der Regel eine kontinuierliche Prozessführung angestrebt. Bei dieser Betriebsweise werden hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt. Ein Nachteil hierbei sind mögliche Kurzschlussströmungen, bei denen Inputmaterial unmittelbar in den Reaktorablauf gelangen kann und somit die hygienisierende Wirkung des Prozesses verloren geht. Bei thermophiler Betriebsweise ist eine sichere Produkthygienisierung hingegen im diskontinuierlichen Verfahren möglich. Diese zeichnet sich durch seine verfahrenstechnische Einfachheit aus und ermöglicht einen Betrieb mit definierter Verweilzeit ohne Kurzschlussströmungen (MARTENS et al., 1999; WEILAND, 1999; WELLINGER et al., 1991).

Um unterschiedliche Phasen wie Sediment, Schwimmdecke und wässrige Gülle zu verhindern, sollte die Fermentergülle stets fließfähig sein. Es soll möglichst eine homogene Phase im Fermenter vorliegen, um auch den Bakterien viel Raum und Oberflächen von abbaubaren Substanzen zu präsentieren. Man unterscheidet im Fermenter zwischen einer aktiven Durchmischung mit Hilfe einer Rührereinrichtung und einer passiven Umwälzung durch thermische Konvektion (WELLINGER et al., 1991).

### **2.3 Übertragung von Krankheitserregern durch Sekundärrohstoffdünger**

Werden Wirtschaftsdünger (fest oder flüssig) aus Beständen mit klinisch gesunden Tieren im eigenen Betrieb verwertet besteht kein erhöhtes epidemiologisches Risiko. Jedoch können sowohl Jauche und Flüssigmist als auch Festmist aus subklinisch erkrankten Beständen Krankheitserreger enthalten. Des Weiteren existieren Mikroorganismen, die für das Tier nicht pathogen sind, sehr wohl aber für den Mensch, wie z.B. enterohämorrhagische *Escherichia coli* Stämme. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass wegen des eingeschränkten Wirtsspektrums keine Übertragung über die Umwelt aus Wirtschaftsdüngern belegt ist (BÖHM, 2005).

Bei der überbetrieblichen Verwendung von Gülle und für die Kofermentation besteht ein beachtliches epidemiologisches Risiko zur Übertragung von Krankheitserregern (HILLIGER et al., 1991). Jedoch ist bei einer intakten Bodendeckschicht > 100 cm ein Keimeintrag in das Grundwasser aus Wirtschaftsdüngern nicht zu erwarten (WEIGEL, 1995). Bei der Beurteilung der epidemiologischen Risiken muss berücksichtigt werden, ob es sich um eine Kofermentationsanlage handelt, bei der das Gärgut nur im eigenen landwirtschaftlichen Betrieb verwendet wird, oder ob sie als Güllegemeinschaftsanlage betrieben wird. PHILIPP et al. (1990) untersuchten das Vorkommen von Salmonellen in Wirtschaftsdüngern und erzielten in bis zu 4% der untersuchten Proben positive Ergebnisse.

Ein weiterer Aspekt bezüglich der epidemiologischen Risiken kommt mit der Komponente „Abfall“ dazu. ZESCHMAR-LAHL et al. (1994) wiesen in verschiedenen häuslichen Abfällen Mikroorganismen (Stapylokokken, Streptokokken, Enterobacteriaceen, Enteroviren, Aspergillen, Ascariden) nach. Darunter befanden sich auch diverse Zoonoseerreger, die sich unter den gegebenen Bedingungen im unbehandelten Material wegen des günstigen Nährstoffangebotes sogar noch vermehren können.

KÖHLER (1993) belegte die Wichtigkeit der Zusammenhänge des Eintrags von Salmonellen über Abfall in die Biozönose, indem er im Zeitraum von 1989 bis 1992 die Übertragung von *Salmonella Enteritidis* von der Deponie Schöneiche bei Berlin auf die Vogelpopulationen darstellte.

Am Institut für Epidemiologie der Bundesforschungsanstalt für Virus-Krankheiten der Tiere wurden die Ursachen der 1993 bis 1995 aufgetretenen Schweinepestausbürche in Hausschweinebeständen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass 24 % aller Primärausbürche auf infizierte Küchenabfälle zurückzuföhren sind. Meistens handelte es sich dabei um vereinzelt Ausbürche nach zu geringer oder nicht stattgefunder Erhitzung der Küchenabfälle. Zu größeren Seuchenausbreitungen kam es seltener, so z. B. 1997 in Nordrhein-Westfalen. Als Folge wurden die Hygienevorschriften verschärft und die Speiserestaufbereitungsanlagen mit hohen Kosten nachgerüstet. Die Schweinepest ist vor allem wegen der hohen Überlebensfähigkeit (Kühlfleisch 35 Tage, Gefrierfleisch 150 Tage) ihres Erregers in Küchenabfällen gefürchtet (BÖHM, 1999).

## 2.4 Substrate für Biogasanlagen

Es gibt eine breite Palette von biogenen Roh- und Reststoffen mit denen Biogasanlagen betrieben werden können. Hierfür werden die Substrate entweder einzeln oder als Gemisch mit anderen Substraten als Kofermentate eingesetzt (SORLINI und BONFANTI, 1989; STRAUCH, 1997; WELLINGER et al., 1991).

Für die Allgemeinheit liegen die Vorteile solcher Abfallverwertungsverfahren in einer emissionsarmen und hygienischen Reststoffbehandlung und dem Gewinn erneuerbarer Energien. Für den Landwirt entstehen Vorteile aus den Entsorgungserlösen, dem Energiegewinn durch die zusätzlichen Reststoffe und allgemein einer Güllebehandlung, die positive Eigenschaften für die Gülle bringt (PHILIPP und KUHN, 1998).

Mit welchem Inputmaterial beschickt wird, ist abhängig von der Anlagentechnik. Man unterscheidet zwischen Monovergärung und Kovergärung. Bei Monovergärungsverfahren werden Abfallstoffe der verschiedenen Bereiche, wie Großküchen oder Großmärkte, Kommunen, Agrar- und Lebensmittelindustrie, einzeln oder in Mischung verarbeitet. Bei der Kofermentation werden die Abfallstoffe immer gemeinsam mit einem Grundsubstrat vergoren. Hierbei handelt es sich um Flüssigmist oder vorbehandelten Festmist. Die Kovergärung zählt zur Gruppe der Nassvergärungsverfahren (KERN, 1999; WEILAND, 1999; WELLINGER et al., 1991; SCHOLWIN et al., 2004).

Abfälle, die aufgrund ihrer Zusammensetzung als Einzelstoff schlecht oder gar nicht vergärbar sind, können jedoch in Kofermentationsanlagen verarbeitet werden. Meist handelt es sich um ein Gemisch aus maximal 30 % außerlandwirtschaftlichen Abfällen (z. B. Speiseabfälle) und 70 % Rinder- bzw. Schweinegülle.

Es muß darauf geachtet werden, dass der Trockensubstanzgehalt des Gemisches 12 % nicht übersteigt. Vergleicht man die Vergärung mit der Kompostierung so kann festgestellt werden, dass bei der Vergärung eine größere Auswahl an Inputmaterialien zur Verfügung steht, die verarbeitet werden können (KERN, 1999; WEILAND, 1999). Im Anhang 1 der Bioabfallverordnung sind Bioabfälle gelistet, die in landwirtschaftlichen Vergärungsanlagen als Kofermente zum Einsatz zugelassen sind. Es handelt sich hierbei z. B. um Glycerin, Küchen- und Speiseabfälle, Abfälle aus der Biotonne, pflanzliche und tierische



Fette, Teigwaren, Kartoffelschälabfälle, Futtermittelabfälle, Getreideausputz, Obst- und Gemüseabfälle, Grünschnitt und Landschaftspflegegrün (ANONYM, 1998).

Im August 2004 begann mit der Novellierung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) (ANONYM, 2004a) ein neuer Boom in der Biogasbranche. Um Steigerungen der Biogaserträge zu erlangen, nutzen moderne Anlagen heute immer weniger Gülle, stattdessen mehr und mehr Kofermentate wie nachwachsende Rohstoffe (NaWaRos) oder Speisereste.

## 2.5 Indikatororganismen

Der Begriff „Indikatororganismus“ wird für die im Zusammenhang mit der Prozesskontrolle stehenden Untersuchungen verwendet. Zur Überprüfung der Hygienisierungswirkung eines biologischen Prozesses werden bestimmte, weniger pathogene Keime in das System eingebracht, nach einer festgelegten Zeit wieder entnommen und auf ihre Reduktion bzw. völlige Inaktivierung untersucht. Diese Keime sollten bzgl. ihrer Tenazität den eigentlich zu untersuchenden Keimen überlegen sein. Ihre Inaktivierung steht in einem bekannten Verhältnis zur Tenazität der pathogenen Keime, deren Inaktivierung über die Indikatororganismen überprüft werden soll (BRAUMILLER, 2000; STÖCKLEIN, 2005). Indikatororganismen sollten nativ im zu untersuchenden Material vorkommen und sich möglichst schnell und einfach sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisen lassen (SOLDIERER, 1991).

Es wurde bisher im Anhang 2 der BioAbfV *Salmonella Senftenberg* W775 H<sub>2</sub>S negativ als Prüforganismus für die direkte Prozessprüfung zur Überprüfung der „seuchenhygienischen Wirksamkeit“ von Verfahren zur Kompostierung oder Anaerobbehandlung gefordert. Da es jedoch keinen uneingeschränkt universellen Prüforganismus bzw. Indikatororganismus gibt, wurden in der Vergangenheit mögliche Alternativorganismen auf ihre Praxistauglichkeit und deren Einsatz in Anaerobanlagen hin überprüft.

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand daher zunächst die vergleichende Untersuchung der Überlebensfähigkeit ausgewählter Mikroorganismengruppen in halb-technischen sowie in Praxisanlagen.

### 2.5.1. Salmonellen

Salmonellen sind 2 - 3 µm lange, plumpe, gramnegative, sporenlöse, bewegliche, peritrich begeißelte Stäbchen, die morphologisch untereinander und von anderen gramnegativen Darmbakterien nicht zu unterscheiden sind. Die endgültige Zuordnung kann erst auf dem Weg über die Antigenanalyse erreicht werden. Maßgeblich sind hierfür die bei Salmonellen vorhandenen O- und H-Antigene. Ein zusätzliches Hüllenantigen (K-Antigen), welches die O-Agglutination stören kann, weisen nur die menschenpathogenen Serovare *Salmonella Typhi* und *Salmonella Paratyphi C*, bekannt unter der Bezeichnung Vi-Antigen, auf (SELBITZ, 2002).

Zu einer Kontamination der Umwelt kommt es durch Salmonellen-Ausscheider bei Haus- und Wildtieren. Eine weitere Kontaminationsquelle stellen städtische und auch teilweise industrielle Abwässer dar. Durch landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm, Abwasser oder Fäkalien oder durch Überflutung von Weideflächen kommt es zur Kontamination des Bodens und damit auch der dort wachsenden Pflanzen mit nachfolgender Infektion der örtlichen Fauna (Insekten, Vögel, Nagetiere) sowie der landwirtschaftlichen Nutztiere (STRAUCH, 1987; BÖHM, 1993; DEDIE et al., 1993; ISLAM et al., 2004).

Salmonellosen sind weltweit verbreitet und spielen vor allem in Ländern mit intensiver Tierhaltung eine wichtige Rolle. Neben den häufig vorkommenden latenten Infektionen tritt die Salmonellose klinisch in Erscheinung als Enteritis verschiedener Ausprägung, als Septikämie (besonders bei Jungtieren), als Abort und als Organerkrankung.

Die wirtschaftliche Bedeutung ist im Allgemeinen nicht so groß, wie man bei dem Durchseuchungsgrad mancher Tierbestände und der Verbreitung der Erreger in der Außenwelt und in Futtermitteln annehmen möchte, sie kann jedoch in großen Tierhaltungen schwerpunktartig erhebliche Verluste durch akute Erkrankungen verursachen. Sekundäre Verluste können zum Beispiel durch fleischhygienerechtliche Beanstandungen auftreten (SELBITZ, 2002).

Aufgrund ihres Vorkommens in Tierbeständen und Lebensmitteln stellen Salmonellen ein hohes Infektionsrisiko für den Menschen dar. Dadurch ist die Salmonellose in Deutschland immer noch die häufigste durch kontaminierte Lebensmittel verursachte Darmer-

krankung des Menschen (BUROW, 1998; ERICHSEN und ULLMANN, 1994; GERICKE et al., 1999; HARTUNG, 1993; MEYER et al., 1993; SCHROETER et al., 1991).

Klinisch und ätiologisch lassen sich die Salmonellosen des Menschen in zwei Gruppen einteilen:

Typhus, Paratyphus (Allgemeininfektion):

Inkubationszeit durchschnittlich 14 Tage, Infektionsdosis relativ gering ( $10^3$  Keime/g).

Erreger: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A*, *B* und *C*.

Gastroenteritische Salmonellosen (Brechdurchfall, im Dünndarm lokalisiert, ohne Septikämie):

Inkubationszeit kurz (18 Stunden bis 3 Tage), Infektionsdosis groß (mindestens  $10^6$  Keime/g). Erreger: alle übrigen *Salmonella*-Serovare.

Die Infektion erfolgt fast ausschließlich auf oralem Wege (Nahrungsmittelinfektion). Bei gastroenteritischen Salmonellosen treten nach kurzer Inkubationszeit (siehe oben) Magen-Darm-Erscheinungen mit Erbrechen, Durchfall und hohem Fieber auf.

Die Erkrankung setzt im Gegensatz zum Typhus plötzlich ein und dauert meistens nur wenige Tage. Das klinische Bild wird weitgehend von Intoxikationserscheinungen beherrscht. Die Letalität ist bei unkompliziertem Verlauf gering, ausgenommen bei alten Leuten und Kindern (SELBITZ, 2002).

Es wurden mit 13 verschiedenen Salmonellenserovaren aus 9 verschiedenen Serovaren von SOLDIERER und STRAUCH (1991) Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde die Hitzeresistenz in Gülle überprüft. Es konnte festgestellt werden, dass *Salmonella Senftenberg W775* im Vergleich zu den restlichen 12 Stämmen wesentlich resistenter gegenüber Hitze ist. Aufgrund dieser Eigenschaft eignet sich dieser Keim als Prüforganismus, da alle anderen Stämme bereits inaktiviert sind, bevor *Salmonella Senftenberg* eliminiert werden kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass dieser Stamm nicht infektiös ist und somit unbedenklich für die Umwelt.

### 2.5.2 *Escherichia coli* (Fäkalcoliforme)

*Escherichia coli* ist ein plumpes gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchen mit abgerundeten Enden, es ist 2 - 6 µm lang und 1 - 1,5 µm breit. Die meisten Stämme bilden eine Kapsel und sind durch peritriche Begeißelung beweglich, auch unbewegliche Stämme kommen vor. *Escherichia coli* stellt keine besonderen Ansprüche an das Substrat und wächst auf allen gebräuchlichen Nährböden bei einer Temperatur von 30 – 37 °C (SELBITZ, 2002).

Der Gattung *Escherichia* gehört als wichtigster Vertreter die Spezies *Escherichia coli* an. *Escherichia coli* wurde erstmals von dem Kinderarzt ESCHERICH im Jahre 1885 aus dem Stuhl menschlicher Säuglinge nachgewiesen. *Escherichia coli* ist ein normaler Bewohner des Dickdarms von Mensch und warmblütigen Tieren, mit Ausnahme von Meerschweinchen und Chinchilla. Der Anteil von *Escherichia coli* an der aeroben und anaeroben Gesamtdarmflora beträgt im Zustand der Eubiose nicht mehr als 1 %, die Keimzahl variiert bei den verschiedenen Tierarten zwischen  $> 10^4$  KBE/g bis  $< 10^9$  KBE/g Darminhalt oder Kot. *Escherichia coli* repräsentiert gemeinsam mit den Enterokokken die Begleitflora. Vor allem bei Jungtieren können jedoch enterotoxische oder enterotoxämische Enteropathien oder Septikämien auftreten. Der Nachweis der Mikroorganismen im Trinkwasser oder Nahrungsmitteln wird als Indikator für fäkale Verunreinigung gewertet und gilt daher als Maßstab für die Hygiene (SELBITZ, 2002). Auch nach GEWECKE und KÜNZEL (1989) besitzen *Escherichia coli* und Salmonellen humanhygienisch als Indikatororganismen bei der Bioabfallkompostierung die größte Relevanz. Man begnügt sich häufig mit dem Nachweis coliformer Bakterien, da der exakte Nachweis von *Escherichia coli* laut FARMER und BRENNER (1977) mit großem Aufwand verbunden ist.

### 2.5.3 *Enterococcus faecalis*

Dieser Gruppe im Darm von Menschen und Tieren vorkommender Bakterien wurde innerhalb der Gattung *Streptococcus* lange eine gewisse Sonderstellung eingeräumt, bis sie als eigene Gattung abgetrennt wurde (SELBITZ, 2002).

Enterokokken findet man in Abwässern, im Kot von Mensch und Tier, in Futtermitteln und auf Pflanzen. Diese Tatsache erschwert epidemiologische Untersuchungen bei Infektionen von Mensch und Tier. Die Therapie von Enterokokkeninfektionen beim Menschen gestaltet sich oftmals schwierig und stellt deshalb ein ernstzunehmendes Problem dar (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994; DEDIE et al., 1993; HAHN et al., 1970).

Der Übertragungsweg ist aerogen, alimentär oder durch Wund- und Schmierinfektionen. Innerhalb der Gattung *Enterococcus* bilden die Enterokokken (D-Streptokokken, Fäkalstreptokokken) eine Gruppe mehrerer Spezies, die sich durch ihre auffallenden biologischen Eigenschaften, ihren abweichenden Zellwandaufbau und ihr ubiquitäres Vorkommen von den anderen Streptokokken abheben. SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) schlugen vor, *Streptococcus faecalis* und *faecium* dem Genus *Enterococcus* zuzuordnen. Es wurden Stämme aus Streichkäse isoliert, was zur Einführung der serologischen Gruppe D durch *Lancefield* 1933 führte (HAHN et al., 1970; SELBITZ, 1992).

Nach WESTPHAL und CHRISTENSEN (1983) werden sie als widerstandsfähiger gegenüber mesophilen Temperaturen und hohen pH-Werten eingestuft als Salmonellen, coliformen Keimen, Pseudomonaden und Viren. Des Weiteren konnte in zahlreichen Laboruntersuchungen die große Thermoresistenz der Fäkalstreptokokken nachgewiesen werden. 30 minütiges Erhitzen bei 60 °C wurde ebenfalls überstanden (SELBITZ, 2002; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994; HOFERER, 2001).

Sowohl Enteritis, Pneumonie, Septikämie, Urogenitalinfektionen, bakterielle Endokarditis als auch Meningitis, Wund- und Hautinfektionen werden durch Fäkalstreptokokken hervorgerufen. Bakterielle Endokarditiden werden bei Schweinen, Pferden, Meer-schweinchen und Kaninchen beschrieben. Meist werden hierbei *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus durans* nachgewiesen (SELBITZ, 2002; DEDIE et al., 1993; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994).

#### **2.5.4 *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis***

JOHNE und FRONTHINGHAM beschrieben 1895 erstmals den Erreger bei einer Kuh mit chronischer Enteritis. Die Autoren nahmen an, dass es sich bei dem beschriebenen Fall um eine besondere Form der Darmtuberkulose handelt. Elf Jahre später konnte jedoch

die Eigenständigkeit dieser Erkrankung erkannt werden (BANG, 1906). Man bezeichnete das Krankheitsbild als „*Enteritis chronica bovis pseudotuberculosis*“.

*Mycobacterium paratuberculosis* ist ein säurefestes, unbewegliches, schwach grampositives Stäbchen von 0,3-2 µm Breite und 0,3-0,5 µm Länge (BISPING und AMTSBERG, 1988). Die Zellwand besteht aus einer äußeren Peptidglykanschicht, es folgt eine Schicht mit langkettigen Fettsäuren, die mit Arabinogalaktan gekoppelt sind. Eine Schicht aus Peptidoglycolipiden schließt die Zellwand nach außen ab (CLARKE, 1997). Das Lipoarabinomannan ist ein Glycolipid, welches in der Zellmembran verankert ist und von dort aus in die Zellwand reicht (BRENNAN und NIKAIDO, 1995).

Das extrem langsame, mycobactinabhängige Wachstum ist charakteristisch für *Mycobacterium paratuberculosis*. Alle Mycobacterien mit Ausnahme von *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium paratuberculosis* können Mycobactin in vitro synthetisieren. Bei Mycobactin handelt es sich um ein zellwandassoziiertes Siderophor. Auf festen Nährböden werden sichtbare Kolonien erst nach 8-12 Wochen erwartet (LAMBRECHT et al., 1988). Das eidotterhaltige Medium nach Herrold (Herrold's egg yolk medium) wird als Standardnährboden für die Anzucht von *Mycobacterium paratuberculosis* angesehen (MERKAL et al., 1968).

*Mycobacterium paratuberculosis* wird in die Ordnung der *Actinomycetales* und in die Familie der *Mycobacteriaceae* eingereiht. Aufgrund biochemischer Charakteristika wird der Erreger als eine weitere Subspezies (ssp.) von *Mycobacterium avium*, neben *Mycobacterium avium ssp. silvaticum* und *Mycobacterium avium ssp. avium*, klassifiziert (*Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*) (THOREL et al., 1990). In Europa wird, im Gegensatz zu den USA, diese Klassifizierung bevorzugt. In den USA wird *Mycobacterium paratuberculosis* als eigene Spezies angesehen (SWEENEY, 1996).

Die Infektion erfolgt oral. So gelangen die Erreger in den Darm, wo sie durch die M-Zellen im Darmepithel der Peyer'schen Platten die Darmschleimhaut überwinden (CHIODINI et al., 1984; MOMOTANI et al., 1988). Anschließend erfolgt die Aufnahme in sub- und intraepitheliale Makrophagen. Hier können die Erreger lange überleben und sich vermehren. Zum Absterben der Makrophagen kommt es durch das intrazelluläre Wachstum von *Mycobacterium paratuberculosis*. Anschließend erfolgt eine weitere Phagozytose. Es

kommt dadurch in diesem Bereich zu einer chronisch katarrhalischen Entzündung begleitet von Hyperplasie (MERKAL et al., 1970). Die Infektion breitet sich im Dünndarm aus und befällt großflächigere Regionen sowie angrenzende Körperbereiche wie Leber, Niere und Milz. Es kommt zu einer Enteropathie mit Proteinverlust und schließlich zur Hypoproteinämie. Später werden die überfüllten epitheloiden Zellen ins Darmlumen abgestreift und die Mycobakterien werden mit dem Kot ausgeschieden. Im Kot finden sich Zellzahlen von  $10^8$  Zellen/g Kot bzw.  $10^{12}$  Zellen/Tag (CHIODINI et al., 1984).

Mit zwei bis fünf Jahren hat die Paratuberkulose eine lange Inkubationszeit. Sie verläuft meist subklinisch jedoch mit intermittierender Erregerausscheidung. Man kann drei klinische Stadien unterscheiden:

1. Subklinisches Stadium ohne klinische Symptome und ohne Erregerausscheidung
2. Stadium der intermittierenden Erregerausscheidung mit dem Kot oder der Milch
3. Klinische Erkrankung mit zuerst intermittierenden, später anhaltenden, therapieresistenten Durchfällen mit fortschreitender Abmagerung.

Die Tiere zeigen jedoch ein ungestörtes Allgemeinbefinden mit erhaltener Fresslust, deshalb ist in diesem Stadium eine Verdachtsdiagnose leicht zu stellen (SWEENY et al., 1992; TAYLOR et al., 1981).

Es handelt sich bei dem Erreger der Paratuberkulose um ein sehr resistentes Bakterium, das in der Außenwelt sehr lange überlebensfähig ist. In Mist und Gülle beträgt die Überlebensdauer bis zu 9 Monaten (GAY und SHERMAN, 1992; JÖRGENSEN, 1977). Noch nach 11 Monaten kann der Erreger im Weidekot infizierter Rinder nachgewiesen werden (ROSENBERGER, 1978). Die Nachweisdauer noch lebender Mykobakterien beträgt im Boden 11 Monate und im Wasser 17 Monate (GAY und SHERMAN, 1992). Ein saurer pH-Wert im Boden begünstigt die Überlebensdauer (RICHARDS, 1988). Jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob ein Zusammenhang zwischen saurem pH-Wert und einer erhöhten Prävalenz für Paratuberkulose besteht (JOHNSON-IFEARULUNDU und KANEENE, 1997).

Mykobakterien können eine bis zu 47 Monate anhaltende Austrocknung überleben, jedoch genügt direkte Sonneneinstrahlung über 100 Stunden um den Erreger abzutöten (GAY und SHERMAN, 1992). Es stehen nur wenige wirksame Desinfektionsmittel zur

Verfügung. Wenn sich der Erreger im Kot befindet, kann nur durch eine Erhitzung des Kotes bzw. der Gülle eine zuverlässige Desinfektion erreicht werden.

Im Vordergrund der Paratuberkulose steht die Erregerausscheidung mit dem Kot. Erkrankte Rinder scheiden ca.  $10^8$  KBE/g Kot aus (CHIODINI und HERMON-TAYLOR, 1993). Auch subklinisch infizierte Tiere scheiden intermittierend Erreger mit dem Kot aus (COLLINS, 1996). In dieser subklinischen Phase gestaltet sich der Erregernachweis durch die kulturelle Anzucht schwierig, da die Anzahl der ausgeschiedenen Mykobakterien gering ist (GAY und SHERMAN, 1992). Die Anzahl der mit dem Kot ausgeschiedenen Erreger bewegt sich in dieser Phase zwischen  $10^1$  bis  $10^2$  Erreger/g Kot (WHITLOCK et al., 1994).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Erregerübertragung ist die Ausscheidung der Mykobakterien über Kolostrum und Milch, weil etwa ein Drittel der klinisch erkrankten Kühe *Mycobacterium paratuberculosis* mit der Milch ausscheiden (TAYLOR et al., 1981). Untersuchungen ergaben, dass der Erreger über hämatogene und/oder über lymphogene Infektionswege in das Euter und benachbarte Lymphknoten gelangt. Diese Tatsache erfordert die Fütterung von Kälbern mit Milchaustauscher beim Vorliegen von Paratuberkulose im Betrieb, weil die Infektion der Tiere vor allem postnatal durch Aufnahme der Erreger im Kälberalter über erregerhaltiges Kolostrum oder kotverschmierte Zitzen erfolgt. Es steht fest, dass Tiere, die mit dem Kot Erreger ausscheiden, Weiden, Wasserstellen und Futter kontaminieren und dass auch der Landwirt selbst als Vektor fungiert, indem er die Umgebung der Kälber mit *Mycobacterium paratuberculosis* kontaminiert (SWEENEY, 1996). Des Weiteren spielt auch die intrauterine Infektion eine Rolle (SEITZ et al., 1989).

### **2.5.5      *Bacillus globigii***

Der Gattung *Bacillus* gehören 34 Arten stäbchenförmiger, grampositiver Mikroorganismen an, die strikt aerob oder fakultativ anaerob wachsen und jeweils eine Endospore bilden. Nur eine Art ist für Tier und Mensch primär pathogen, nämlich *Bacillus anthracis*, der Erreger des Milzbrandes. Zusammen mit anaeroben Sporenbildnern beteiligen sie sich in vielfältiger Weise an der Umsetzung der organischen Substanz, besonders in den obersten Bodenschichten. Einige Keime zeigen antagonistische Wirkung gegenüber



anderen Mikroorganismen. Deswegen werden sie zur Gewinnung bestimmter Antibiotika verwendet (SELBITZ, 2002).

Bazillen sind oft in großer Zahl in Futtermitteln enthalten. Unter günstigen Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit) keimen sie aus, können durch Zersetzung von Eiweiß Verderb verursachen und durch Anhäufung toxisch wirkender Stoffwechselprodukte nach der Verfütterung an landwirtschaftliche Nutztiere Leistungsdepressionen und Erkrankungen herbeiführen. Allerdings verursachen *Bacillus subtilis* oder *Bacillus licheniformis*, wenn überhaupt, nur Mastitiden mit mildem Verlauf. Selektierte Stämme von ihnen werden als Bioregulatoren der Darmflora mit Erfolg eingesetzt (SELBITZ, 2002).

Die Universität von Kalifornien führte 1998 in Los Alamos Versuche mit *Bacillus globigii* durch. Man machte sich hierbei zu Nutze, dass es sich um einen apathogenen Keim handelt, der leicht anzuzüchten ist und sich unverwechselbar in orangenen Kolonien auf den Agarplatten darstellt. Hierbei wurden Versuche zur Verbreitung durch die Luft durchgeführt und konnte dadurch Rückschlüsse auf das Verhalten von *Bacillus anthracis* ziehen.

#### **2.5.6 *Campylobacter jejuni***

Es handelt sich hierbei um schlanke, nicht sporenbildende, schraubig gedrehte Stäbchen. Sie führen charakteristische kornenzieherartige Bewegungen aus und sind gramnegativ. Mit Hilfe von Geißeln sind sie aktiv beweglich. Sie sind anspruchsvoll und benötigen mikroaerophile Bedingungen für ihr Wachstum (SELBITZ, 2002). Zur Infektion kommt es durch kontaminiertes Geflügel- aber auch Schweinefleisch, durch Milch und Trinkwasser (WHO, 1986).

Vögel stellen das natürlich Reservoir von *Campylobacter* dar und können deshalb ubiquitär in der Umwelt, besonders im Wasser, angetroffen werden (SELBITZ, 2002).

*Campylobacter* zählen zu den bedeutendsten Erregern bakterieller Durchfallerkrankungen und sind hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens und ökonomischen Bedeutung den Salmonellosen gleichzusetzen (SKIRROW und BLASER, 1992). *Campylobacter jejuni* wird als Erreger der *Campylobacter*-Enteritis des Rindes angesehen. Es handelt sich hierbei um eine hochkontagiöse Erkrankung mit profusem Durchfall, hoher Morbidität aber nur geringer Mortalität. Die Krankheit tritt im Winter bei Stallhaltung auf. Der Erreger wird

sowohl mit dem Kot kranker und äußerlich gesund erscheinender Tiere ausgeschieden und im Stall verbreitet. Die Ansteckung erfolgt durch Aufnahme von verunreinigtem Futter und Wasser (SELBITZ, 2002). *Campylobacter* ist auch oftmals die Abortursache bei Rindern und Schweinen.

### **2.5.7 Phage T1**

Schon 1917 fand F. D'HERELLE eine „Mikrobe“, die Kulturen von Dysenterie-Shigellen lysierte, Chamberland-Porzellanfilter passierte und noch in millionenfacher Verdünnung Löcher in einem Bakterienrasen verursachte. Aus dem Auftreten solcher „Plaques“ schloss D'HERELLE auf eine mikrobielle und nicht auf eine chemische Ursache. Die Beschreibung D'HERELLE'S gipfelte in dem Satz: „Die Anti-Dysenterie-Mikrobe ist ein obligater Bakteriophage.“ Phagen sind Bakterienviren. Viren sind obligate „intrazelluläre Parasiten“, die entweder DNA oder RNA als genetisches Material enthalten. Sie sind von den Stoffwechsellleistungen der infizierten Zellen abhängig, um sich zu vermehren und neue infektiöse Viruspartikel bilden zu können. Bakterienviren erfüllen alle Kriterien dieser Virusdefinition. Sie unterscheiden sich von allen anderen Viren durch ihren Wirtsbereich. Sie infizieren allein Bakterien und vermehren sich natürlicherweise nur in diesen.

Anders als ihre Wirtszellen, die durch Verdopplung ihrer Bestandteile wachsen und sich dann zweiteilen, gibt es bei Bakterienviren keine Größenzunahme der Partikel. Die Infektion des Bakteriums durch ein Bakterienvirus erfolgt in der Regel so, dass das Kapsid außen verbleibt und meist nur die Virusnukleinsäure in die Zelle gelangt. Während ihrer Vermehrung sind Bakterienviren abhängig von Stoffwechselprodukten (z. B. Aminosäuren, Nukleotiden) als Ausgangsstoffe, aber auch von tRNAs, Ribosomen und Enzymen ihres Wirts. Das unterscheidet sie auch von den kleinsten zellulären Organismen wie Mykoplasmen oder anderen intrazellulären Parasiten, wie Rickettsien und Chlamydien, die alle sowohl RNA als auch DNA enthalten, wachsen und sich durch Zweiteilung vermehren (KLAUS et al., 1992).

Obwohl der T1-Phage nach der Nummerierung durch M. DELBRÜCK der erste Vertreter der T-Phagen ist, liegt über dieses Virus ein ähnlich geringer Wissensstand vor wie über Phage T5. Nur wenige Gruppen haben sich mit dem Studium dieser Phagen befasst, und möglicherweise existiert vor Phage T1 eine gewisse „Furcht“, da dieser Phage angeblich sehr leicht die Laboratorien kontaminieren soll (KLAUS et al., 1992).

Der T1 Phage ist weder mit T5 Phage noch mit anderen Vertretern der T-Phagen verwandt. Morphologisch ist das Virion nicht vom Phagen  $\lambda$  zu unterscheiden. Der ikosaedrische Kopf hat Abmessungen von 55 x 60 nm, der flexible, nichtkontraktile Schwanz ist 150 nm lang. Die Infektion permissiver Zellen unter Standardbedingungen führt nach einer Latenzzeit von nur 15-20 Minuten zu einem Ertrag von 60-100 Nachkommen/Zelle. Neben vielen *Escherichia coli*-Stämmen können auch verschiedene Stämme von *Shigella* als Wirte dienen (KLAUS et al., 1992).

### 2.5.8 *Ascaris suum*

Der Schweinespulwurm, *Ascaris suum*, gehört zur Klasse der Nematoden. Er kommt im Dünndarm von Schweinen vor. Die Weibchen legen täglich 0,2 – 2 Mio. Eier ab. Diese sind 65 – 85  $\mu\text{m}$  x 40 – 60  $\mu\text{m}$  groß, braun und dickschalig und gelangen mit dem Kot in die Außenwelt (BOCH und SUPPERER, 1992).

Unter optimalen Laborbedingungen sind die Eier frühestens nach 24 Tagen infektiös, im Freien hingegen erst nach 30 bis 40 Tagen. Der neue Wirt infiziert sich oral. Wenige Stunden nach der oralen Aufnahme schlüpfen die Larven im Magen und bohren sich durch die Darmwand in die Mesenterialvenen ein und gelangen so nach ca. sechs Stunden in die Leber. Über eine Zeitdauer von 4 bis 6 Tagen findet eine Wanderung der Larve im Leberparenchym statt. Hierbei entstehen Narben, die sich durch Verkalkung bei der Schlachtung als die so genannten „milk spots“ darstellen. Nach dieser Wanderung gelangen die Larven durch die Lebervene, Hohlvene und das rechte Herz in die Lunge. Im Bereich der Lungenkapillaren bohren sie sich nach ihrer Entwicklung zur Larve IV in die Alveolen ein. Von hier gelangen sie passiv über Bronchien und Trachea zum Pharynx, werden abgeschluckt, siedeln sich im Dünndarm an und häuten sich hier zum adulten Wurm (BOCH und SUPPERER, 1992). Adulte Würmer verursachen Enteritiden und Anämien.

Ihre dreischichtige Schale macht die Askarideneier in der Außenwelt sehr widerstandsfähig gegenüber vielen Umwelteinflüssen. Ihre hohe Chemoresistenz verleiht den Eiern die innere Schicht (75 % Lipid und 25 % Protein). Auch 10 %-iges Formalin können sie dadurch überleben. In Gülle bleiben Askarideneier bei 8 – 18 °C ca. 65 – 85 Tage

lebensfähig. Wohingegen sie sehr empfindlich auf Austrocknung reagieren. Bei 55 – 56 °C findet innerhalb von 10 Minuten eine Inaktivierung statt (SCHNIEDER, 2000).

Eine pH-Wert-Erhöhung auf >12 reicht kurzfristig alleine nicht aus um Spulwurmeier zu inaktivieren (STRAUCH und BERG, 1980). Es wird zusätzlich eine Temperaturerhöhung benötigt. In Rindergülle konnten Tenazitäten von 50 Tagen (LOCHER, 1954), von 85 Tagen (LIEBMANN, 1967) und von 88 Tagen (ENIGK et al., 1975) nachgewiesen werden.

HERTWIG (2004) fand in seinen seuchenhygienischen Untersuchungen bei der Trocknung und Pelletierung von Klärschlamm heraus, dass bei der solaren Trocknung von Klärschlamm, auf über 94% Trockensubstanzgehalt, eine vollständige Inaktivierung von Spulwurmeiern stattfindet, wo hingegen bei einer Trocknung mit Standardtrocknungsregime bis zu einem Trockensubstanzgehalt von 75% eine anschließende Nachlagerung über 6 Wochen erforderlich ist.

SCHIRM (2005) entwickelte eine Methode zur Bioabfallhygienisierung mit Branntkalk. Mit dieser Methode konnte die Entwicklungsfähigkeit von Askarideneiern mit einer Kalkmenge von 0,45 kg pro kg Trockensubstanz und einer Lagerung des Substratgemisches von zwei Monaten in Klärschlamm ausreichend reduziert werden.

## **2.6 Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in Anaerobreaktoren**

In der Vergangenheit wurden am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim verschiedene Möglichkeiten untersucht, wie man die reale Aufenthaltszeit des Beschickungsmaterials in Anaerobreaktoren bestimmen kann. Zur Beurteilung der hygienisierenden Wirkungsweise von kontinuierlichen anaeroben Behandlungsverfahren ist die Kenntnis der Mindestverweilzeit (realen Aufenthaltszeit) der zu behandelnden Abfälle in Fermentern von großer Bedeutung und daher unverzichtbar. Es sollte eine Möglichkeit erarbeitet werden, in der man dem Inputmaterial eine Substanz bzw. Gegenstände beimischt, die dann nach einer gewissen Zeit am Output wieder nachgewiesen werden können und dadurch eine klare Aussage über die Verweildauer des Materials im Reaktor gemacht werden kann. Es wurden Varianten mit zerschnittenen Strohhalmen untersucht, ergänzt durch Trinkhalme mit verschiedenen Farben, des

Weiteren auch Blähton in verschiedenen Größen und unterschiedlichem spezifischem Gewicht. Auch chemische Tracer wurden in Erwägung gezogen (BÖHM et al., 2002).

Als biologische Tracer standen Sporen von *Bacillus globigii* zur Diskussion. Sporen dieses „Prüfbakteriums“ kommen natürlicherweise nicht in den biologischen Substraten vor, sie sind apathogen für Mensch und Tier, verhalten sich im Faulraummilieu so wie andere Bakterien auch, allerdings mit dem Vorteil, dass sie die üblichen Prozesseinwirkungen in Anaerobanlagen überstehen und problemlos nachweisbar sind. Eine Sporensuspension von *Bacillus globigii* sollte während eines Beschickungsintervalls mit Substrat in den Fermenter zugegeben werden. Dabei ist darauf zu achten, dass genügend Sporensuspension beigemischt wird, um im Austrag (Outputmaterial) die Sporenbildner unter Berücksichtigung der Verdünnung im Fermenter noch nachweisen zu können.

Mit biologischen Tracern wie *Bacillus globigii*, wird die Möglichkeit des natürlichen Verhaltens (Adsorption an Partikeln, frei schwebend in der Flüssigphase) von Mikroorganismen in Anaerobanlagen simuliert, wobei damit die Aufenthaltszeit von seuchenhygienisch relevanten Bakterien und auch Viren wiedergespiegelt werden kann. Als unabdingbare Voraussetzung für die Anwendung eines biologischen Tracers muss dessen Stabilität stehen (daher Sporenbildner, der die Prozesseinflüsse sowohl im thermophilen Temperaturbereich der Anaerobanlagen als auch die Pasteurisierung übersteht) sowie dessen native Abwesenheit in den zu behandelnden biologischen Abfällen.

Bei Verfahren, die nicht nach dem Prinzip des „batch-Betriebes“ arbeiten, d. h. mehr oder weniger kontinuierlich beschickt werden, ist zur sicheren Beurteilung der seuchen- und phytohygienischen Wirksamkeit von Behandlungsanlagen die ermittelte Angabe zur kürzesten Aufenthaltszeit von Flüssigkeiten oder der Festphase in den Anlagen in Abhängigkeit der jeweils angewandten Inputmaterialien eine unabdingbare Forderung, weil sonst die für eine Inaktivierung der Krankheitserreger relevante Einwirkungsdauer von Temperatur und keimabtötenden Kofaktoren zur Beurteilung des Prozesses fehlt.

Die Mindestverweilzeit (reale Aufenthaltszeit) ergibt sich aus der Zeitspanne zwischen der Zugabe der *Bacillus globigii* Sporensuspension und der letzten Probe ohne Befund vor dem erstmaligen Nachweis des biologischen Tracers im Austrag des Fermenters.

### **3 Material und Methoden**

Die seuchenhygienisch-mikrobiologischen Untersuchungen wurden in den verschiedenen Labor- und Praxisanlagen im Jahr 2002 durchgeführt. Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, die Tenazität der Prüforganismen durch die physikalischen Einflussfaktoren während der anaeroben Vergärung und der Pasteurisierung testen zu können.

Die genaue Beschreibung der zu untersuchenden Anlagen sowie durchgeführten Untersuchungen befinden sich in den folgenden Kapiteln 3.1; 3.2; 3.3 und 3.4.

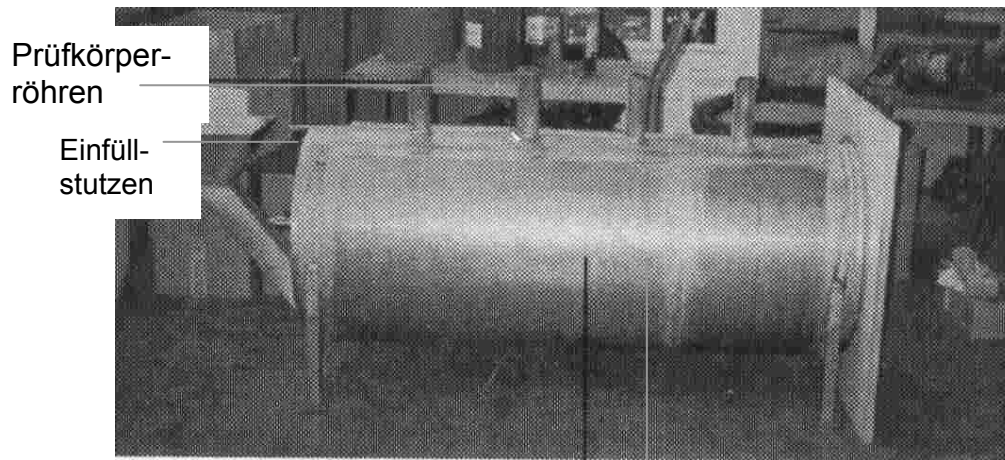
#### **3.1 Untersuchungen an halbtechnischen Anlagen und an einer Pasteurisierungseinheit (PE)**

Für die Untersuchungen im halbtechnischen Maßstab wurden zwei Versuchsansätze gewählt, die den jeweiligen unter praktischen Bedingungen gebräuchlichen Verfahrensablauf reflektieren. Mesophil betriebene Reaktoren werden häufig in Kombination mit einer Vorpasteurisierung betrieben, thermophil gefahrene Anlagen mit einer ausreichend langen realen Aufenthaltszeit für das Substrat können nach den derzeitigen rechtlichen Regelungen auf eine Pasteurisierungsstufe verzichten. Beim ersten Ansatz wurden die Untersuchungen an einer anaeroben Laborvergärungsanlage durchgeführt, im zweiten Ansatz an einer Pasteurisierungseinheit.

##### **3.1.1 Anaerobe Vergärungsanlage**

Der für die Untersuchungen verwendete einstufige Biogasreaktor wurde von der Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen der Universität Hohenheim konstruiert und gebaut.

Dabei handelt es sich um einen liegenden Reaktor im halbtechnischen Maßstab mit einer Höhe von 60 cm, einer Länge von 160 cm und einem Faulraumvolumen von ca. 400 l. Zur Isolation befindet sich zwischen dem Reaktor und dem äußeren Holzmantel eine Wärmedämmschicht (Abbildung 1, 2 und 3).



Faulraum

Abbildung 1: Seitenansicht der Biogasanlage im halbtechnischen Maßstab  
(ohne Holzmantel)

Am vorderen Ende befindet sich ein Einfüll-, am hinteren Ende ein Auslaufstutzen, für das frische bzw. vergorene Substrat. Am hinteren Ende gewährt eine Plexiglas-Scheibe Einblick auf das Reaktorinnere, mit Rührwerk, flüssiger Phase und der darüber stehenden Gasblase. Die Temperaturregulation findet über einen Wasserkreislauf statt, der, ausgehend von einem Bad-/ Umwälzthermostat über einen Zulaufschlauch den inneren Reaktorzylinder erreicht. Auf diesen wurde über eine größere Fläche eine Heizspirale aufgeschweißt, über die durch das erwärmte Wasser das Reaktorinnere auf die gewünschte Temperatur gebracht wird. Über einen Ablaufschlauch am Ende des Heizmantels erreicht das Wasser wieder das Thermostatbecken und schließt somit den Kreislauf (Abbildung 3).

Das Rührwerk wird über eine Zeitschaltuhr betrieben und kann beliebig eingestellt werden. An der Oberseite ist der Reaktor mit vier Röhren (Durchmesser jeweils ca. 6 cm) versehen, die das Einbringen von Prüfkörpern ermöglichen. Durch große Bohrungen am unteren Ende der Röhren wird ein optimaler Kontakt der Prüfkörper mit dem Reaktorinhalt gewährleistet. Oberhalb des Einfüllstutzens befindet sich ein Gasstutzen, der über einen Silikonschlauch mit einem Gaszähler verbunden ist, an dem kontinuierlich die produzierte Gasmenge abgelesen werden kann.

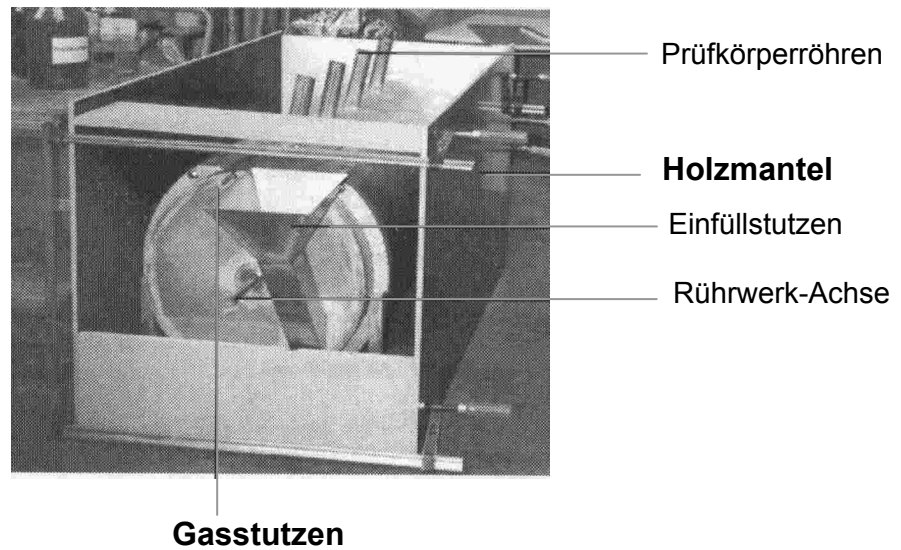


Abbildung 2: Frontalansicht der Biogasanlage (Holzmantel im Bau)

Das Gesamtvolumen des Reaktors setzt sich aus einer flüssigen Phase (ca. 400 l) und der darüber stehenden Gasphase (ca. 50 l) zusammen. Die Anlage wird mindestens fünfmal wöchentlich mit einer Gesamtsubstratmenge (Input-Gülle) von je 10 l beschickt. Für den hier durchgeführten Versuch wurden zwei dieser Anlagen betrieben. Die eine im mesophilen Temperaturbereich von 35 °C, die andere thermophil bei 55 °C.

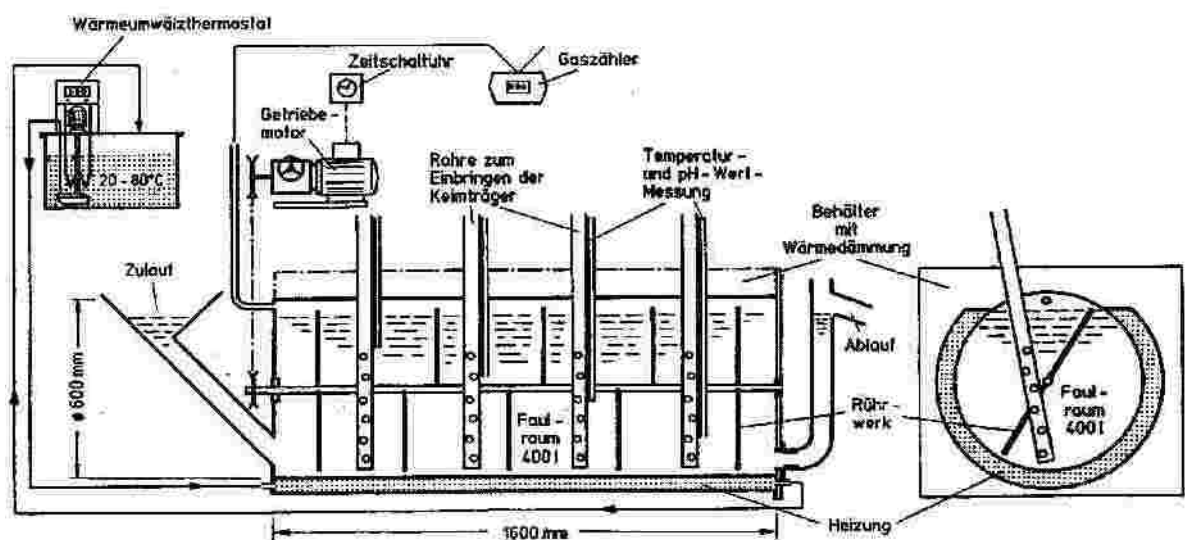


Abbildung 3: Schema der Biogasanlage,



### 3.1.2 Pasteurisierungseinheit (PE)

Auch die Pasteurisierungseinheit wurde von der Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen der Universität Hohenheim konstruiert und gebaut. Hierbei handelt es sich um ein aufrecht stehendes Gerät, mit einer Höhe von 55 cm, einem Innendurchmesser von 40 cm und einem Fassungsvermögen von ca. 50 l. Eine doppelte Edelstahlwand dient der Wärmeisolierung.

Die Beschickung ist von oben möglich, ein Auslaufstutzen (ca. 10 cm Durchmesser) kann nach unten mechanisch geöffnet und geschlossen werden. Die PE kann an ihrer Oberseite mit einem aufschraubbaren Edelstahldeckel verschlossen werden.

Ein Rührwerk befindet sich in der Mitte des Gerätes, zur besseren Untermischung bei Substratgemischen ist am oberen Rand eine ins Innere ragende Stahlplatte verschweißt. Die Temperaturregulation erfolgt über einen Wasserkreislauf, der ausgehend von einem Bad-/Umwälzthermostat über einen Zulaufschlauch den inneren Zylinder erreicht. Eine Heizringleitung liegt zwischen innerer und äußerer Edelstahlwand. Über einen Ablaufschlauch am Ende des Heizmantels erreicht das Wasser wieder das Thermostatbecken; der Kreislauf ist geschlossen. Durch eine Zeitschaltuhr wird der Motor gesteuert, der über einen Keilriemen das Rührwerk betreibt. An der zentralen Achse des Rührwerkes sind zwei, einander gegenüberliegende und gut perforierte Stahlkörbe mit einer Seitenlänge von 10,5 x 5,5 cm angebracht, in denen je zwei, mit Prüfkörpern bestückte Lanzen in der Anlage fixiert werden können.

Für jeden Versuch wird die PE mit dem jeweiligen Substrat neu befüllt. Während der Versuche wurde das Rührwerk alle zwei Minuten für zwei Minuten in Bewegung gesetzt. Um eine bessere Durchmischung des Substrats (besonders zu Versuchsbeginn) zu erreichen, kann das Rührwerk auch manuell beliebig lange betätigt werden. Während der einzelnen Versuchsdurchgänge konnte mit einem digitalen Temperaturfühler, der durch eine Aufbohrung im Deckel der Anlage eingeführt werden kann, regelmäßig bis kontinuierlich die Temperatur im Substratinneren kontrolliert werden.

### 3.1.3 Versuchsdurchführung im halbtechnischen Maßstab

Vor der Beprobung der sieben großtechnischen Anlagen A - G, wurden Versuche an den beiden Anaerobanlagen und der Pasteurisierungseinheit im Labor durchgeführt (siehe Punkte 4.1 und 4.1.3.1 bis 4.1.3.5).

Das Substrat zur Beschickung der Modellanlagen war Rindergülle, die vom universitätseigenen Versuchsbetrieb bezogen wurde. Zur ersten Befüllung und Animpfung des Anaerobreaktors wurden 400 l Anaerobgülle eines Milchviehbetriebs verwendet. Beschickt wurde täglich mit 10 – 20 Liter.

Da zwei Anaerobanlagen im Labormaßstab zur Verfügung standen, konnten Versuche parallel im mesophilen und thermophilen Bereich durchgeführt werden. Das Wasserbad der einen Anlage wurde hierfür mit 38 - 39 °C betrieben, das der anderen mit 57 - 58 °C. Auf diese Weise wurde eine konstante Substrattemperatur von 35 °C bzw. im einen Reaktor und 55 °C im anderen Reaktor erreicht.

Laborversuche im Temperaturbereich von 70 - 90 °C wurden mit Hilfe der Pasteurisierungseinheit durchgeführt. Hierzu wurde das Wasserbad bei 80 - 100 °C betrieben, um so eine konstante Substrattemperatur zu erreichen. Als Substrat verwendete man dasselbe Inputmaterial wie für die Anaerobanlage.

Die ausgewählten Mikroorganismen wurden in speziellen Prüfkörper (siehe Punkt 3.3), die an Lochblechen mit Kabelbindern befestigt wurden, in die Anlagen eingebracht.

Je nach Bakterienart und deren Widerstandsfähigkeit wurde im Vorfeld deren Aufenthaltszeit in den Reaktoren gewählt. Wenn man also davon ausgehen konnte, dass es sich um einen weniger resistenten Prüforganismus handelt, wählte man die Prozessaufenthaltszeit entsprechend kürzer (1 Stunde; 3 Stunden; 21 Stunden; 24 Stunden; 48 Stunden).

Ein weiteres Kriterium für die Aufenthaltszeit war auch die Betriebsweise der Laboranlagen. Im mesophilen Temperaturbereich wurden entsprechend längere Zeiten gewählt als im thermophilen. In der Pasteurisierungseinheit waren die Aufenthaltszeiten aufgrund der sehr hohen Betriebstemperaturen (70-90 °C) am kürzesten (10 Minuten; 20 Minuten; 30 Minuten; 60 Minuten).

Neben den Tenazitätsversuchen sollte die Fragestellung bezüglich der realen Aufenthaltszeit (Mindestverweilzeit) des Substrates im Reaktor überprüft werden. Hierzu wurde *Bacillus globigii*-Sporensuspension direkt mit dem Inputmaterial in den Thermophilreaktor eingebracht und nach bestimmten Zeiteinheiten (sofort; 20 Minuten; 30 Minuten; 40 Minuten; 24 Stunden; 48 Stunden; 7 Tage) Outputproben entnommen und auf *Bacillus globigii* Sporen untersucht. Beim ersten Versuchsdurchgang wählte man eine größere Sporenmenge (150 ml mit einer Konzentration von  $10^8$  Sporen /ml). Der zweite Durchgang fand im Mesophilreaktor statt. Dabei wurden dieselben Zeiteinheiten wie im Thermophilreaktor gewählt, nur die Menge an Sporensuspension, die mit dem Inputmaterial eingebracht wurde, wurde auf 10 ml mit einer Konzentration von  $10^8$  Sporen/ml verringert.

#### 3.1.4 Im halbtechnischen Maßstab verwendete Prüforganismen

Als Auswahlkriterium für die einzelnen Prüforganismen standen deren seuchenhygienische Relevanz und deren Resistenz gegenüber wechselnden Umweltbedingungen im Vordergrund.

In den Laboranlagen wurden folgende Prüforganismen verwendet:

- *Salmonella Senftenberg* W775 H<sub>2</sub>S positiv, DSM 10062, SIT100
- *Salmonella Senftenberg* H<sub>2</sub>S negativ, DSM 10062, SIT 112
- *Enterococcus faecalis*, DSM 2570
- *Campylobacter jejuni*, DSM 4688, SIT 98
- *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, DSM 44133
- Coliphage „Wildstamm“
- *Escherichia coli* als Wirtsstamm für Coliphage Wildstamm, DSM 12242
- Coliphage T1, DSM 5801
- *Escherichia coli* als Wirtsstamm für Coliphage T1, DSM 613
- *Bacillus globigii*-Sporen
- *Ascaris suum*-Eier

## 3.2 Untersuchungen an Praxisanlagen

Es wurden im Vorfeld seitens des Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL) 6 landwirtschaftliche Vergärungsanlagen ausgewählt, die gemeinsam von der INFU mbH Geschäftsbereich PlanCoTec (Quelle für die folgende Beschreibung der Anlagen A-F), dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene und dem Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim beprobt wurden.

Es wurden zusätzlich von den beiden Hohenheimer Instituten zwei weitere Anlagen untersucht. Die Anlagen werden mit A bis H bezeichnet.

Als „Inputstoffe“ werden im folgenden Text diejenigen Rohsubstrate bezeichnet, mit denen die Anlagen beschickt werden. Sie variieren je nach Bauart und Betriebsweise der Anlagen.

Als „Outputstoffe“ werden im nachfolgenden Text diejenigen Stoffe bezeichnet, die den Gärprozess durchlaufen haben und am Austrag entnommen werden. Diese variieren ebenfalls in Abhängigkeit von der Bauart und Betriebsweise der Anlagen.

### 3.2.1 Anlage A

Beim Verfahren der Anlage A (Abb.4) handelt es sich um eine einstufige, mesophile Nassvergärung. Die festen „Inputstoffe“ (Festmist und Fette für Futtermittel) werden ein bis zweimal täglich im Aufnahmebunker mit Rindergülle vermischt und mittels einer Schnecke in den Fermenter eingebracht. Der in den Boden eingelassene Betonfermenter hat einen Durchmesser von 10,0 m und eine Tiefe von 4,0 m. Bei einem Füllstand von 3,3 m (70 cm Gasraum) ergibt sich ein Nutzvolumen von ca. 259 m<sup>3</sup>.

Der Überlauf des Fermenters läuft ohne Pumpeneinsatz durch ein unterirdisches Rohr direkt ins Nachlagerbecken, welches über eine Kapazität von 300 m<sup>3</sup> verfügt. Auf dem Fermenterdach befindet sich ein Container mit einem Blockheizkraftwerk, das das entstehende Biogas in elektrische Energie und Wärme umwandelt. Die Betriebstemperatur des Fermenters schwankt zwischen 42 – 47 °C. Aufgeheizt wird dieser über insgesamt 800 m lange Heizschlangen, die frei im Fermenter installiert sind. Die

Temperatursteuerung erfolgt über einen mechanischen Thermostat, der die Vorlufftemperatur der Heizschlange regelt.

Das Gärsubstrat wird über ein von oben in den Fermenter schräg einlaufendes Rührwerk durchmischt, das intervallweise jede Stunde für 5 Minuten läuft. Es werden täglich ca. 480 m<sup>3</sup> Gas mit einem Methangehalt von ca. 52 % erzeugt. Die Erfassung der Gasmenge erfolgt mittels Gaszähler.



Abbildung 4: Fermenter und Blockheizkraftwerk (BHKW) der Anlage A  
(Foto: Klages, KTBL, 2003)

### 3.2.2 Anlage B

Die Anlage B wird als einstufiges, mesophiles (45 – 49 °C) Nassverfahren betrieben. Im Aufnahmebunker wird zweimal täglich eine Mischung aus Festmist, eingeweichte Backwaren und Regenwasser angerührt und mittels einer Schnecke in den Fermenter eingebracht. Der zum Teil in den Boden eingelassene Betonfermenter hat einen

Durchmesser von 11,0 m und eine Tiefe von 4,0 m. Bei einem Füllstand von 3,6 m (40 cm Gasraum) ergibt sich ein Nutzvolumen von ca. 342 m<sup>3</sup>. Auf dem Fermenterdach befindet sich ein Container mit einem Blockheizkraftwerk, das mit dem entstehenden Biogas betrieben wird.

Der Fermenter bzw. dessen Inhalt wird durch Heizschlangen in der Fermenterwand erwärmt. Die Heizschlangen werden mit der Abwärme des Blockheizkraftwerkes betrieben und manuell gesteuert. Ein Thermometer ist in einem Abstand von ca. 20 cm zur nächsten Heizschlange unmittelbar in der Fermenterwand eingebaut.

Die Durchmischung des Fermenterinhalt erfolgt mit einem Tauchmotor-Rührquirl, welcher in Höhe und Richtung verstellbar ist. Bei voller Auslastung werden ca. 600 m<sup>3</sup> Gas pro Tag gebildet. Ein Gasmengenzähler ist zwar vorhanden, wird aber zur Vermeidung von Korrosion nur kurzzeitig in Betrieb genommen.

### **3.2.3 Anlage C**

Die Anlage C (Abb.5) arbeitet nach dem Verfahren der zweistufigen mesophilen Nassvergärung mit einer vorgeschalteten Hygienisierungsstufe. Als „Inputstoffe“ werden neben der im Betrieb anfallenden Rindergülle zusätzlich ca. 4,5 t pro Tag Bioabfälle aus der getrennten Sammlung verarbeitet. Nach Vorsortierung und grober Zerkleinerung durch eine Schneckenmühle werden die Bioabfälle mit Gärsubstrat aus dem zweiten Fermenter angemaischt und in den Hygienisierungstank gepumpt. Dieser weist ein Volumen von ca. 20 m<sup>3</sup> auf. Da der Tank nicht vollständig gefüllt wird und nach dem Entleeren jeweils ein Rest im Tank verbleibt, werden pro Durchgang etwa 9 m<sup>3</sup> hygienisiert. Bei zwei Durchgängen pro Tag werden somit täglich 18 m<sup>3</sup> behandelt. Nach dem Befüllen des Hygienisierungsbehälters wird das Material über einen Zeitraum von ca. 4 bis 5 Stunden auf 70 °C aufgeheizt und dabei ständig mit einem Rührwerk durchmischt. Nach Erreichen der Solltemperatur verbleibt die Maische für ca. 1 Stunde im Tank.

Anschließend wird das Material in den ersten Fermenter gepumpt. Die Rindergülle wird unbehandelt dazugeben. Der erste Fermenter verfügt nach Angaben des Betreibers über ein Nutzvolumen von 433 m<sup>3</sup> verfügt. Nach einer mittleren hydraulischen Verweilzeit von

24 Tagen gelangt der Überlauf des ersten Fermenters in den dahinter liegenden zweiten Fermenter. Aufgrund des größeren Nutzvolumens von  $804 \text{ m}^3$  beträgt die mittlere hydraulische Verweilzeit im zweiten Fermenter 45 Tage. Der Austrag aus den einzelnen Systemeinheiten erfolgt durch einen natürlichen Überlauf. Aus Fermenter 2 fließt das Substrat in einen Nachlagerbehälter, welcher eine Kapazität von  $804 \text{ m}^3$  aufweist und ebenfalls mit einer Betondecke versehen ist.

Beide Fermenter verfügen eine Wärmedämmung und werden mittels Heizschlangen unter Nutzung der Abwärme aus dem Blockheizkraftwerk auf einer Betriebstemperatur von  $47 \text{ }^\circ\text{C}$  gehalten. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe von verstellbaren Tauchmotor-Rührquirlen.

Zur Messung der Temperatur sind Digitalthermometer vorhanden, allerdings ohne eine automatische Temperaturofzeichnung. Es werden täglich ca.  $700 \text{ m}^3$  Gas mit einem Methangehalt von ca. 55 % produziert.



Abbildung 5: Ansicht Fermenter 1 auf Fermenter 2 der Anlage C  
(Foto: Klages, KTBL, 2003)

### 3.2.4 Anlage D

Die Anlage D (Abb.6) wird als zweistufige, mesophile Nassvergärung betrieben. Neben der Schweinegülle, die direkt aus dem Stall in den ersten Fermenter gepumpt wird, werden auch feste Stoffe, wie Putenmist, Maissilage, Gemüse- und Getreideabfälle verwertet. Diese werden in einem Aufnahmebunker vermischt und mittels einer Schnecke in halbstündigen Intervallen in den ersten Fermenter befördert. Dieser verfügt über ein Nutzvolumen von  $599 \text{ m}^3$  und wird mit einer Betriebstemperatur von  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  betrieben. Bei einer Einspeisung von ca.  $20 \text{ m}^3$  Inputmaterialien pro Tag beträgt die mittlere hydraulische Verweilzeit im Fermenter 1 30 Tage. Über einen natürlichen Überlauf gelangt das Gärsubstrat in den zweiten Fermenter, der ebenfalls bei  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  betrieben wird. Bei einem Nutzvolumen von  $816 \text{ m}^3$  beträgt die hydraulische Verweilzeit im Fermenter 2 41 Tage. Der Überlauf fließt in den Nachlagerbehälter, welcher über eine Kapazität von  $750 \text{ m}^3$  verfügt und nicht abgedeckt ist. Zum Erreichen der Betriebstemperatur sind beide Fermenter mit einer Heizung versehen, die mittels der Abwärme aus dem Blockheizkraftwerk betrieben wird.

Beide Fermenter verfügen über verstellbare Tauchmotor-Rührquirlen und sind mit einer Folienabdeckung ausgestattet, die gleichzeitig auch als Gasspeicher dient. Es werden in der Anlage pro Tag ca.  $880 \text{ m}^3$  Gas mit einem Methangehalt von ca. 49,4 % produziert. Die Gasmenge wird kontinuierlich über einen Zähler erfasst. Eine regelmäßige Messung des Methangehalts erfolgt nicht.





Abbildung 6: Anlage D, Fermenter mit Schauglas (Foto: Klages, KTBL, 2003)

### 3.2.5 Anlage E

Bei der zweistufigen Anlage E (Abb.7) wird eine mesophile Trockenvergärung mit einer thermophilen Nassvergärung kombiniert. Nach dem ersten Fermenter durchläuft das Gärsubstrat eine Hygienisierungsstufe.

Die Inputmaterialien (Bioabfälle und Schweinegülle) werden auf einer betonierten Fläche neben dem Fermenter grob miteinander vermischt und weisen dann einen Trockenmassegehalt von 20 % bis 30 % auf. Sie werden mittels einer Schnecke seitlich an einem Ende in den ersten, liegenden Fermenter eingebracht. Die Schweinegülle wird

direkt in den Fermenter gepumpt. Während des Gärprozesses durchwandern die Gärstoffe den Fermenter und werden an der gegenüberliegenden Seite wieder ausgetragen.

Der Fermenter verfügt über eine zentrisch angeordnete, horizontal verlaufende Rührachse, die im Abstand von 1,0 m Rührarme aufweist. Der Fermenter 1 ist komplett mit Material gefüllt und weist ein Nutzvolumen von 200 m<sup>3</sup> auf. Die hydraulische Verweilzeit beträgt ca. 21 Tage.

Zum Erreichen der Betriebstemperatur von 44 °C ist der Fermenter mit einer Heizung ausgestattet, die über ein Blockheizkraftwerk betrieben wird. Der Trockenmassegehalt des Materials nimmt durch organischen Abbau soweit ab, dass das Substrat beim Austrag aus Fermenter 1 pumpfähig ist. Im Anschluss wird das Gärsubstrat durch einen speziellen Hygienisierungstank („ThermDes“) gepumpt. Dieser weist ein Volumen von 8 m<sup>3</sup> auf und wird kontinuierlich von Material durchflossen. In der „ThermDes“ wird das Substrat auf eine Temperatur von 70 °C aufgeheizt und verweilt nach Angaben der Betreiber rechnerisch für mindestens 1 Stunde bei dieser Temperatur. Die Heizwärme wird vom Blockheizkraftwerk der Anlage bezogen.

Nach der Hygienisierung gelangt das Gärsubstrat in den zweiten Fermenter, der im Nassverfahren bei einer Betriebstemperatur von 55 °C betrieben wird. Er verfügt über eine Wärmedämmung und wird nicht beheizt. Die Betriebstemperatur wird daher nur über das erhitzte Substrat aus dem „ThermDes“ erreicht. Der Fermenter 2 verfügt über ein Nutzvolumen von 327 m<sup>3</sup>, die mittlere hydraulische Verweilzeit beträgt 30 Tage. Die Durchmischung erfolgt mit einem verstellbaren Tauchmotor-Rührquirl und der Reaktor weist eine Folienabdeckung auf. Der Überlauf des Fermenters gelangt schließlich in den Nachlagerbehälter, der eine Kapazität von ca. 300 m<sup>3</sup> aufweist.

Es werden täglich ca. 520 m<sup>3</sup> Gas mit einem Methangehalt von durchschnittlich 49,8 % produziert. Gasmenge und -qualität werden regelmäßig mit geeigneten Messeinrichtungen erfasst.



Abbildung 7: Anlage E, Gesamtansicht

(Foto: Klages, KTBL, 2003)

### 3.2.6 Anlage F

Zwei baugleiche Fermenter parallel nebeneinander betrieben, charakterisieren die Anlage F. Fermenter 1 arbeitet mit einer Betriebstemperatur von ca. 42 °C im mesophilen Bereich, Fermenter 2 wird thermophil mit einer Temperatur von ca. 55 °C gefahren. Beide Fermenter verfügen über eine feste Betonabdeckung mit einem von oben schräg in die Fermenter laufendem Rührwerk. Das Nutzvolumen beträgt jeweils 675 m<sup>3</sup>, außerdem sind sie mit einer Fußboden- und einer Wandheizung zur Erreichung der Betriebstemperatur ausgestattet.

Die „Inputmaterialien“ werden in zwei Vorlagetanks von jeweils 150 m<sup>3</sup> gesammelt und gemischt, wobei in einem Vorlagetank Fettabscheiderinhalte und Kartoffelschälabfälle und in dem anderen Tank Maissilage, Stroh und Gärsubstrat aus dem Nachlager gemischt werden. Das Nachlager ist mit einer Folienabdeckung zur Restgaserfassung ausgestattet und verfügt über eine Speicherkapazität von ca. 2.000 m<sup>3</sup>.

Sowohl Befüllung als auch Entleerung der beiden Fermenter und des Nachlagers erfolgen über eine zentrale Pumpe. Das Nachlager dient auch als Gasspeicher, mit dem Gas werden zwei Motoren zur Stromerzeugung (Blockheizkraftwerke) betrieben .

### **3.2.7 Anlage G**

Die mesophile Anlage G (38 – 40 °C) besteht aus einer Pasteurisierungseinheit und drei liegenden Rohrfermentern, die parallel betrieben werden.

Die Anlage wird ausschließlich mit Speiseabfällen betrieben.

#### **3.2.7.1 Patsteurisierungseinheit (PE) der Anlage G**

Die Hygienisierungsanlage besteht im Wesentlichen aus 3 Behältern (Abb. 8) mit folgenden Funktionen:

- Behälter 1 ist ein Warmwasserspeicherbehälter mit eingebauter Edelstahlrohrwendel zur Aufheizung des Substrates.
- Behälter 2 ist der Wiegebehälter – Hygienisierungsbehälter
- Behälter 3 ist ein Behälter mit eingebauter Edelstahlrohrwendel zur Rückkühlung des Substrates.

Diese Behälter sind durch ein sinnvolles System von Rohren, Pumpen und Ventilen miteinander verbunden. Die nachfolgende Funktionsbeschreibung bezieht sich auf die Abbildung 8. In der Grundposition ist der Behälter 2 mit Wasser von ca. 90 °C gefüllt. Dieses Wasser wird vom Blockheizkraftwerk (BHKW) über einen Wärmetauscher ständig auf Temperatur gehalten. Über ein eingebautes Thermometer ist die Temperatur erkennbar. Die Anlage wird von einem Prozessrechner gesteuert. Über eine Vorprogrammierung werden alle notwendigen Daten für den automatischen Ablauf eingegeben. Mittels Startbefehl geht die Anlage in Betrieb. Zunächst wird über eine Beschickungspumpe aus dem Vorlagebehälter eine vorgewählte Menge in Behälter 1

gepumpt. Der Inhalt wird elektronisch gewogen. Nach Erreichen der Füllmenge von 4.000 l oder auch früher beginnt der Heizprozess und nach Erreichen von 70 °C, die Hygienisierung. Dazu wird mittels Beschickungspumpe Substrat durch die Edelstahlrohrwendel des Behälters 2 gepumpt und dabei erwärmt es sich. Der Vorgang läuft so lange bis der Temperaturfühler den eingestellten Wert von 70 °C erreicht. Nun schaltet eine Sicherheitsschaltung ein und hält die erreichte Temperatur für 30 oder 60 Minuten konstant auf 70 °C. Nach 30 bzw. 60 Minuten Heizdauer öffnet ein Ablassventil und eine Pumpe pumpt das Substrat in Behälter 3. In diesem Behälter liegt eine Rohrwendel, welche von Kaltwasser durchströmt wird und die Wärme abführt. Nachdem die Kühltemperatur von ca. 40 °C erreicht ist, wird der Behälterinhalt mittels einer Pumpe in ein Vorratslager leerpumpt. Von dort werden die Reaktoren beschickt. Der Vorgang wiederholt sich kontinuierlich. Die Füll- und Entleerungsvorgänge werden von einem Prozessrechner durch vorgegebene Befehle überwacht. Außerdem steuert er die Temperatur.

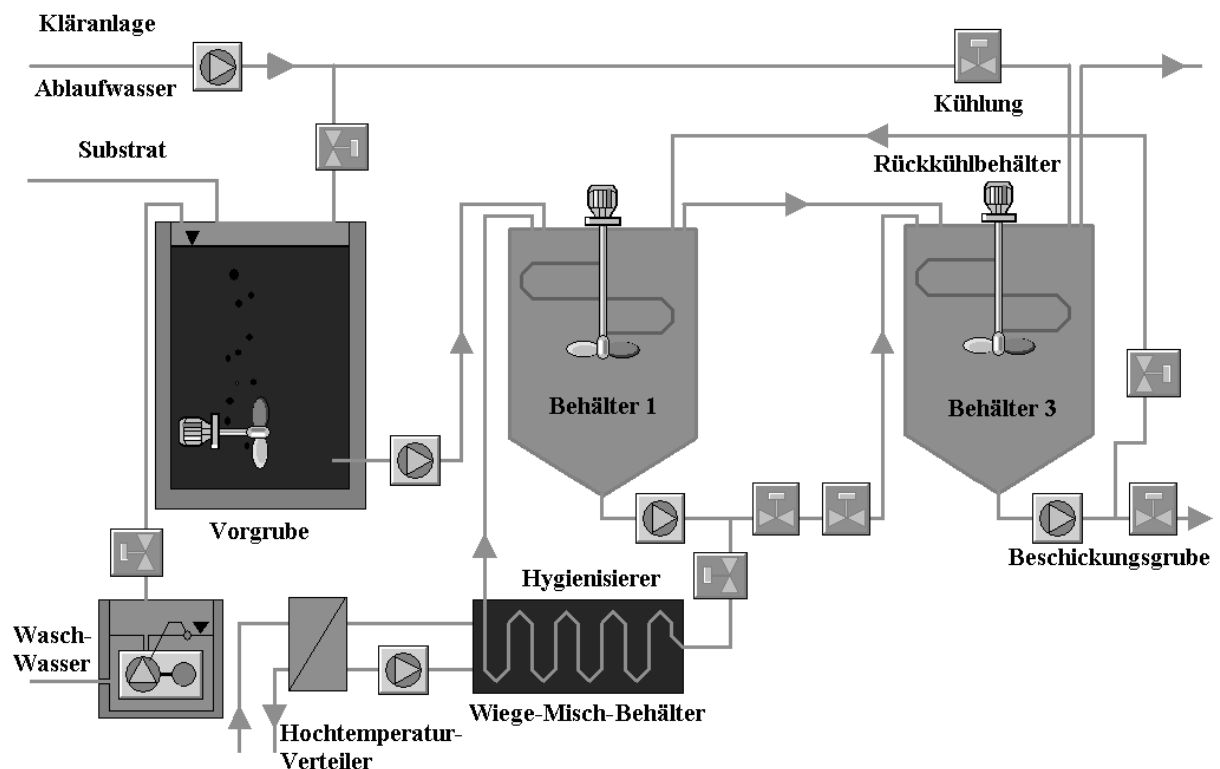


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hygienisierungseinheit der Anlage G (Darstellung vom Betreiber zur Verfügung gestellt)

### 3.2.7.2 Rohrfermenter der Anlage G

Die vier Rohreaktoren sind 25 m lang, haben einen Durchmesser von 3 m und ein Volumen von 156 m<sup>3</sup>. In zwei von vier Reaktoren sind für die Probeentnahme im vorderen, mittleren und hinteren Bereich drei Tauchröhren eingebaut. In die vordere Tauchröhre wurde die *Bacillus globigii*-Sporensuspension eingebracht. Auf Gestängen waren pH- und Temperatursensoren eingebracht. Über eine automatische Messwerterfassung konnten die Daten abgelesen werden. Die Probenentnahme für die Versuche zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit im Reaktor fand am Ende des Rohrfermenters statt, da an dieser Stelle ein Ablasshahn angebracht ist.

### **3.2.8 Anlage H**

Bei der Anlage H handelt es sich um eine einstufige Vergärungsanlage für Bioabfälle, die als Trockenvergärung betrieben wird.

In der Anlage werden Bioabfälle aus der braunen Tonne zu Kompost und Biogas verarbeitet. Die Anlage kann 36.000 t Bioabfall pro Jahr verwerten und produziert ca. 15.000 t Kompost (getrockneter, entwässerter Gärrest) und 4 Mio. m<sup>3</sup> Biogas mit einem Methangasgehalt von ca. 60 %. Das Biogas wird in Gasmotoren verbrannt, wobei 8.000 MWh Strom erzeugt und ins Netz eingespeist werden.

Der Bioabfall wird von den Sammelfahrzeugen nach der Verwiegung über eine Fahrzeugschleuse in den Müllbunker gekippt. Ein automatischer Kran entnimmt das Material und gibt es einer Dosiervorrichtung auf. In der Aufbereitung wird der Bioabfall gesiebt, von Störstoffen befreit, zerkleinert und anschließend in den Gärreaktor gepumpt. Im Reaktor wird der Bioabfall innerhalb von 20 Tagen anaerob abgebaut. Der Gärrest wird entwässert, ca. 24 Stunden belüftet und abgesiebt. Das Abwasser wird in der eigenen Kläranlage gereinigt und in die Kanalisation eingeleitet. Das Biogas wird dem Gasspeicher zugeführt und mittels Gasmotoren verstromt. Um Geruchsemissionen zu vermeiden, wird die komplette Anlage mit einer Unterdrucklüftung entlüftet. Die erfasste Abluft wird der Abluftreinigung zugeführt.

### 3.2.9 Gesamtübersicht zu den beprobten Anlagen A bis H

Tabelle 2: Gesamtübersicht zu den beprobten Anlagen A bis H

	<b>Betriebsweise</b>	<b>Inputmaterial</b>	<b>Nutzvolumen</b> <b>H=Hygienisierungstank</b> <b>F=Fermenter</b> <b>L=Lager</b>	<b>Gasmenge (G)</b> <b>Methangehalt (M)</b>
<b>Anlage A</b>	einstufig mesophil nass	Festmist Rindergülle Fette	F 259 cbm L 300 cbm	G 480 cbm M 52%
<b>Anlage B</b>	einstufig thermophil nass	Festmist Nassteig Regenwasser	F 342 cbm	G 600 cbm M keine Angabe
<b>Anlage C</b>	zweistufig mesophil nass	Bioabfälle Rindergülle	H 9 cbm F <sub>1</sub> 433 cbm F <sub>2</sub> 804 cbm L 804 cbm	G 700 cbm M 55%
<b>Anlage D</b>	zweistufig mesophil nass	Putenmist Maissilage Gemüse- und Getreideabfälle	F <sub>1</sub> 599 cbm F <sub>2</sub> 816 cbm L 750 cbm	G 880 cbm M 49,4%
<b>Anlage E</b>	zweistufig Fermenter 1 mesophil trocken Fermenter 2 thermophil nass	festes Input- material (z.B. Bioabfälle) Schweinegülle	H 8 cbm F <sub>1</sub> 200 cbm F <sub>2</sub> 327 cbm	G 520 cbm M 49,8%
<b>Anlage F</b>	zweistufig Fermenter 1 mesophil Fermenter 2 thermophil	Fettabscheider Kartoffelschal- abfälle Maissilage Stroh Gärsubstrat	F <sub>1</sub> 675 cbm F <sub>2</sub> 675 cbm L 2000 cbm	keine Angabe
<b>Anlage G</b>	Zweistufig Hygienisierung 70 °C F1-3 mesophil nass	Speiseabfälle	H 400 cbm F1-3 je 156 cbm	keine Angabe
<b>Anlage H</b>	Einstufig Trockenvergäruug	Bioabfälle aus der braunen Tonne		G 4Mio cbm pro Jahr M 60%

### 3.2.10 Versuchsdurchführung in den Praxisanlagen

Nachdem im Labormaßstab Erkenntnisse hinsichtlich der Tenazität der ausgewählten Prüforganismen und der Praktikabilität der Prüfkörper gesammelt werden konnten, begann die Beprobung der Praxisanlagen. Das Einbringen und Bergen der Prüfkörper (siehe 3.3) sowie das Entnehmen von Produktproben erfolgte durch die Firma INFU mbH Geschäftsbereich PlanCoTec. Hierfür wurden spezielle Behälter aus Lochblechen mit aufschraubbarem Deckel entwickelt, um die Prüfkörper einzulegen. Anschließend wurden die Gefäße an einer Kette in das Substrat der Fermenter eingebracht.

Bei der Probenentnahme und Einbringung der Prüfkörper mit den enthaltenen Prüforganismen an der jeweiligen Anlage musste auf den Anlagenbetreiber Rücksicht genommen werden. Deshalb konnten teilweise nicht aus jedem Fermenter Proben gezogen werden, wenn z. B. das Nachlager kurz vorher entleert wurde und dadurch kein Material zur Verfügung stand.

Für die Untersuchungen mit den Prüfkörpern wurde in den Anlagen A, C, D und E eine Aufenthaltsdauer von 24 Stunden und in der Anlage B (Pasteurisierungseinheit 70 °C) 10, 20, 30 und 60 Minuten gewählt.

Die Anlagen F und G wurden zusätzlich zur ursprünglichen Fragestellung beprobt, um weitere Fragen, die im wissenschaftlichen Interesse standen, beantworten zu können.

In der thermophilen Anlage F wurden Tenazitätsuntersuchungen mit den Prüfkörpern nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden sowie mikrobiologische Untersuchungen der Input- und Outputproben durchgeführt.

In der Anlage G sollte gezeigt werden, wie sich die Tenazität verschiedener Mikroorganismen in der Aufheizphase der Pasteurisierungseinheit darstellt. Hierzu wurde in Abständen von 4 Minuten die erreichte Temperatur notiert und jeweils bei 50 °C, 60 °C und 70 °C (sofort und nach 30 Minuten) Prüfkörper entnommen. Diese Untersuchungen wurden in fünf unabhängigen Versuchen an fünf verschiedenen Tagen durchgeführt.

In der Anlage H lag der Schwerpunkt in der Bestimmung der „realen Aufenthaltszeit“ (Mindestverweilzeit) des Materials im Reaktor. Zusätzlich wurde auch eine „Input-Output Analyse“ durchgeführt und die Tenazität des Bakteriophage T1 bestimmt.



In den Anlagen A und G wurden ebenfalls Untersuchungen zur Bestimmung der „realen Aufenthaltszeit“ (Mindestverweilzeit) des Substrates im Reaktor durchgeführt.

Das Einbringen der *Bacillus globigii*-Sporen wurde vom Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim durchgeführt. Die Probennahmen am Output übernahmen die Anlagenbetreiber nach genauer Anweisung.

Um die benötigte Menge an *Bacillus globigii*-Sporensuspension bestimmen zu können, wurden die Erkenntnisse aus den Laboruntersuchungen auf die großtechnischen Anlagen übertragen. Für die Anlagen A und G wurden ca. 40 l einer Sporensuspension mit einer Konzentration von  $10^6$  Sporen pro ml und für die Anlage H ca. 200 l mit einer Konzentration von  $10^7$  Sporen pro ml verwendet.

Zur Bestimmung der Mindestaufenthaltszeit wurden aus der Anlage A täglich „Outputproben“ entnommen sowie qualitativ und quantitativ auf *Bacillus globigii*-Sporen untersucht. Bis zum 15. Tag wurde täglich eine Probe entnommen, danach nochmals am 19. und 44. Tag. Bei der Anlage G fand die Probenentnahme am 1. Tag in Abständen von 2 Stunden statt und ab dem 2. bis zum 5. Tag jeweils vormittags und nachmittags jeweils eine Probenahme. An der Anlage H wurden vom 1. bis zum 15. Tag täglich 4 bis 5 Proben entnommen.

Zusätzlich wurden an den 8 Praxisanlagen (A - H) „Input-Output-Kontrollen“ durchgeführt. Hierzu wurde Material aus den einzelnen Fermentern sowie das Beschickungsmaterial auf den Gehalt an Salmonellen, Fäkalstreptokokken, und Gesamtcoliforme bzw. Fäkalcoliforme untersucht. Außerdem fand eine Bestimmung des pH-Wertes statt.

Auch die Entnahme der In- und Outputproben übernahm die Firma INFU mbH Geschäftsbereich PlanCoTec. Ein großes Problem stellten dabei die norddeutschen Anlagen dar, da man auf den Postweg angewiesen war und es teilweise zu unerwarteten Verspätungen kam. Daher ist nicht ganz auszuschließen, dass die erhaltenen Ergebnisse zum Teil nicht die tatsächliche mikrobiologische Situation der beprobten Anlage widerspiegeln.

### 3.2.11 In den Praxisanlagen verwendete Prüforganismen

In den Praxisanlagen wurden folgende Prüforganismen verwendet:

- *Salmonella Senftenberg* W775 H<sub>2</sub>S positiv, DSM 10062, SIT100
- *Salmonella Senftenberg* W775 H<sub>2</sub>S negativ, DSM 10062, SIT 112
- *Enterococcus faecalis*, DSM 2570
- Coliphage „Wildstamm“
- Somatischer Coliphage T1, DSM 5801
- *Bacillus globigii*-Sporen

Als Wirtsstämme zur Vermehrung und zur Durchführung des Plaque Tests wurden folgende Stämme verwendet:

- *Escherichia coli* als Wirtsstamm für Coliphage „Wildstamm“, DSM 12242
- *Escherichia coli* als Wirtsstamm für Coliphage T1, DSM 613

Die ausgewählten Mikroorganismen wurden zu Beginn eines jeden Versuchs in Form einer Bakteriensuspension zusammen mit zuvor erhitztem Fermentersubstrat (70 °C/3 h) als „Substrat-Mikroorganismengemisch“ in die Prüfkörper eingebracht. Die Erhitzung des Beschickungssubstrates für die Prüfkörper wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass auch tatsächlich der eingebrachte *Enterococcus faecalis* nachgewiesen wurde, und nicht eventuell andere, nativ in Gülle oder biologischen Abfällen vorkommende Fäkalstreptokokken. Um in solchen Fällen *Enterococcus faecalis* sicher von *Enterococcus faecium* unterscheiden zu können, hätten finanziell aufwendige molekularbiologische Nachweis- bzw. Differenzierungsmethoden zur Anwendung kommen müssen, was im Rahmen des Projektes nicht möglich war. Die *Ascaris suum*-Eier wurden ohne Fermentersubstrat mit Hilfe von Gazesäckchen geschützt durch die entsprechenden Prüfkörper in die Fermenter eingebracht.

Die so vorbereiteten Prüfkörper wurden dann dem Pasteurisierungs- oder Faulprozess der Anlagen zugeführt. Sowohl in den halbtechnischen als auch den großtechnischen Anlagen wurden regelmäßig In- und Outputkontrollen durchgeführt, um Aussagen über die nativen Mikroorganismen des Substrates machen zu können. Hierzu wurde der Gehalt an Salmonellen, Fäkalstreptokokken und Geamtcoliformen bzw. Fäkalcoliformen bestimmt.

### 3.3 Verwendete Prüfkörper

Für die Untersuchungen wurden Prüfkörper vom Typ 1 verwendet. Diese werden auch als „Volumenkeimträger“ (RAPP, 1995) oder „Diffusionsprüfkörper“ bezeichnet. Die Prüfkörper dienen dazu, die zu untersuchenden Testbakterien dauerhaft zu fixieren, und weisen hinsichtlich der zu untersuchenden Testkeime ein inertes Verhalten auf. Sie ermöglichen es eine praxisrelevante Aussage über das Inaktivierungsgeschehen von Mikroorganismen in den untersuchten Substraten zu treffen ohne dass das behandelte Substrat kontaminiert wird, aber die exponierten Mikroorganismen trotzdem, ähnlich wie unter natürlichen Verhältnissen, in einer entsprechenden Matrix verteilt sind. Sie können mehrfach verwendet werden. Diese Prüfkörper wurden für die Exposition der bakteriellen Testorganismen verwendet und auch mit Eiern von *Ascaris suum* in Gaze-Säckchen beschickt.

Die Prüfkörper (Abb. 9 und 10) wurden von der technischen Zentrale der Universität Hohenheim nach Vorlage hergestellt. Der Aufbau und die entsprechenden Teilekomponenten sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

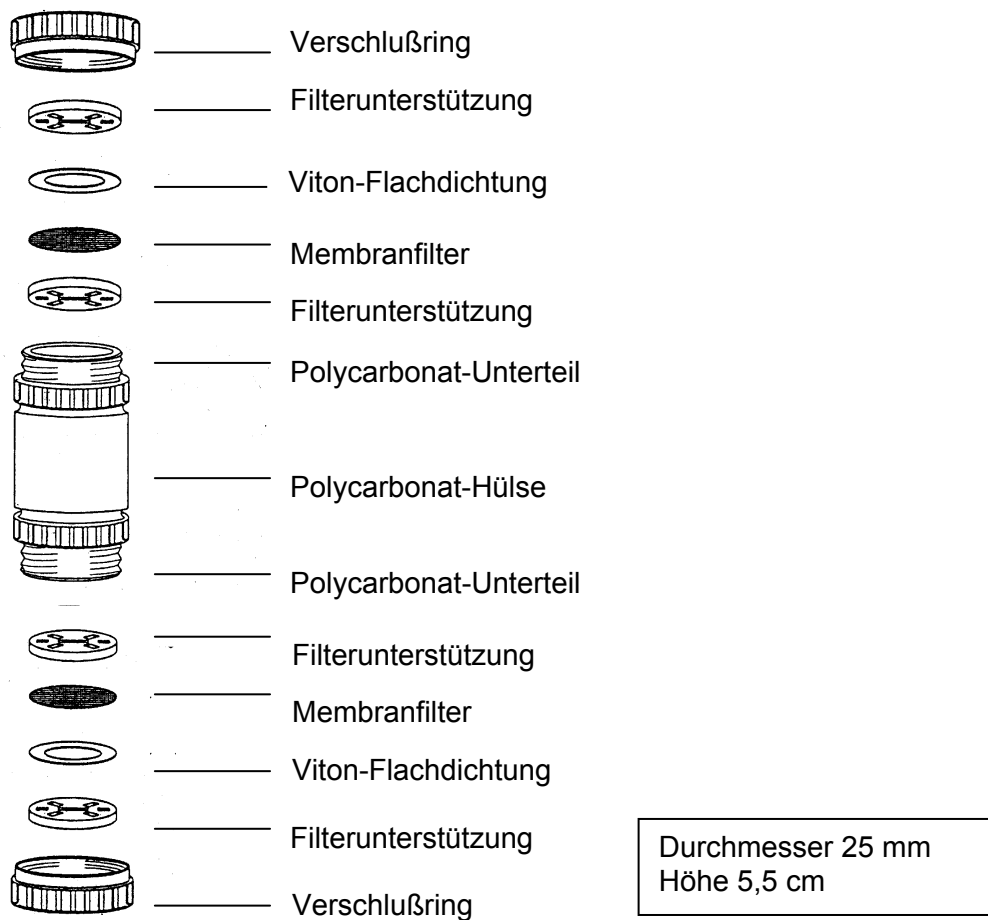


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Prüfkörpers Typ 1 (RAPP, 1995)

Zum Befüllen werden die Prüfkörper auf einer Seite zugeschraubt, dabei ist darauf zu achten, dass der Membranfilter (in diesem Versuch eine Polycarbonate-Track-Etch-Membrane, Porengröße  $0,2 \mu\text{m}$ ) nicht zerreißt und der Dichtungsring gut sitzt. Befüllt wird zuerst mit Gülle oder bei den Untersuchungen in der Anlage G mit Speiseabfällen, dann mit jeweils 1 ml Suspension mit *Salmonella Senftenberg*  $\text{H}_2\text{S}$  negativ, *Salmonella Senftenberg*  $\text{H}_2\text{S}$  positiv, *Campylobacter jejuni*, Coliphage und *Enterococcus faecalis*. Wird der Prüfkörper zuerst mit Gülle/Speiseabfällen befüllt, ist die Gefahr nicht so groß, dass Material herausläuft. Danach wird der Prüfkörper oben zugeschraubt.

Um die Begleitflora zu inaktivieren, waren beide Substrate vor der Befüllung im Wasserbad bei 70 °C 60 Minuten erhitzt.



Abbildung 10: Prüfkörper Typ 1 (RAPP, 1995)

Anders als bei den bakteriellen Prüfkeimen wurden die Askarideneier ohne Substratzugabe in die Prüfkörper vom Typ 1 eingebracht, allerdings wurden sie vorher in Gazesäckchen eingeschweißt (siehe Abbildung 11). Dazu wird ein Bogen Seidengaze<sup>1</sup> in ca. 10 cm<sup>2</sup> große Blätter geschnitten. Ein Blatt wird in der Mitte gefaltet. Mit einem Folienschweißgerät werden die Ränder verschweißt. Eine gute Schweißnaht ist durchgehend geschlossen und darf sich bei leichtem Ziehen nicht lösen (SCHWARZ, 2003).

Durch weitere Schweißnähte im Abstand von 3 cm ergeben sich aus einem Blatt drei Prüfkörpertaschen, die einzeln ausgeschnitten werden. Jede Schweißnaht ist durch ziehen auf Festigkeit zu prüfen. Die Askarideneier werden in die Gazesäckchen pipettiert und diese werden mit Kabelbindern verschlossen.

Die Prüfkörper werden an Lochblechen mit Kabelbindern befestigt und über Öffnungen in den Reaktor eingehängt.

<sup>1</sup> Sefar AG, Hinterbissastr. 25 PF, CH-9410 Heiden

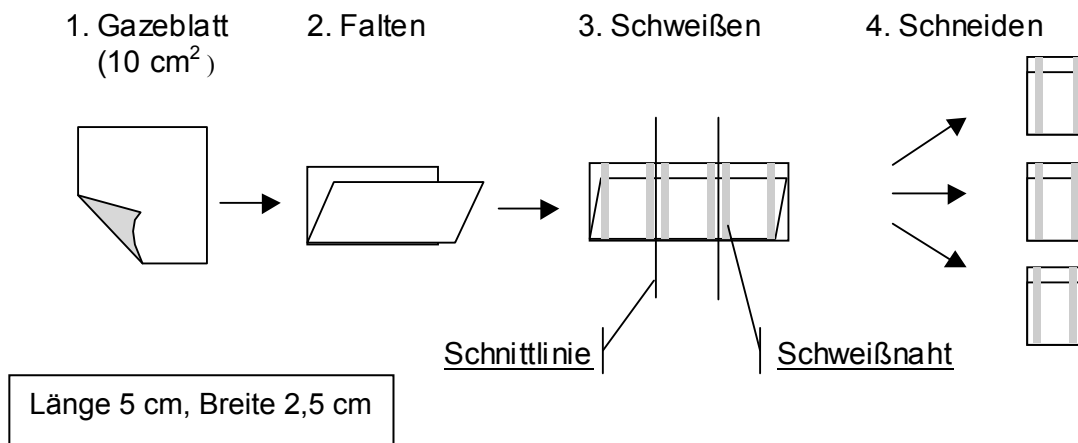


Abbildung 11: Herstellung von Gaze-Säckchen

### 3.4 Mikrobiologisch-parasitologische Untersuchungsmethoden

#### 3.4.1 Herstellung einer Mikroorganismensuspension

Bei einer Mikroorganismensuspension handelt es sich um ein flüssiges Medium, in dem die ausgewählten Bakterien enthalten sind. Für die Überprüfung der Inaktivierung von Mikroorganismen durch die Prozesseinflüsse in der Pasteurisierung bzw. im Gärbehälter ist es nötig, eine möglichst hohe Konzentration der jeweiligen Mikroorganismen in der Suspension zu erhalten.

Es sollte mindestens eine Konzentration von  $10^6$  KBE/ml Substrat der jeweiligen Mikroorganismen vorhanden sein, um die Inaktivierungskinetik über einen Bereich von mindestens 5 Zehnerpotenzen erfassen zu können. Wird eine Inaktivierung bzw. Reduzierung um mindestens 5 Zehnerpotenzen erreicht, geht man generell von einer ausreichenden Desinfektions- bzw. Hygienisierungswirkung aus.

#### Salmonella Senftenberg

Zu Versuchsbeginn wurde mit einer abgeflamten Platinöse eine Kolonie der Stammkultur, die auf Standard-I-Agar als Reinkultur im Kühlschrank aufbewahrt wird, abge-

nommen und in Standard-I-Nährbouillon verbracht. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C auf dem Schüttler wurde mit dem Koch'schen Oberflächen-Verfahren die Keimdichte bestimmt.

#### *Enterococcus faecalis*

Zu Versuchsbeginn wurde mit einer abgeflamten Platinöse eine Kolonie der Stammkultur, die auf Standard-I-Agar als Reinkultur im Kühlschrank aufbewahrt wird, abgenommen und in Standard-I-Nährbouillon verbracht. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C auf dem Schüttler wurde mit dem Koch'schen Oberflächen-Verfahren die Keimdichte bestimmt.

#### *Campylobacter jejuni*

Die Reinkultur wird im Kühlschrank auf Blutagar aufbewahrt. Hiervon wird mit einer Öse eine Kolonie abgenommen und in Preston-Bouillon verbracht. Anschließend wird diese 48 Stunden mikroaerophil bei 42 °C bebrütet und mit dem MPN-Verfahren die Keimdichte bestimmt.

#### *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*

Mycobakterien sind empfindlich und lassen sich nicht im Kühlschrank bei 4 °C über längere Zeit aufbewahren. Daher muss 8 Wochen vor Versuchsbeginn aus der Glycerinstammkultur, die bei - 80 °C eingefroren ist, auf das schräg gegossene Herold's Egg Yolk Medium mit Mycobactin überimpft werden. Nach einer Bebrütungsdauer von mindestens 8 Wochen aerob bei 37 °C können die gewachsenen Kolonien mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt werden. Auf diese Weise wird die Mikroorganismensuspension erhalten.

Zur Konzentrationsbestimmung wird eine dekadische Verdünnungsreihe in NaCl angelegt und von jeder Verdünnungsstufe wird je eine Öse entnommen und auf Herold's Egg Yolk Medium überimpft. Nach wiederum mindestens 8 Wochen Bebrütungsdauer aerob bei 37 °C kann man anhand der gewachsenen Kolonien eine halbquantitative Konzentrationsbestimmung durchführen.

### Coliphage T1

48 Stunden vor Versuchsbeginn wird mit einer Öse eine Kolonie aus einer Reinkultur von *Escherichia coli*, die auf Standard-I-Agar bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt wird, entnommen, in TSB-Bouillon überimpft und 24 Stunden aerob bei 37 °C auf dem Schüttler bebrütet. Nun entnimmt man eine Öse aus der T1-Glycerinstammkultur, die bei - 80 °C gelagert wird und überimpft in die *Escherichia coli*-Keimsuspension. Danach wird erneut 24 Stunden aerob bei 37 °C auf dem Schüttler bebrütet. Um eine reine Coliphagen-Keimsuspension zu erhalten, wird die Suspension bei 4000 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Überstand kann bei - 80 °C eingefroren werden. Man sollte daher zu Versuchsbeginn abschätzen, wieviel ml Keimsuspension benötigt werden. Dadurch ergibt sich eine große Zeitersparnis, weil man nur einmal den Aufwand der Keimsuspensionsherstellung hat.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über den Plaque-Test.

### Coliphage „Wildstamm“

Der „Wildstamm“ wurde aus einer Beschickungsgülle für die Laboranlagen gewonnen. Das Inputmaterial wurde auf Coliphagen untersucht. Man erhielt mit Hilfe des Plattenausgussverfahrens Phagen-Plaques auf dem TSB-Agar. Die Herstellung der Keimsuspension erfolgt im Prinzip wie bei der T1 Phage. Der Unterschied besteht darin, dass ein anderer *Escherichia coli*-Stamm verwendet wird und man ein Plaque ausstanzt, in das man dann in die *E.coli*-Suspension gibt und aerob 24 Stunden bei 37 °C bebrütet, da keine Stammkultur zur Verfügung steht.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt ebenfalls über den Plaque-Test.

### Askarideneier

Für die Gewinnung von Spulwurmeiern ist es notwendig an einem Schlachthof Dünndärme frisch geschlachteter Schweine auf das Vorkommen adulter Würmer zu palpieren. Es werden nur die weiblichen Spulwürmer benötigt, die sich von den männlichen eindeutig in ihrer Größe unterscheiden. Nur weibliche Spulwürmer mit einer Mindestlänge von 15 cm haben in der Regel entwicklungsfähige Eier in ihrem Uterus. Sofern die Möglichkeit der sofortigen Präparation nicht gegeben ist, können die Würmer wenige Tage in etwas Wasser gekühlt (+4 - 6 °C) aufbewahrt werden. Es sollte jedoch nicht zu lange gewartet werden, da sonst Zersetzungsprozesse beginnen, die die Uteruspräparation erschweren.



Zu Beginn der Präparation wird ein Spulwurm längs geteilt (Abb.12). Den Uterus erkennt man daran, dass er sich als starker doppelter weißer Strang darstellt. Man sucht die Bifurcation des Uterus, die sich im ersten Drittel des Spulwurmes befindet und setzt den Uterus in einer Länge von ca. 3 cm ab. Nun nimmt man eine mit Trinkwasser gefüllte Petrischale und streicht mit einer stumpfen Pinzette in diese die Eier aus dem Uterus heraus. Bei zu starker Kontamination mit Uterusresten kann die Suspension durch eine Seidengaze filtriert werden. Die so gewonnene Suspension wird in eine entsprechend große Schottflasche gegeben. Danach wird die Suspension 24 Stunden bei 4 °C geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Zur Konzentrationsbestimmung wird ein Mikroliter der Eispension auf einen Objektträger pipettiert, ausgezählt und anschließend auf einen Milliliter umgerechnet. Optimal ist eine Konzentration von 1 Mio. Eier/ml. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass auch 200.000 Eier/ml ausreichend sind.

Die Eispension wird frisch hergestellt und kann gekühlt bei 4 °C bis zu einem Jahr aufbewahrt werden.

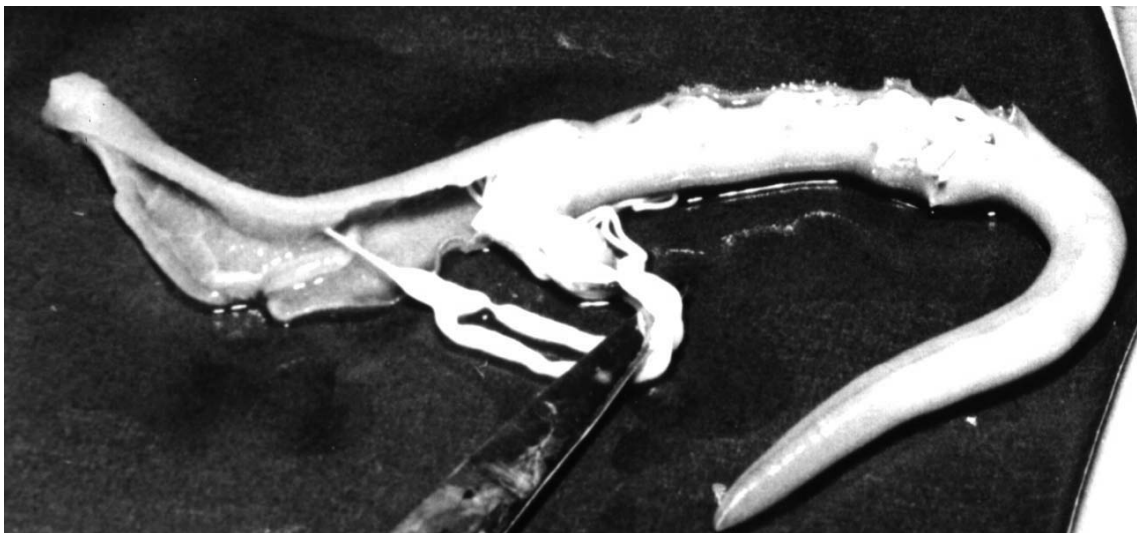


Abbildung 12: Spulwurmpräparation zur Gewinnung von Eiern von *Ascaris suum* (SCHWARZ, 2003)

### Bacillus globigii-Sporen

Eine Stammkulturen-Sporensuspension wird mit Wasser auf die benötigte Menge verdünnt. Nun werden Hefeextrakt-Agar (MYA)-Platten mit der Impfsuspension geflutet, so dass die gesamte Oberfläche des Agars benetzt wird. Der überschüssige Überstand wird abpipettiert. Auch die Anzahl der MYA-Platten richtet sich nach der benötigten Menge an *Bacillus globigii*-Sporensuspension.

Die Platten werden 3 Tage aerob bei 37 °C bebrütet. Danach wird der Zustand der Kultur unter einem Mikroskop beurteilt und die Bebrütung weitere 7 bis 10 Tage aerob bei 30 °C fortgesetzt. Danach werden die Kulturen mit Wasser abgeschwemmt. Die Konzentration der so erhaltenen Suspension wird mit Hilfe des Koch'schen Oberflächenverfahrens bestimmt.

#### **3.4.2 Herstellen einer Verdünnungsreihe**

Der erste Schritt zur Quantifizierung von Mikroorganismen mit kulturellen Verfahren ist die Herstellung einer Verdünnungsreihe. Hierzu werden, falls nicht anders angegeben, 20 g des zu untersuchenden Substrates in 180 ml einer 0,9 %igen Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl)<sup>2</sup> eingewogen und über Nacht im Kühlraum bei 4°C auf den Schüttler<sup>3</sup> verbracht.

Aus dieser Vorverdünnung ( $10^{-1}$ ) erfolgt der Ansatz einer dekadischen Verdünnungsreihe, d.h. es wird 1 ml aus der Vorverdünnung entnommen, in 9 ml 0,9 %ige NaCl pipettiert und auf dem Reagenzglasschüttler vermischt. Aus dieser Verdünnungsstufe 2 ( $10^{-2}$ ) wird wiederum 1 ml in 9 ml 0,9 %ige NaCl pipettiert (Erreichen der Verdünnungsstufe 3 ( $10^{-3}$ )). Die Probe wird soweit herunterverdünnt, bis die gewünschte Endverdünnungsstufe erreicht ist.

---

<sup>2</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.06400.9025

<sup>7</sup> Lab. Shaker, Adolf-Kühner AG, Basel, Switzerland

### 3.4.3 Most Probable Number (MPN) – Verfahren

Dem MPN-Verfahren ist das Herstellen einer Verdünnungsreihe vorgeschaltet, 1 g des zu untersuchenden Materials wird in 9 ml sterile 0,9 %ige Kochsalzlösung abgewogen und gut geschüttelt. Damit ist die erste Verdünnungsstufe einer dekadischen Verdünnungsreihe angelegt worden. Es folgen weitere 1:10-Verdünnungen bis zur erwarteten Keimzahl.

Danach werden aus jeder der Verdünnungsstufen je 1 ml in drei parallele Röhrchen überimpft, die jene Anreicherungsbouillon enthält, die dem jeweiligen nachzuweisenden Bakterium entspricht. Nach dem Aufschütteln werden die Röhrchen verschlossen und je nach Bakterienart aerob bei 37 °C oder mikroaerophil bei 43 °C bebrütet.

Daran schließt sich die Überimpfung auf einen oder mehrere Selektivnährböden an. Man teilt die Platte in drei gleich große Teile, taucht die ausgeglühte und abgekühlte Öse nacheinander in jedes der Parallelröhrchen und streicht auf je einem Drittel der Platte aus. Nun werden die Agarplatten aerob bei 37 °C oder mikroaerophil bei 43 °C bebrütet. Meist kann man nach der Bebrütung anhand eines Farbumschlages bzw. Kolonienwachstums erkennen, welche Drittel positiv bzw. negativ zu bewerten sind. Man erhält auf diese Weise einen dreistelligen MPN-Code der anhand der korrigierten Tabelle nach DE MAN (1983) ausgewertet werden kann. Das MPN-Verfahren ermöglicht die direkte Zählung der „Lebendkeimzahl“ auch dann wenn nur eine geringe Keimzahl vorliegt.

### 3.4.4 Koch'sches Oberflächenverfahren

Bei diesem Verfahren wird im Vorfeld eine dekadische Verdünnungsreihe angefertigt. Anschließend werden aus jeder Verdünnungsstufe jeweils 0,1 ml entnommen und auf Standard-I-Agar überführt. Mit einem abgeflammt und abgekühlten Drahtspatel werden diese gleichmäßig auf der Platte verteilt. Nun werden die Platten aerob bei 37 °C 24 Stunden bebrütet. Am nächsten Tag werden die gewachsenen Kolonien pro Verdünnungsstufe ausgezählt und die Konzentration angegeben.

### 3.4.5 Plaque Test

Dieses Verfahren findet Anwendung beim Nachweis von Coliphagen und basiert auf der von APHA (1998) empfohlenen Nachweismethode für Isolierung und Identifizierung von Coliphagen aus Wasser und Abwasser.

Am Vortag wird eine Keimsuspension des entsprechenden Wirtsstammes hergestellt (siehe 3.4.6.7). Der in Röhrrchen gegossene TSB-Nähragar wird im Dampftopf verflüssigt und im Wasserbad bei 50 °C flüssig gehalten. Es wird eine Verdünnungsreihe von der zu untersuchenden Probe hergestellt und bis zur erwarteten Konzentration weiterverdünnt. Nun werden in zwei parallele Agarröhrrchen je 1 ml aus der jeweiligen Verdünnungsstufe, 1 ml der zugehörigen Wirtsstammesuspension und 0,8 ml 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TPTC) pipettiert. Das Gemisch wird geschüttelt und jeweils in eine Petrischale gegossen, die gemäß der entsprechenden Verdünnungsstufe beschriftet wurde. Der Ansatz wird aerob 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Das Wachstum des Wirtsstammes dokumentiert sich durch die Rosafärbung des Agars durch Umschlag des Indikators. In diesem roten Agar lassen sich die ungefärbten Plaques gut erkennen. Diese kommen dadurch zustande, dass die Coliphagen den Wirtsstamm zerstören. Die Plaques werden ausgezählt und der Mittelwert von den zwei Platten pro Verdünnungsstufe wird bestimmt. Das Ergebnis wird in PFU = plaque forming units in 1 ml Probe angegeben.

### 3.4.6 Nachweis ausgewählter Mikroorganismen

#### 3.4.6.1 Nachweis von Salmonellen

Benötigte Materialien:

- Gepuffertes Peptonwasser<sup>4</sup>
- Novobiocin
- Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon<sup>5</sup>
- Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar<sup>6</sup>

---

<sup>4</sup> Oxoid GmbH, D-46483 Wesel, Art.-Nr. CM 509

<sup>5</sup> Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art.-Nr. 1858-17

<sup>6</sup> Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art.-Nr. 0788-17

- Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS)-Agar<sup>7</sup>

#### Qualitativer Nachweis:

Um zu überprüfen, ob in den In- und Outputproben native Salmonellen vorhanden sind, werden 50 g der zu untersuchenden Probe in 450 ml gepuffertes Peptonwasser eingewogen. Zur Hemmung der Begleitflora wird 0,18 ml des Antibiotikum Novobiocin zugefügt und die Mischung über Nacht aerob bei 37 °C auf dem Schüttler (Pilot-Shaker, Adolf-Kühner AG Basel, Switzerland) geschwenkt.

Aus den Volumenprüfkörpern kann nur ca. 10 g Substrat gewonnen werden, welches in 90 ml gepuffertes Peptonwasser eingewogen wird (Inkubationszeit 37 °C, 24 Stunden). Danach werden 0,1 ml des Voranreicherungssubstrates in 10 ml Parallelansätze der Salmonellenanreicherungsbouillon nach Rappaport-Vassiliadis überimpft und 24 Stunden bei 37 °C und 43 °C bebrütet. Diese Methode soll dem Wachstumsoptimum der verschiedenen Salmonellenarten entsprechen.

Aus dieser Selektivanreicherung wird jeweils ein Dreiösenausstrich auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS)-Agar und Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar angefertigt. Die so beimpften Platten werden aerob 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Salmonellen wachsen auf BPLS-Agar in blaßrosafarbenen, durchsichtigen Kolonien. Im Nährboden ist Lactose enthalten, deren Abbau zu Säure durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot nach gelb angezeigt wird.

Die gramnegative Begleitflora wird auf XLD-Agar durch Natriumdesoxycholat und Citrat gehemmt. Durch die Prüfung von Xylose-Lactose- und Saccharosefermentation wird die daraus resultierende Säurebildung am Nährboden durch einen Farbumschlag des Indikators von Phenolrot nach Gelb angezeigt. Thiosulfat und Eisen-III-Citrat zeigen die Schwefelwasserstoffbildung durch die Ausfällung von schwarzem Eisensulfid in den schwarzen Kolonien an, woran auch Salmonellen zu erkennen sind. Besteht aufgrund der gewachsenen Kolonien Salmonellenverdacht, wird mit der Öse eine verdächtige Kolonie abgenommen und auf Standard-I-Agar ein Dreiösenausstrich angefertigt, der daraufhin aerob 24 Stunden bei 37 °C bebrütet wird. Auf diese Weise erhält man eine Reinkultur,

---

<sup>7</sup> Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art.-Nr. 1880-17

von der man mit der Öse eine Kolonie abnimmt und diese mittels der Objektträger-agglutination<sup>8</sup> mit speziellen Antiseren überprüft.

#### Quantitativer Nachweis:

Es wurde das MPN-Verfahren angewendet. Dazu wird von der zu untersuchenden Probe eine dekadische Verdünnungsreihe in steriler Kochsalzlösung angelegt. Aus diesen Verdünnungsstufen wird jeweils dreimal 1 ml aus jeder Verdünnungsstufe in je 9 ml gepuffertes Peptonwasser pipettiert. Daran schließt sich eine 24 stündige Bebrütung bei 37 °C an. Im Anschluss an diese Voranreicherung wird je 0,1 ml in drei parallelen Ansätzen in Röhrchen mit je 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon überimpft. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C werden Salmonellen auf XLD- bzw. BPLS-Agar nachgewiesen (siehe oben).

#### **3.4.6.2 Nachweis von Gesamcoliformen und Fäkalcoliformen (*Escherichia coli*)**

##### Benötigte Materialien:

- Flourocult-Laurylsulfat-Bouillon<sup>9</sup>
- Kovacz Indolreagenz<sup>10</sup>
- Natriumhydroxid-Lösung
- Wood`sche Lampe

Auch dieser Nachweis erfolgt nach dem Prinzip der MPN-Technik. Es werden Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Probe in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und je Verdünnungsstufe 1 ml in drei parallele Röhrchen mit Flourocult-Laurylsulfat-Bouillon pipettiert. Diese enthalten Durham-Röhrchen, mit Hilfe derer die Gasproduktion angezeigt werden kann. Anschließend wird 48 Stunden aerob bei 37 °C bebrütet. Nach dieser Inkubationszeit werden die Röhrchen auf Gasbildung hin überprüft.

---

<sup>8</sup> DADE Behring Vertriebs GmbH u. Co, D-65835 Liederbach, Art.-Nr. ORMT 191 c30 (Polyvalent 1) und ORMU 191 c30 (Polyvalent 2); SIFIN, D-13088 Berlin, Anitsalmonella O19; Becton Dickinson Deutschland GmbH, D-69006 Heidelberg, Art.-Nr. 2814-47; 2659-47; 2816-47; 2817-47; 2818-47; 2952-47 (Salmonella-Testsera-Anti O 2; 4; 7; 8; 9; 10)

<sup>9</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.12588.0100

<sup>10</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.09293.0100

Positiv werden jene bewertet, deren Durham-Röhrchen zu mindestens einem Drittel mit Gas gefüllt sind. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit der MPN-Technik.

Die positive Gasbildung gibt nur Auskunft darüber, dass es sich um Gesamtcoliforme handelt. Um die Konzentration an Fäkalcoliformen, respektive an *Escherichia coli* zu bestimmen, werden in alle gaspositiven Röhrchen je 0,5 ml NaOH-Lösung pipettiert und anschließend unter der Wood'schen Lampe die Fluoreszenz überprüft, die sich hellblau darstellt. In jedes Röhrchen, das sowohl positive Gasbildung als auch Fluoreszenz zeigt, wird nun 0,1 ml Kovacz-Indolreagenz gegeben. Positive Röhrchen erkennt man an einem kirschroten Ring auf der Flüssigkeitssäule.

Bei denjenigen, bei denen alle drei Kriterien (Gasbildung, Fluoreszenz und Indolreaktion) positiv waren, handelt es sich um Fäkalcoliforme, bzw. präsumptive *Escherichia coli*.

#### 3.4.6.3 Nachweis von Enterokokken

##### Benötigte Materialien:

- Azid-Dextrose (AD)-Bouillon<sup>11</sup>
- Kanamycin-Äsculin-Agar (KAA)<sup>12</sup>

Der quantitative Nachweis von Enterokokken erfolgt ebenfalls mit der MPN-Technik. Es wird mit der Herstellung einer Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung begonnen. Für die Anreicherung werden jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe in drei parallele Röhrchen mit 9 ml Azid-Dextrose-Bouillon überimpft. Anschließend wird 48 Stunden aerob bei 37 °C inkubiert. Anhand der Trübung in den Röhrchen wird beurteilt, welche Verdünnungsstufen auf Kanamycin-Äsculin-Agar überimpft werden sollen. Ist mindestens eines der drei Röhrchen getrübt, wird diese Stufe überimpft. Hierzu werden die Agar-Platten gedrittelt und je eine Öse pro Röhrchen ausgestrichen. Die Platten werden anschließend 48 Stunden aerob bei 37 °C bebrütet.

Fäkalstreptokokken bilden auf Kanamycin-Äsculin-Agar mit Eisen-III-Ionen einen dunkelgrünen bis schwarzen Komplex, der einen dunklen Hof um die Kolonien bildet. Jedes

<sup>11</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.01590.0500

<sup>12</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.05222.0500

Drittel der Platte, welches diese Kolonien zeigt, kann als positiv bewertet und nach dem MPN-Verfahren ausgewertet werden.

#### 3.4.6.4 Nachweis von *Campylobacter jejuni*

##### Benötigte Materialien:

- Preston Bouillon<sup>13</sup>
- Campylobacter-Selektiv-Agar<sup>14</sup>
- Blutagar<sup>15</sup>
- GasPak-Töpfe<sup>16</sup>
- AnaeroCult C<sup>17</sup>
- Api Campy<sup>18</sup>
- Cellulose Nitrat Filter (Porengröße 0,45 µm)<sup>19</sup>

Da aus den Prüfkörpern nur eine Menge von ca. 10 ml gewonnen werden kann, wird diese in 90 ml NaCl eingewogen und direkt im Verhältnis 1:10 weiter verdünnt. In Fall von *Campylobacter jejuni* wird auf die Vorverdünnung über Nacht bei 4 °C verzichtet, da dieses Bakterium streng mikroaerophil wächst. Die mikroaerophilen Bedingungen, d. h. mit einem Sauerstoffanteil von ca. 5 Vol% und einem Kohlendioxidanteil von ca. 10 Vol%, werden auf chemischem Wege in Gas-Pak-Anaerobiertöpfen gewährleistet. Aufgrund des hohen Anspruchs des Bakteriums an das Kulturmedium sollten sowohl Nährbouillon als auch Agarplatten immer frisch hergestellt werden (SCHULZE, 1996).

Aus den angefertigten Verdünnungsstufen werden jeweils 1 ml in 3 Parallelansätze mit je 9 ml Preston-Bouillon überimpft und mikroaerophil bei 42 °C für 48 Stunden inkubiert. Die Cellulose-Nitrate-Filter werden gedrittelt und auf die Campylobacter-Selektiv-Agarplatte

---

<sup>13</sup> Nährbouillon Nr. 2, Oxoid GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. CM 67; Preston Campylobacter Selective Supplement, Oxoid GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. SR 117 E; Campylobacter Growth Supplement, Oxoid GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. SR 084 E; Laked Horse Blood, Oxoid GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. 9918324 C

<sup>14</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.02248; Campylobacter Selective Supplement, Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.02249

<sup>15</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.10455

<sup>16</sup> Becton Dickinson GmbH, D-69006 Heidelberg, Art.-Nr. 60628

<sup>17</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 1.16275

<sup>18</sup> bioMérieux GmbH, D-72602 Nürtingen, Art.-Nr. 07038 B 20 800

<sup>19</sup> Sartorius AG, D-37070 Göttingen, Art.-Nr. 13806-47-ACN



aufgelegt. Nun werden je 0,1 ml aus jedem Ansatz der Voranreicherung auf je ein Drittel des Filters pipettiert. Anschließend wird 2 Stunden mikroaerophil bei 42 °C bebrütet.

Danach werden die Filter mit einer ausgeglühten abgekühlten Pinzette vom Agar entfernt und die Platten 48 Stunden mikroaerophil bei 42 °C bebrütet (STELZER, 1991). Die Filtermethode hat den Vorteil, dass *Campylobacter jejuni*, im Gegensatz zu der eventuellen Begleitflora, in der Lage ist den Filter durch schraubenartige Bewegungen zu durchdringen. Kolonien, die nach 2 Tagen gewachsen sind, gelten deshalb als *Campylobacter* verdächtig. Für die Verifizierung werden die verdächtigen Kolonien auf Blutagar überimpft und 48 Stunden bei 42 °C bebrütet. Weiterhin kann man mit dem API CAMPY-System und/oder dem Hellfeld-Durchlicht-Verfahren untersuchen (PALUSZAK, 2000).

Für die quantitative Analyse wird auch hier mit dem MPN-Verfahren vorgegangen. Eine Kolonie unter dem Filter ist bereits als Nachweis für *Campylobacter jejuni* aus dem untersuchten Röhrchen der jeweiligen Verdünnungsstufe als positiv zu bewerten.

#### **3.4.6.5 Nachweis von *Bacillus globigii***

In den Versuchen zur Bestimmung der Mindestaufenthaltszeit des Substrates im Reaktor werden Sporen von *Bacillus globigii* als biologischer „Tracer“ verwendet. Sporen dieses „Prüfbakteriums“ kommen natürlicherweise nicht in den biologischen Substraten vor, sie sind apathogen für Mensch und Tier, überstehen die Prozesseinwirkungen in Anaerobanlagen und sind wegen ihrer Eigenpigmentierung problemlos visuell nachweisbar.

##### Benötigte Materialien:

- Trypton-Glucose-Bouillon (TGB)
  - Zur Herstellung der Impfkultur von *Bacillus globigii*-Sporen:
    - Hefeextrakt: 2,5 g
    - Trypton: 5,0 g
    - Glucose: 1,0 g
    - Wasser (destilliert): 1.000 ml

- Hefeextrakt-Agar (MYA)
  - Zur Herstellung von *Bacillus globigii*-Sporen:
    - Pepton aus Fleisch: 10,0 g
    - Hefeextrakt: 2,0 g
    - MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O: 0,04 g
    - Agar: 15 g
    - Wasser (destilliert): 1.000 ml
- Zentrifuge mit einer Beschleunigung von 10.000 g

#### Probenherstellung:

Trypton-Glucose-Bouillon (TGB):

Die Bouillon wird in Portionen von je 10 bzw. 100 ml in Prüfröhrchen gegeben. Es wird im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums 7,2 ( $\pm$  0,2) gemessen bei 20 °C betragen.

#### **3.4.6.6 Nachweis von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis***

##### Benötigte Materialien:

- Herold's Egg Yolk Medium

Da aus den Probenprüfkörpern des Typ 1 nur ca. 10 ml Material rückgewonnen werden kann, werden diese in 90 ml sterile Kochsalzlösung eingewogen. Aufgrund der Empfindlichkeit des Bakteriums wird auf das Schütteln 24 Stunden bei 4 °C verzichtet und direkt eine Verdünnungsreihe angefertigt. Aus jeder Verdünnungsstufe der zu erwartenden Keimzahl wird mit einer abgeflamten abgekühlten Öse eingetaucht und auf den ebenfalls im Röhrchen gegossenen Herold` Egg Yolk Medium- Agar ausgestrichen. Anschließend werden die Röhrchen fest mit Deckeln verschlossen, um eine Kontamination während der langen Bebrütungsdauer zu verhindern. Nun werden die Röhrchen auf einen speziellen Reagenzglasständer verbracht, der ein Kippen möglich macht. In dieser Position verbleiben sie 4 Tage bei 37 °C. Nach dieser Zeit werden die Röhrchen aufgerichtet und weitere 8 Wochen bei 37 °C inkubiert. Bei der Auswertung erkennt man positive Röhrchen an einem Farbumschlag des Nährbodens, dem ein Indikator beigegeben ist, von grün nach gelb und an den typischen milchig-weißen

Kolonien. Eine Konzentrationsbestimmung kann nur annäherungsweise gemacht werden, da in diesem Fall weder das MPN-Verfahren noch das Koch'sche Oberflächenverfahren angewendet werden kann. Zeigt z. B. die vierte Verdünnungsstufe noch ein positives Ergebnis, die fünfte hingegen nicht mehr, liegt eine Konzentration von mindestens  $10^4$  KBE/ml vor.

#### **3.4.6.7 Nachweis von Coliphagen**

##### Benötigte Materialien:

- Wirtsstamm für Coliphage „Wildstamm“, *Escherichia coli*, DSM 12242
- Wirtsstamm für Coliphage T1, *Escherichia coli*, DSM 613
- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid<sup>20</sup>
- Trypticase-Soja-Agar (TSA) je 10 ml gegossen in große Reagenzgläser

Am Tag vor der Probenaufarbeitung muss eine Keimsuspension des entsprechenden Wirtstammes hergestellt werden. Da aus den Prüfkörpern nur eine Menge von 10 g gewonnen werden kann, werden diese in 90 ml sterile Kochsalzlösung eingewogen und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nun findet die Methode des unter Punkt 3.4.5 beschriebenen Plaque-Test Anwendung.

#### **3.4.6.8 Nachweis von Askarideneiern**

##### Benötigte Materialien:

- Schutzbrille
- Mundschutz
- Latexhandschuhe
- Schere
- Plastikpetrischalen

Ein wesentlicher Vorteil bei der Aufarbeitung der Proben ist die Tatsache, dass Askarideneier in Leitungswasser lange überlebensfähig sind. Man kann daher die Gazesäckchen zu den verschiedenen Probenahmezeiten aus den „Rapp-Prüfkörpern“ entfernen und bis zur

---

<sup>20</sup> Merck, D-64271 Darmstadt, Art.-Nr. 8380

Aufarbeitung bei 4 °C im Kühlraum in Leitungswasser aufbewahren. Außerdem wird ein Säckchen im Kühlraum als Kontrolle gelagert, um bei der Auswertung kein verfälschtes Ergebnis zu erhalten.

Bei der Rückgewinnung wird das Gazesäckchen vorsichtig unterhalb des Kabelbinders und an einer Seite aufgeschnitten. Es wird nun mit Leitungswasser sorgsam in die Petrischale abgeschwemmt. Anschließend wird 20 Tage bei 30 °C bebrütet. Um eine Austrocknung zu vermeiden, müssen die Schalen regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls Leitungswasser nachgefüllt werden. Um für die Auswertung des jeweiligen Versuches ein Vergleichsergebnis der normalen Entwicklung zu erhalten, wird mit der im Kühlraum gelagerten Laborkontrolle gleich verfahren. Nach Ablauf der Bebrütung werden pro Petrischale je 100 Eier bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop auf ihre Entwicklungsfähigkeit hin überprüft. Die so ermittelte Embryonierungsrate wird mit der mitgeführten Laborkontrollprobe, die als 100 % angenommen wird, verglichen.

### **3.5 Durchführung einer „direkten Prozessprüfung“**

Bei dieser Prüfung werden Prüforganismen an für die Einbringung und Entnahme der Proben geeigneten Öffnungen in den Gärbehälter eingebracht. Entweder werden sie an Lochblechen befestigt oder in speziellen Behältnissen in die Anlagen eingebracht. Die Prüforganismen sollten mindestens für die technisch vorgegebene oder nachgewiesene Mindestverweilzeit in den Fermenter eingebracht und nach der Entnahme auf deren Überlebensfähigkeit untersucht werden.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse an den halbtechnischen Anlagen und an einer Pasteurisierungseinheit (PE)**

#### **4.1.1 Ergebnisse der „Input-Output Analyse“**

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 3-5 im Überblick dargestellt. Um Informationen über den Bakterienstatus unterschiedlichster Substrate vor und nach der Vergärung zu erhalten, wurden regelmäßig sowohl das Beschickungsmaterial als auch das anaerob thermophil bzw. mesophil behandelte Endprodukt auf den Gehalt an ausgewählten Mikroorganismen untersucht, diese sind in der Regel native Salmonellen, Fäkalstreptokokken und Gesamtcoliforme bzw. Fäkalkcoliforme.

In keiner der 14 untersuchten Inputproben konnten native Salmonellen nachgewiesen werden.

In einem Fall (P6) lagen die Gesamt- bzw. -Fäkalcoliformen unter der Nachweisgrenze und einmal bei  $10^1$  KBE/g. Ansonsten bewegte sich ihre Konzentration im Bereich zwischen  $10^3$  und  $10^4$  KBE/g.

Die Konzentration der Fäkalstreptokokken bewegte sich im Bereich  $10^4$  bis  $10^5$  KBE/g. Nur in einem Fall lag die Konzentration bei  $10^3$  KBE/g (P6) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnis der Untersuchung des Beschickungsmaterial (Input) der Laboranlagen (Angaben in KBE/g)

Probennahme	GCF	FCF	FKS	Salmonellen
P1	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	n. n.
P2	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	n. n.
P3	$4,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	n. n.
P4	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$	n. n.
P5	$9,2 \times 10^1$	$9,2 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	n. n.
P6	n. n.	n. n.	$9,3 \times 10^3$	n. n.
P7	$2,4 \times 10^4$	$9,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	n. n.
P8	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	n. n.
P9	$4,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	n. n.
P10	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	n. n.
P11	$9,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	n. n.
P12	$2,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	n. n.
P13	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$	n. n.
P14	$9,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$	n. n.

GCF: Gesamtcoliforme

FCF: Fäkalcoliforme

FKS: Fäkalstreptokokken

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

Im Outputmaterial der mesophil gefaulten Substrate (35°C) konnten keine nativen Salmonellen nachgewiesen werden.

Gesamt- bzw. Fäkalcoliforme lagen in 2 Fällen unter der Nachweisgrenze und bewegten sich sonst im Bereich von  $10^0$  KBE/g bis  $10^2$  KBE/g. Gegenüber dem Inputmaterial fand eine Reduktion in der Anzahl dieser Mikroorganismen von ca. 2 Zehnerpotenzen statt.

Fäkalstreptokokken lagen in nur einem Fall bei  $10^2$  KBE/g, ansonsten bewegten sie sich im Bereich von  $10^3$  KBE/g bis  $10^4$  KBE/g. Gegenüber den Gehalten im unbehandelten Input war damit die Keimzahl in der Regel in den Outputproben nur um eine Zehnerpotenz reduziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ergebnis des Bakterienstatus nach der anaeroben mesophilen (35 °C) Faulung (Output) in Laboranlagen (Angaben in KBE/g)

Probennahme	GCF	FCF	FKS	Salmonellen
P1	$1,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	n. n.
P2	$2,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$2,3 \times 10^4$	n. n.
P3	$9,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	n. n.
P4	$9,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^4$	n. n.
P5	n. n.	n. n.	$2,3 \times 10^3$	n. n.
P6	$3,6 \times 10^0$	$3,6 \times 10^0$	$2,4 \times 10^3$	n. n.
P7	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	n. n.
P8	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$	n. n.
P9	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	n. n.
P10	n. n.	n. n.	$7,5 \times 10^3$	n. n.
P11	$3,6 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^3$	n. n.
P12	$3,8 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	$9,3 \times 10^3$	n. n.
P13	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^4$	n. n.
P14	$3,6 \times 10^0$	$3,6 \times 10^0$	$4,3 \times 10^3$	n. n.

GCF: Gesamtcoliforme

FCF: Fäkalcoliforme

FKS: Fäkalstreptokokken

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

Im Outputmaterial der thermophil gefaulten Substrate (55°C) konnten in keiner Probe Salmonellen, Gesamt- bzw. Fäkalcoliforme nachgewiesen werden.

Fäkalstreptokokken lagen in 5 Proben unter der Nachweisgrenze. Ansonsten bewegten sie sich im Bereich von  $10^0$  KBE/g bis  $10^2$  KBE/g. Gegenüber den Gehalten in den mesophil gefaulten Gärresten (Tabelle 4) war damit eine deutliche und weitergehende Reduktion bei den untersuchten Mikroorganismen erkennbar (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnis des Bakterienstatus nach der anaeroben thermophilen (55 °C) Faulung (Output) in den Laboranlagen (Angaben in KBE/g)

<b>Probennahme</b>	<b>GCF</b>	<b>FCF</b>	<b>FKS</b>	<b>Salmonellen</b>
P1	n. n.	n. n.	$9,3 \times 10^2$	n. n.
P2	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
P3	n. n.	n. n.	$9,2 \times 10^0$	n. n.
P4	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
P5	n. n.	n. n.	$2,3 \times 10^1$	n. n.
P6	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
P7	n. n.	n. n.	$3,6 \times 10^0$	n. n.
P8	n. n.	n. n.	$3,6 \times 10^0$	n. n.
P9	n. n.	n. n.	$2,3 \times 10^1$	n. n.
P10	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
P11	n. n.	n. n.	$1,5 \times 10^1$	n. n.
P12	n. n.	n. n.	$3,6 \times 10^0$	n. n.
P13	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
P14	n. n.	n. n.	$7,4 \times 10^0$	n. n.

GCF: Gesamtcoliforme

FCF: Fäkalcoliforme

FKS: Fäkalstreptokokken

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

#### 4.1.2 Tenazitätsversuche mit Prüforganismen in Laboranlagen

Die Prüforganismen wurden mit Hilfe der Prüfkörper Typ1 (siehe Punkt 3.3) in die Anlagen eingebracht, und mit Kabelbindern an Lochblechen befestigt. Es wurden verschiedene Zeiteinheiten gewählt, über die ausgewählte Prüforganismen dem Faulprozess ausgesetzt wurden (1, 3 und 24 Stunden). Diese Untersuchungen wurden an vier aufeinander folgenden Tagen im Parallelansatz (Probe A und B) wiederholt (siehe Tabelle 6).



#### 4.1.2.1 Prüforganismus: *Salmonella Senftenberg*

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 6 und 7 dargestellt.

Die Daten machen deutlich, dass schon nach einer Stunde im thermophilen Temperaturbereich *Salmonella Senftenberg* vollständig inaktiviert wird. Das bedeutet, dass innerhalb dieser Zeitspanne *Salmonella Senftenberg* W775  $H_2S^+$  und  $H_2S^-$  um sieben Zehnerpotenzen reduziert wurden.

Tabelle 6: Ergebnisse der Tenazität von *Salmonella Senftenberg* in den Prüfkörpern A und B\* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probenahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 1 Stunde aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 3 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	$9,2 \times 10^0$
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^7$  KBE/ml

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

Tabelle 7 zeigt, dass im mesophilen Temperaturbereich keine bzw. lediglich eine Reduktion von *Salmonella Senftenberg* um eine Zehnerpotenz stattfand.

Tabelle 7: Ergebnisse nach 24 Stunden Kontaktzeit von Salmonellen\* im mesophil betriebenen (35 °C) Reaktor (Angaben in KBE/g)

Tag der Probenentnahme	Probenansatz	Errechnete Keimzahl	Durchschnittliche Keimzahl
1.	A	$2,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
	B	$2,4 \times 10^7$	
2.	A	$2,4 \times 10^7$	
	B	$2,1 \times 10^6$	
3.	A	$9,3 \times 10^6$	
	B	$2,1 \times 10^6$	
4.	A	$9,3 \times 10^6$	
	B	$2,1 \times 10^6$	

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^7$  KBE/ml

KBE: koloniebildende Einheiten

#### 4.1.2.2 Prüforganismus: *Campylobacter jejuni*

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 8 und 9 dargestellt.

Die Daten in Tabelle 8 machen deutlich, dass schon nach einer Stunde im thermophilen Temperaturbereich *Campylobacter jejuni* vollständig inaktiviert wird. Somit wurde *Campylobacter jejuni* innerhalb einer Stunde bei 55 °C im anaeroben Faulraummilieu der Laboranlage um mindestens 5 Zehnerpotenzen reduziert.

Tabelle 8: Ergebnisse der Tenazität von *Campylobacter jejuni* in den Prüfkörpern A und B\* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 1 Stunde aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 3 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^5$  KBE/ml

KBE: Koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich wird, findet im mesophilen Temperaturbereich (35 °C) bei einer Aufenthaltszeit von 3 Stunden lediglich eine Reduktion des Prüforganismus *Campylobacter jejuni* um eine Zehnerpotenz statt.

Bei einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden konnte das Bakterium zwar an einem Versuchstag eliminiert, an den 3 folgenden Versuchstagen allerdings nur um zwei Zehnerpotenzen reduziert werden.

Tabelle 9: Ergebnisse der Tenazität von *Campylobacter jejuni* in den Prüfkörpern A und B\* nach 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 3 Stunden aus dem Mesophilreaktor	1.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
	2.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
	3.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
	4.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Mesophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^3$
	3.	A	$2,3 \times 10^3$
		B	$2,4 \times 10^3$
	4.	A	$1,5 \times 10^3$
		B	$9,2 \times 10^3$

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^5$  KBE/ml

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

#### 4.1.2.3 Prüforganismus: *Enterococcus faecalis*

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 10 und 11 dargestellt.

Die Tabelle 10 verdeutlicht, dass der Prüforganismus *Enterococcus faecalis* im thermophilen Temperaturbereich (55 °C) bei einer Aufenthaltszeit von einer Stunde im Laborreaktor um drei Zehnerpotenzen reduziert werden konnte. Ab einer Aufenthaltszeit von drei Stunden wurde der Prüforganismus vollständig eliminiert und damit um mindestens sieben Zehnerpotenzen reduziert.

Bei mesophiler Betriebsweise (35 °C) der Laboranlage und einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden konnte der Prüforganismus *Enterococcus faecalis* um ein bis zwei Zehnerpotenzen reduziert werden (siehe Tabelle 11).

Tabelle 10: Ergebnisse der Tenazität von *Enterococcus faecalis* in den Prüfkörpern A und B\* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 1 Stunde aus dem Thermophilreaktor	1.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$4,3 \times 10^4$
	2.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
	3.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
	4.	A	$2,3 \times 10^4$
		B	$2,3 \times 10^4$
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 3 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	n. n.
		B	n. n.
	2.	A	n. n.
		B	n. n.
	3.	A	n. n.
		B	n. n.
	4.	A	n. n.
		B	n. n.

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^7$  KBE/ml

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

Tabelle 11: Ergebnisse der Tenazität von *Enterococcus faecalis* in den Prüfkörpern A und B\* nach 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Mesophilreaktor	1.	A	$2,3 \times 10^5$
		B	$2,3 \times 10^4$
	2.	A	$2,3 \times 10^5$
		B	$2,3 \times 10^4$
	3.	A	$2,4 \times 10^7$
		B	$2,3 \times 10^6$
	4.	A	$1,5 \times 10^7$
		B	$9,2 \times 10^6$

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^7$  KBE/ml

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

#### 4.1.2.4 Prüforganismus: *Coliphage* „Wildstamm“

Die Ergebnisse der Tenazitätsprüfungen sind in Tabelle 12 und 13 dargestellt.

Die Daten der nachfolgenden Tabelle 12 dokumentieren, dass *Coliphage* „Wildstamm“ im thermophilen Temperaturbereich (55 °C) nach einer Stunde im Laborreaktor nicht reduziert wird. Nach drei Stunden fand lediglich eine Verminderung der Anzahl um eine Zehnerpotenz statt. Auch eine Aufenthaltszeit von 24 Stunden reichte nicht aus, um den Coliphagen „Wildstamm“ zu inaktivieren. Er wurde nur um zwei Zehnerpotenzen reduziert.

Tabelle 12: Ergebnisse der Tenazität des *Coliphagen* „Wildstamm“ in den Prüfkörpern A und B\* nach 1, 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (55 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 1 Stunde aus dem Thermophilreaktor	1.	A	$1,2 \times 10^5$
		B	$8,0 \times 10^5$
	2.	A	$6,8 \times 10^4$
		B	$9,0 \times 10^3$
	3.	A	$3,0 \times 10^5$
		B	$2,4 \times 10^5$
	4.	A	$7,0 \times 10^4$
		B	$1,5 \times 10^5$
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 3 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	$3,1 \times 10^4$
		B	$8,0 \times 10^3$
	2.	A	$3,8 \times 10^4$
		B	$2,5 \times 10^4$
	3.	A	$3,0 \times 10^4$
		B	$3,6 \times 10^4$
	4.	A	$2,8 \times 10^4$
		B	$2,0 \times 10^4$
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Thermophilreaktor	1.	A	$1,2 \times 10^3$
		B	$3,1 \times 10^3$
	2.	A	$2,4 \times 10^3$
		B	$1,1 \times 10^4$
	3.	A	$1,5 \times 10^3$
		B	$3,0 \times 10^3$
	4.	A	$2,0 \times 10^3$
		B	$1,8 \times 10^3$

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^5$  KBE/ml

PFU: plaque forming units

n. n.: nicht nachweisbar

Die thermophile Betriebsweise des Laborreaktors reichte nicht aus, um den Prüforganismus *Coliphage „Wildstamm“* zu eliminieren (Tabelle 12), im mesophilen Temperaturbereich (35 °C) wurde sogar eine Vermehrung um ein bis zwei Zehnerpotenzen gegenüber der Nullprobe festgestellt (Tabelle13).

Es muss jedoch angemerkt werden, dass in der Laborphase der bis dato unbekannte *Coliphage „Wildstamm“* noch zusammen mit seinem Wirtsstamm *Escherichia coli* in die Prüfkörper eingebracht wurde, was möglicherweise der Grund für die Zunahme im mesophilen Temperaturbereich war. In späteren Versuchen mit dem definierten *Coliphagen* T1, der ohne Wirtsstamm eingebracht wurde, fand auch bei mesophilen Temperaturen im anaeroben Milieu keine Zunahme statt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Tenazität des *Coliphagen „Wildstamm“* in den Prüfkörpern A und B\* nach 3 und 24 Stunden Kontaktzeit in der Laboranlage (35 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 3 Stunden aus dem Mesophilreaktor	1.	A	$1,5 \times 10^7$
		B	$7,0 \times 10^7$
	2.	A	$2,3 \times 10^7$
		B	$1,5 \times 10^7$
	3.	A	$2,0 \times 10^7$
		B	$2,4 \times 10^7$
	4.	A	$2,5 \times 10^7$
		B	$4,0 \times 10^7$
Entnahme der Prüfkörper A und B nach 24 Stunden aus dem Mesophilreaktor	1.	A	$2,0 \times 10^7$
		B	$7,0 \times 10^7$
	2.	A	$4,2 \times 10^7$
		B	$3,0 \times 10^6$
	3.	A	$4,1 \times 10^7$
		B	$7,5 \times 10^6$
	4.	A	$8,0 \times 10^6$
		B	$4,0 \times 10^7$

\*: Konzentration in der Nullprobe  $10^5$  KBE/ml

PFU: plaque forming units



#### **4.1.3 Tenazitätsversuche mit Prüforganismen in einer Pasteurisierungseinheit (PE)**

Es wurden jeweils vier Versuchsdurchgänge an der Pasteurisierungseinheit (ca. 60 l Inhalt) mit je zwei Parallelen pro Prüforganismus (*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, *Ascaris suum*-Eier, *Enterococcus faecalis*, *Coliphage T1* und *Coliphage „Wildstamm“*) durchgeführt.

##### **4.1.3.1 Prüforganismus: *Enterococcus faecalis***

Die Ergebnisse der Tenazitätsprüfung sind in Tabelle 14 dargestellt.

Die Daten verdeutlichen, dass der Prüforganismus *Enterococcus faecalis* nach 10 Minuten Aufenthaltszeit in der Pasteurisierungseinheit bei einer Betriebstemperatur von 70 °C lediglich eine Reduktion von einer Zehnerpotenz erfährt, wohingegen bei derselben Aufenthaltszeit jedoch bei 80 °C der Prüforganismus um drei Zehnerpotenzen reduziert werden konnte.

Bei Verlängerung der Aufenthaltszeit, findet schon nach 20 Minuten bei 70 °C eine Reduktion um zwei bis drei Zehnerpotenzen statt. Nach 30 Minuten konnte die Konzentration um sechs Zehnerpotenzen verringert werden und ab 60 Minuten Kontaktzeit bei 70 °C konnte *Enterococcus faecalis* eliminiert werden. Aufgrund der weitgehenden Reduktion von *Enterococcus faecalis* nach 30 und 60 Minuten Kontaktzeit bei 70 °C bzw. nach 10 min bei 80 °C wurden die Kontaktzeiten 20, 30 und 60 Minuten bei 80 °C nicht durchgeführt.

Tabelle 14: Ergebnisse der Tenazität von *Enterococcus faecalis* in den Prüfkörpern A und B\* nach 10, 20, 30 und 60 Minuten Kontaktzeit in der Pasteurisierungseinheit bei 70 °C und nach 10 Minuten bei 80 °C an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probenahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Entnahme nach 10 Minuten	Entnahme nach 20 Minuten	Entnahme nach 30 Minuten	Entnahme nach 60 Minuten
Betriebs- temperatur des Labor- pasteurs 70 °C	1.	A	$4,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$9,2 \times 10^1$	n. n.
		B	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^1$	n. n.
	2.	A	$9,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^1$	n. n.
		B	$3,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^1$	n. n.
	3.	A	$4,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^1$	n. n.
		B	$3,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^0$	n. n.
	4.	A	$3,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	n. n.
		B	$1,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^0$	n. n.
Betriebs- temperatur des Labor- pasteurs 80 °C	1.	A	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
		B	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
	2.	A	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
		B	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
	3.	A	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
		B	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
	4.	A	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.
		B	$2,3 \times 10^4$	n. d.	n. d.	n. d.

\*: Konzentration in der Nullprobe  $1,5 \times 10^7$  KBE/ml

PK: Prüfkörper

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

n. d.: nicht durchgeführt

#### 4.1.3.2 Prüforganismus: *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Die Werte dokumentieren, dass der Prüforganismus *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in der Pasteurisierungseinheit sowohl bei einer Betriebstemperatur von 90 °C und 30 bzw. 60 Minuten Aufenthaltszeit als auch schon bei einer

Betriebstemperatur von 70 °C und 30 bzw. 60 Minuten Aufenthaltszeit vollständig eliminiert bzw. inaktiviert wird.

Tabelle 15: Ergebnisse der Tenazität von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in den Prüfkörpern A und B\* nach 30 und 60 Minuten Kontaktzeit in der Pasteurisierungseinheit (70 °C und 90 °C) an je 4 Folgetagen (Angaben in KBE/g)

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Errechnete Keimzahl	
			nach 30 Minuten	nach 60 Minuten
Betriebstemperatur des Laborpasteurs 70 °C	1.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
	2.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
	3.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
	4.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
Betriebstemperatur des Laborpasteurs 90 °C	1.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
	2.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
	3.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.
	4.	A	n. n.	n. n.
		B	n. n.	n. n.

\*: Konzentration in der Nullprobe 10<sup>5</sup> KBE/ml

KBE: koloniebildende Einheiten

n. n.: nicht nachweisbar

#### 4.1.3.3 Prüforganismus: *Coliphage T1*

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle 16 dargestellt.

Es wird deutlich, dass der Prüforganismus *Coliphage T1* sowohl nach 10 und 20 Minuten bei einer Betriebstemperatur der Pasteurisierungseinheit von 70 °C, als auch nach 10 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 80 °C lediglich eine Reduktion um eine Zehnerpotenz erfährt. Nach 30 Minuten bei 70 °C findet eine Reduktion um zwei Zehnerpotenzen statt.

Tabelle 16: Ergebnisse der Tenazität von *Coliphage T1* in den Prüfkörpern A und B\* nach 10, 20, 30 und 60 Minuten Kontaktzeit bei einer Betriebstemperatur der Pasteurisierungseinheit von 70 °C und nach 10 und 20 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 80 °C an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)

	Tag der Probenahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Entnahme nach 10 Minuten	Entnahme nach 20 Minuten	Entnahme nach 60 Minuten	Entnahme nach 90 Minuten
Betriebs- temperatur des Labor- pasteurs 70 °C	1.	A	$3,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$9,0 \times 10^1$	n. n.
		B	$4,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^2$	n. n.
	2.	A	$6,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	n. n.	n. n.
		B	$5,8 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	n. n.	n. n.
	3.	A	$1,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^2$	n. n.
		B	$3,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	n. n.	n. n.
	4.	A	$3,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$	n. n.
		B	$2,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$	n. n.
Betriebs- temperatur des Labor- pasteurs 80 °C	1.	A	$3,8 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$3,4 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
	2.	A	$2,9 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$3,3 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
	3.	A	$2,5 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$1,4 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
	4.	A	$3,0 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$1,9 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.

\*: Konzentration in der Nullprobe  $5,1 \times 10^5$  KBE/ml

PFU: plaque forming units

n. n.: nicht nachweisbar

n. d.: nicht durchgeführt

Ab 60 Minuten konnte der Prüforganismus bei 70 °C teilweise bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden. Die Aufenthaltszeit wurde deshalb auf 90 Minuten verlängert. Ab dieser Zeitstufe konnte der Prüforganismus in allen Parallelen an jeweils 4 Folgetagen nicht mehr nachgewiesen werden. Wird die Aufenthaltszeit bei 80 °C auf 20 Minuten verlängert, wird der Prüforganismus inaktiviert.

#### **4.1.3.4 Prüforganismus: *Coliphage „Wildstamm“***

Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Die Daten der Tabelle 17 verdeutlichen, dass der Prüforganismus *Coliphage „Wildstamm“* sowohl nach 10 und 20 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 70°C, als auch nach 10 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 80 °C lediglich eine Reduktion um eine Zehnerpotenz erfährt. Nach 30 Minuten bei 70 °C findet eine Reduktion um zwei Zehnerpotenzen statt.

Ab 60 Minuten konnte der Prüforganismus bei 70 °C nicht mehr nachgewiesen werden. Bei 80 °C und 20 Minuten Kontaktzeit kann der Prüforganismus ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 17: Ergebnisse der Tenazität von *Coliphage „Wildstamm“* in den Prüfkörpern A und B\* nach 10, 20, 30 und 60 Minuten bei einer Betriebstemperatur der Pasteurisierungseinheit von 70 °C und nach 10 und 20 Minuten bei einer Betriebstemperatur von 80 °C an je 4 Folgetagen (Angaben in PFU/g)

	Tag der Proben-nahme	Parallel-ansatz der Prüfkörper	Entnahme nach 10 Minuten	Entnahme nach 20 Minuten	Entnahme nach 30 Minuten	Entnahme nach 60 Minuten
Betriebs-temperatur des Labor-pasteurs 70 °C	1.	A	$3,9 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$	n. n.
		B	$4,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$5,7 \times 10^2$	n. n.
	2.	A	$4,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$6,4 \times 10^2$	n. n.
		B	$3,9 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	n. n.
	3.	A	$3,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	n. n.
		B	$4,7 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3$	n. n.
	4.	A	$4,1 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	n. n.
		B	$3,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$	n. n.
Betriebs-temperatur des Labor-pasteurs 80 °C	1.	A	$3,8 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$3,6 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
	2.	A	$3,5 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$3,7 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
	3.	A	$3,8 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$3,7 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
	4.	A	$4,2 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.
		B	$3,9 \times 10^4$	n. n.	n. d.	n. d.

\*: Konzentration in der Nullprobe  $2,3 \times 10^5$  KBE/ml

PFU: plaque forming units

n. n.: nicht nachweisbar

n. d.: nicht durchgeführt

#### 4.1.3.5 Prüforganismen: Eier von *Ascaris suum*

Die Ergebnisse der Tenazitätsprüfung mit Eiern von *Ascaris suum* sind in Tabelle 18 dargestellt. Es wird deutlich, dass sich aus den Eiern von *Ascaris suum* nach einer Behandlung in der Pasteurisierungseinheit sowohl bei einer Betriebstemperatur von 90 °C und 30 bzw. 60 Minuten Aufenthaltszeit als auch schon bei einer Betriebstemperatur von 70 °C und 30 bzw. 60 Minuten Aufenthaltszeit keine Larven entwickelten. Das bedeutet, dass durch die Hitzeeinwirkung im Laborpasteur die Entwicklung der Parasitenstadien zur infektiösen Larve II nicht mehr stattgefunden hat. Die Parasitendauerstadien haben somit mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ihre Infektiosität verloren.

Tabelle 18: Ergebnisse der Tenazität von *Ascaris suum* (180.000 Eier/ml) in den Prüfkörpern A und B nach 30 und 60 Minuten Kontaktzeit in der Pasteurisierungseinheit (70 °C und 90 °C) an je 4 Folgetagen

	Tag der Probennahme	Parallelansatz der Prüfkörper	Entwickelte Larven (in %)	
			nach 30 Minuten	nach 60 Minuten
Betriebstemperatur des Laborpasteurs 70 °C	1.	A	0	0
		B	0	0
	2.	A	0	0
		B	0	0
	3.	A	0	0
		B	0	0
	4.	A	0	0
		B	0	0
Betriebstemperatur des Laborpasteurs 90 °C	1.	A	0	0
		B	0	0
	2.	A	0	0
		B	0	0
	3.	A	0	0
		B	0	0
	4.	A	0	0
		B	0	0

#### **4.1.4 Versuche zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit (Mindestaufenthaltszeit) von Substratpartikeln in den beiden Laboranlagen**

Die Ergebnisse zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit mit *Bacillus globigii* in zwei Laboranlagen sind in Tabelle 19 dargestellt.

Es wurden 150 ml *Bacillus globigii*-Sporensuspension in einer Konzentration von  $10^8$  Sporen/ml zusammen mit dem Beschickungsmaterial in den Thermophilreaktor eingebracht. Am Output wurde vor dieser Beschickung eine Probe gezogen, direkt nach der Beschickung, nach 20 Minuten (gleich nachdem das Rührwerk das erste Mal lief), nach 30 Minuten, nach 40 Minuten, nach 24 Stunden, nach 48 Stunden und nach 1 Woche.

*Bacillus globigii* konnte das erste Mal nach 30 Minuten nachgewiesen werden. Auch alle nachfolgend gezogenen Proben waren positiv ( $3 \times 10^4$  Sporen/ml).

Es sollte nun überprüft werden, ob auch eine geringere Menge an Sporensuspension verwendet werden kann, denn das Ziel war, diesen Laborversuch auf die Praxisanlagen zu übertragen. Daher wurden für den nächsten Versuch nur 10 ml einer *Bacillus globigii*-Sporensuspension mit einer Konzentration von  $10^8$  Sporen/ml angewandt. Diese Menge wurde zusammen mit dem Beschickungsmaterial in den Mesophilreaktor eingebracht. Es wurden am Output Proben vor der Beschickung, sofort nach der Beschickung, nach 20 Minuten (nachdem das Rührwerk das erste Mal lief), nach 30 Minuten, 40 Minuten, 60 Minuten und nach 24 Stunden sowie nach einer Woche gezogen.

*Bacillus globigii* konnte das erste Mal nach 30 Minuten nachgewiesen werden. Auch alle nachfolgend gezogenen Proben waren positiv ( $5 \times 10^4$  Sporen/ml).

Da sich diese Methode zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit von Substratpartikeln in einer Laboranlage als praktikabel erwies, wurden die Versuche auf die großtechnischen Anlagen übertragen.



Tabelle 19: Ergebnisse zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit (Mindestaufenthaltszeit) mit Hilfe von *Bacillus globigii*-Sporensuspension (Konzentration  $10^8$  Sporen/ml) an zwei Laboranlagen, Zeitspanne zwischen Einbringen der Sporensuspension und Nachweis am Austrag (Output) der Anlagen

<b>Auftreten von <i>Bacillus globigii</i> am Output</b>	sofort	nach 20 Minuten	nach 30 Minuten	nach 40 Minuten	nach 24 Stunden	nach 48 Stunden	nach 1 Woche
bei Einbringen von 10 ml Sporensuspension mit einer Konzentration von $10^8$ /ml	-	-	+	+	+	+	+
bei Einbringen von 150 ml Sporensuspension mit einer Konzentration von $10^8$ /ml	-	-	+	+	+	+	+

-: Nachweis nicht möglich

+: Nachweis möglich

## 4.2 Ergebnisse der Praxisanlagen

### 4.2.1 Vorbemerkung

Die Ergebnisse und Erkenntnisse, die bei den umfangreichen Untersuchungen in Laboranlagen erzielt wurden, sollten in Praxisanlagen verifiziert werden.

Da sich *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* und *Ascaris suum*-Eier als weniger resistent zeigten als erwartet, bzw. sich als sehr aufwändig in der Aufarbeitung erwiesen, wurde auf diese Prüforganismen in den großtechnischen Anlagen verzichtet. Außerdem handelt es sich bei diesen drei Vertretern um pathogene Mikroorganismen und Parasiten. Ihr Einsatz als „Prüforganismen“ zur Überprüfung der „hygienischen Wirksamkeit“ von Anaerobanlagen auf landwirtschaftlichen Betrieben mit Tierhaltung wäre daher nur mit einem erhöhten, nicht eindeutig kalkulierbaren Infektionsrisiko der Tierbestände verbunden und nur gerechtfertigt, wenn die anderen verwendeten Prüfkeime sie nicht in der Tenazitätsprüfung abdecken würden.

Zu *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* wurden Coliphagen als „Alternativorganismen“ eingesetzt, da sich diese im Laborversuch als äußerst resistent zeigten. Es wurde jeweils ein definierter Phagenstamm (T1) und ein nicht definierter aus Gülle isolierter Stamm (*Wildstamm*) in die Anlagen eingebracht, um deren Überlebensfähigkeit in den Anaerobprozessen zu überprüfen.

Zusätzlich zu den Tenazitätsuntersuchungen wurden In- und Outputanalysen an den Anlagen A – F durchgeführt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse an den großtechnischen Anlagen dargestellt.

#### 4.2.2 In- und Outputanalysen der Anlage A (mesophil 42 - 47 °C)

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 zusammenfassend dargestellt.

Es zeigt sich, dass in allen Proben keine Salmonellen nachzuweisen waren.

In den Produktproben (Input) bewegte sich die Anzahl der Fäkalstreptokokken im Bereich von  $10^5$  KBE/g in den Proben aus dem Fermenter und dem Lager im Bereich von  $10^4$  KBE/g. Man kann also lediglich eine Reduktion der Anzahl der Fäkalstreptokokken um eine Zehnerpotenz erkennen.

Im Gegensatz hierzu lässt sich bei den Coliformen im Inputmaterial eine Konzentration von  $10^4$  KBE/g erkennen, die im Fermenter und Nachlager um zwei bis drei Zehnerpotenzen reduziert werden.

Zur Darstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet. Dieser wurde aus den Einzelwerten berechnet, die im Anhang dargestellt sind (Tabelle A 1 – A 2).

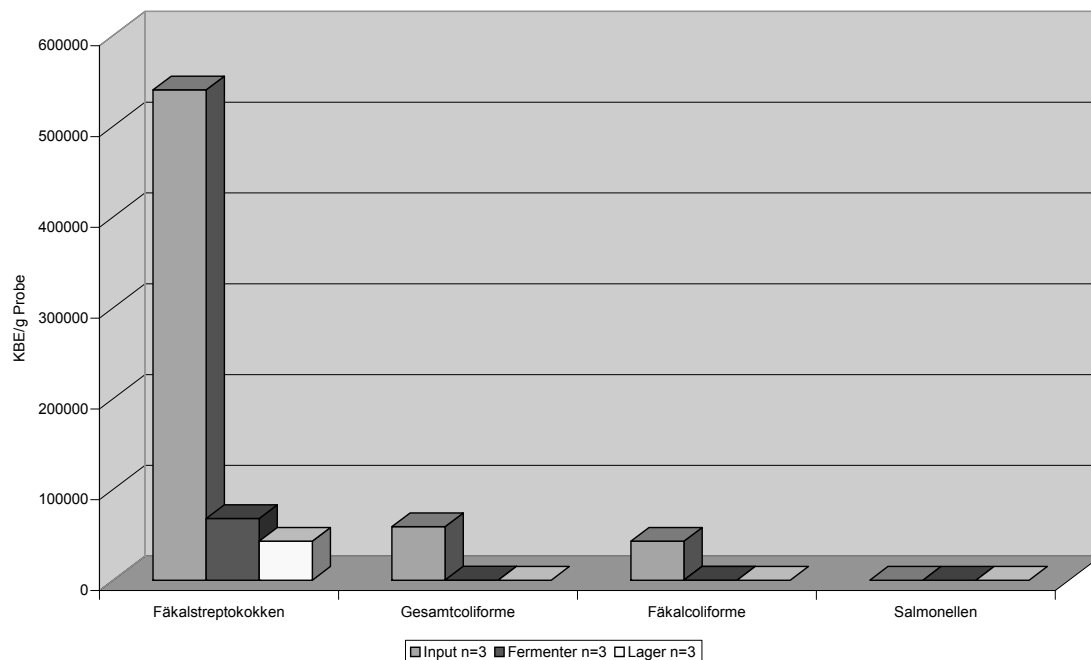


Abbildung 13: In- und Outputanalysen an der Anlage A (42 - 47 °C)

### 4.2.3 In- und Outputanalysen der Anlage B (mesophil 45 - 49 °C)

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 14 zusammenfassend dargestellt.

Aus keiner Probe ließen sich Salmonellen nachweisen.

Sowohl bei den Fäkalstreptokokken als auch bei den Coliformen lässt sich eine Reduktion der Anzahl im Fermenter und Lager im Vergleich zum Inputmaterial um mindestens zwei Zehnerpotenzen erkennen.

Zur Erstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet. Die Einzelwerte sind aus Tabellen A 3 - A 6 im Anhang zu entnehmen.

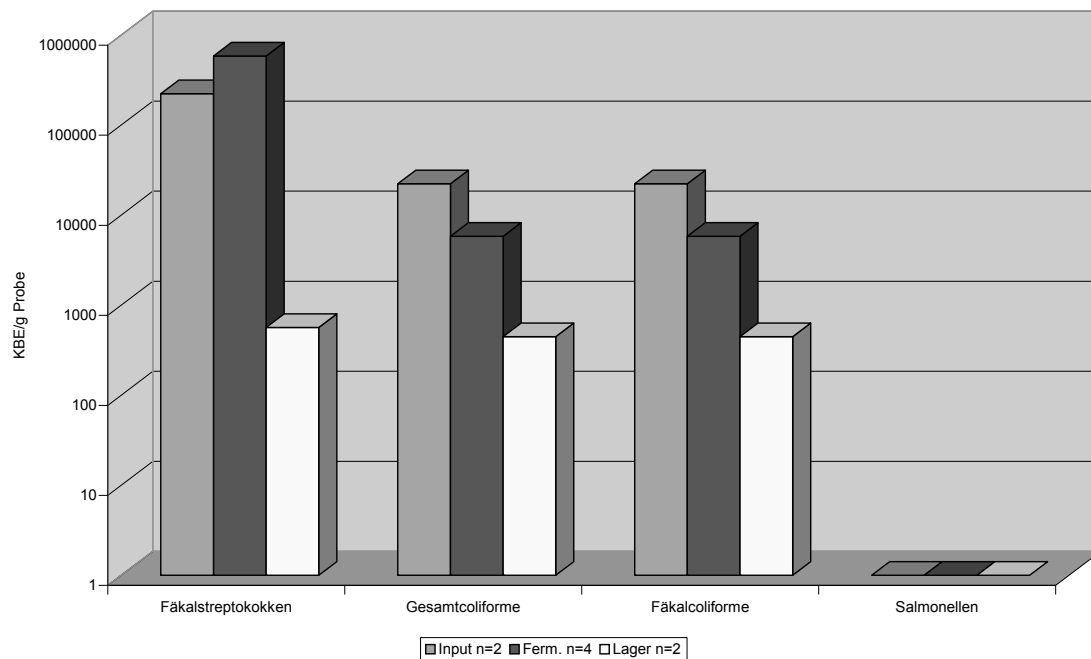


Abbildung 14: In- und Outputanalysen an der Anlage B (45 - 49 °C)

#### 4.2.4 In- und Outputanalysen der Anlage C (mesophil 47 °C mit vorgeschalteter Hygienisierungseinheit)

Die Ergebnisse werden in Abbildung 15 zusammenfassend dargestellt.

Es wird deutlich, dass eine Reduktion in der Anzahl der Mikroorganismen im Vergleich zum Input (Gülle) und nachgeschaltetem Fermenter um vier bis sechs Zehnerpotenzen, bis teilweise unter die Nachweisgrenze, stattfindet.

In allen Inputproben konnten Salmonellen qualitativ (Serovar 0:7) nachgewiesen werden, die ebenfalls nach der Hygienisierung unter die Nachweisgrenze fielen. Da keine quantitative Analyse der Salmonellen stattfand, erscheinen diese nicht in der Abbildung. Die vorgeschaltete Hygienisierung bei 70 °C über 4-5 Stunden hat alle eingesetzten Prüfororganismen bis unter deren Nachweisgrenze reduziert, auch die in dieser Anlage berücksichtigten Coliphagen. Allerdings waren diese in der unbehandelten Gülle in einer Konzentration von ca.  $10^2$  KBE/g vorhanden.

Zur Erstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet. Die Einzelwerte sind aus Tabellen A 7 - A 10 im Anhang zu entnehmen.

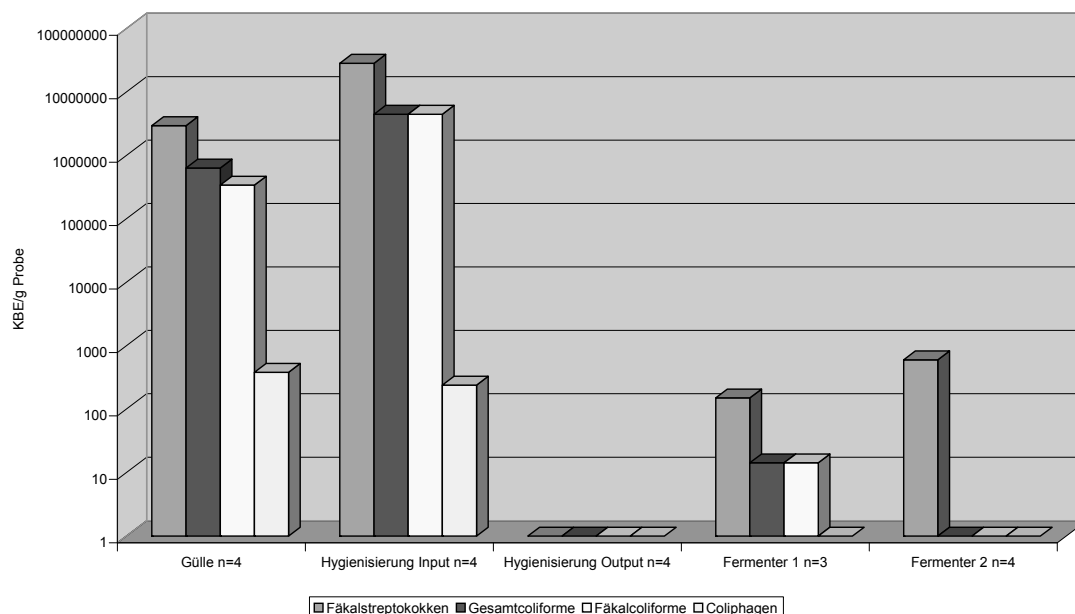


Abbildung 15: In- und Outputanalysen an der Anlage C (mesophil 47 °C mit vorgeschalteter Pasteurisierungseinheit)

#### 4.2.5 In- und Outputanalysen der Anlage D (mesophil 43 °C)

Die Ergebnisse werden in Abbildung 16 zusammenfassend dargestellt.

Vergleicht man die Keimzahlen im Inputmaterial und den nachgeschalteten Fermentern, lässt sich eine Reduktion von mindestens zwei bis zu vier Zehnerpotenzen erkennen, mit Ausnahme der Fäkalstreptokokken ist die Anzahl der Gesamtcoliformen und Fäkalcoliformen in den Proben aus Fermenter 2 geringer als aus Fermenter 1.

Die Coliphagen lassen sich weder aus Fermenter 1 noch aus Fermenter 2 nachweisen.

Zur Erstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet. Dieser wurde aus den Einzelwerten berechnet, die im Anhang dargestellt sind (Tabelle A 11 – A 12).

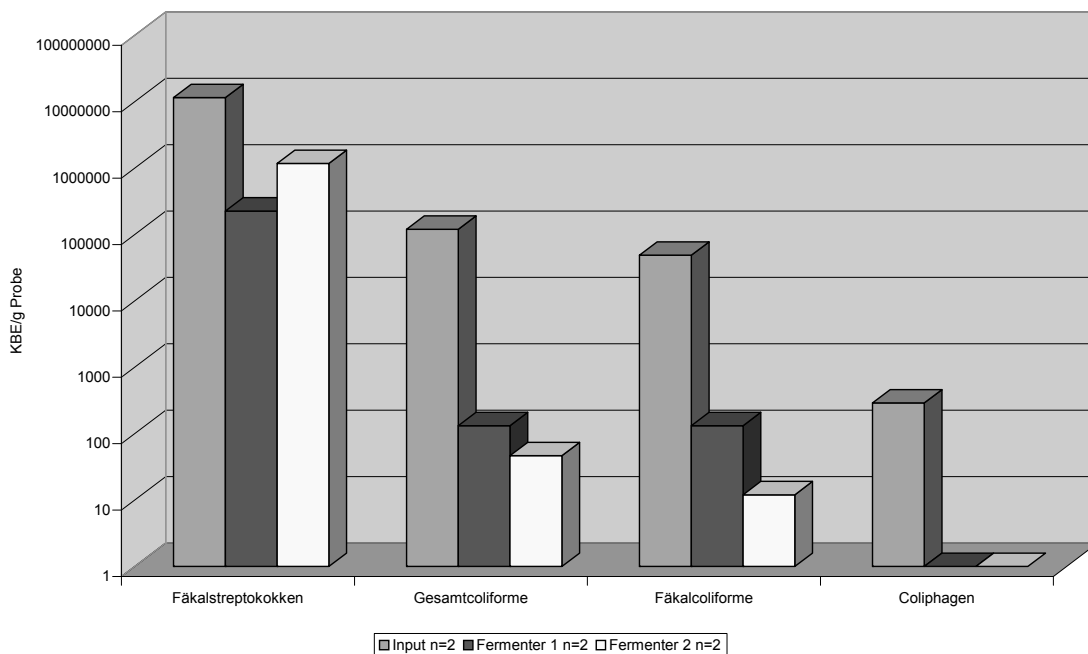


Abbildung 16: In- und Outputanalysen an der Anlage D (mesophil 43 °C)

#### 4.2.6 In- und Outputanalysen der Anlage E (thermophil 55 °C)

Die Ergebnisse werden in Abbildung 17 zusammenfassend dargestellt.

Es wird deutlich, dass in keiner der Proben Salmonellen nachweisbar waren.

Im thermophilen Fermenter waren nur noch die Fäkalstreptokokken in einer maximalen Konzentration von  $10^1$  KBE/g nachweisbar.

Auffällig ist jedoch, dass es im Endlager durch Nachverkeimung wieder zu einer Erhöhung der Keime kommt, die im Inputmaterial nachgewiesen wurden

Zur Erstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet. Dieser wurde aus den Einzelwerten berechnet, die im Anhang dargestellt sind (Tabelle A 13 – A 20).

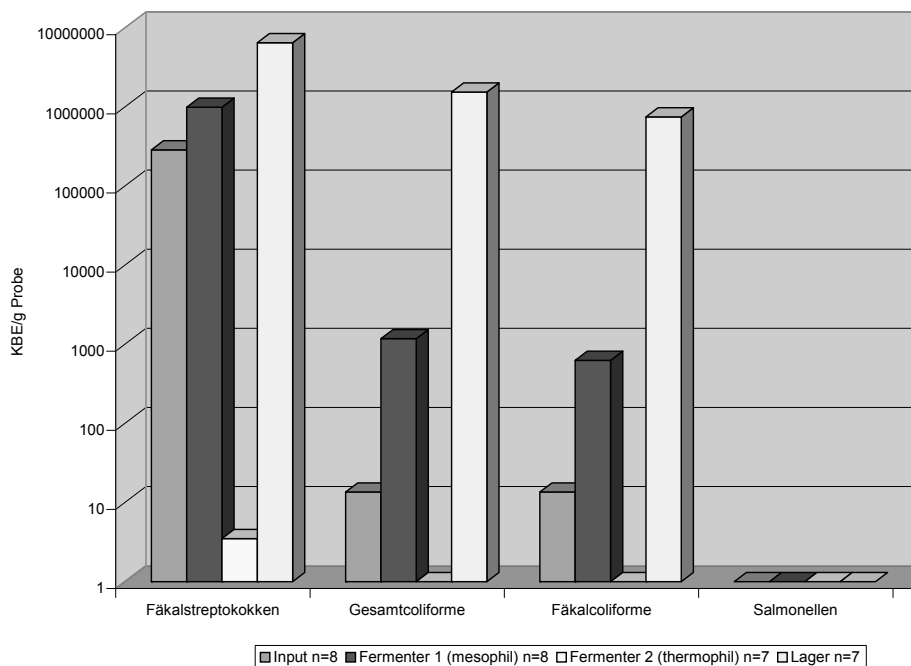


Abbildung 17: In- und Outputanalysen an der Anlage E (thermophil 55 °C)

#### 4.2.7 In- und Outputanalysen der Anlage F (thermophil 55 °C)

Die Ergebnisse werden in Abbildung 18 zusammenfassend dargestellt.

Es konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden.

Die Konzentration von Coliformen sinkt von  $10^4$  KBE/g im Inputmaterial unter die Nachweisgrenze im thermophilen Fermenter, steigt aber im Endlager wieder an.

Die Fäkalstreptokokken werden im thermophilen Fermenter, im Gegensatz zu den anderen Mikroorganismen, kaum reduziert und steigen im Lager um eine Zehnerpotenz mehr als im Inputmaterial an. Auch in der Anlage F tritt das Phänomen der Nachverkeimung bei Gesamt- und Fäkalcoliformen auf. Zur Erstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet.

Die Einzelwerte sind aus Tabellen A 21 und A 22 im Anhang zu entnehmen.

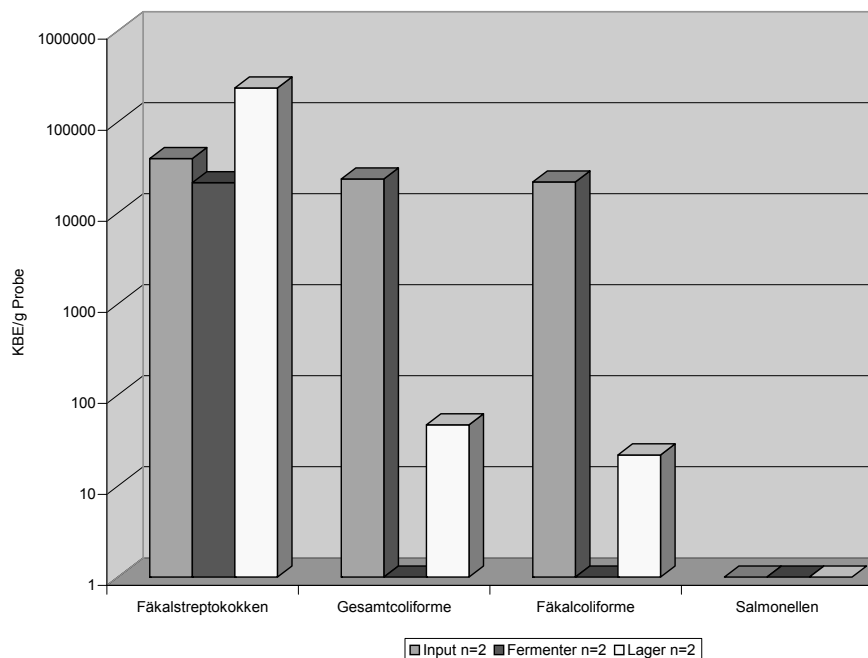


Abbildung 18: In- und Outputanalysen an der Anlage F (thermophil 55 °C)



#### **4.2.8 Versuche an der Pasteurisierungseinheit der mesophilen Anlage G**

Die Untersuchungen an Anlage G wurden gemeinsam mit Herrn Milan Drča (DRČA et al., 2004) durchgeführt, der auch die Abbildungen 19 und 20 zur Verfügung stellte.

##### **4.2.8.1 Temperaturverlauf während der Pasteurisierung**

Die Temperaturkurven im Reaktor sind in der Abbildung 19 dargestellt.

Die Zieltemperatur bei der die Hygienisierung stattfinden soll, ist 70 °C, eine Reduktion der ausgewählten Mikroorganismen ist jedoch bereits bei niedrigeren Temperaturbereichen zu erwarten. Aus diesem Grund wurden Proben bei 50 °C, 60 °C und 70 °C noch während der Aufheizphase aus dem Hygienisierungsbehälter entnommen. Die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Erhitzung des Substrates und dem Beginn der eigentlichen Hygienisierung (ab 70 °C) lag zwischen 57 Minuten (Versuch 2) und 79 Minuten (Versuch 3). 50 °C wurden nach einer Zeit von minimal 14 Minuten erreicht (Versuch 2), während die maximale Zeit bei 24 Minuten registriert wurde (Versuche 3 und 5). Das Erreichen von 60 °C wurde in einer Zeitspanne von Minimum 27 (Versuch 2) bis Maximum 38 Minuten (Versuch 3) festgestellt. Die letzten Zeitpunkte der Probenentnahme (am Ende der Hygienisierung) wurden zwischen 90 Minuten (Versuch 2) und 108 Minuten (Versuch 3) bestimmt.

Die Zeitdauer der Hygienisierung bei den fünf durchgeführten Versuchen variierte zwischen minimal 29 Minuten (Versuch 3) und maximal 33 Minuten (Versuch 2).

In Abbildung 19 sind die Temperaturkurven der fünf durchgeführten Versuche grafisch dargestellt

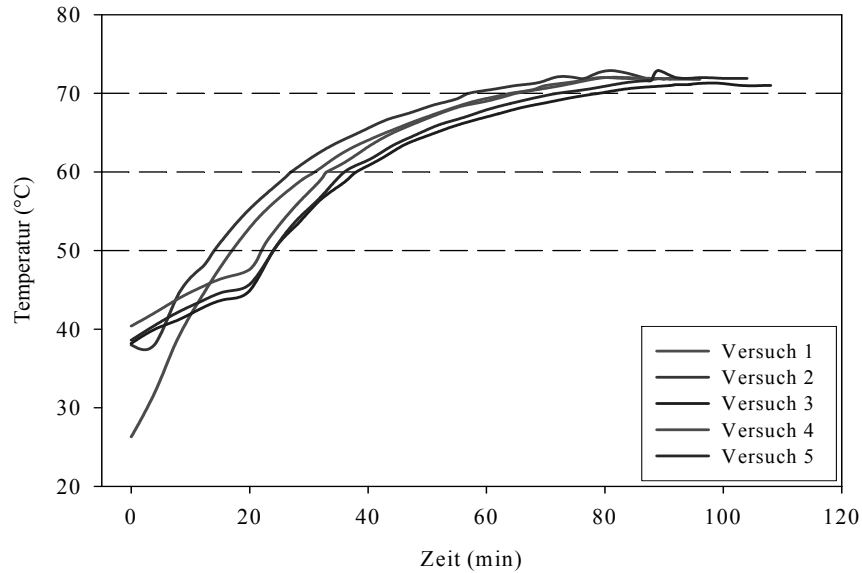


Abbildung 19: Temperaturverlauf während des Hygienisierungsprozesses

#### 4.2.8.2 Einwirkdauer der Temperatur während der Pasteurisierung

Das Säulendiagramm der Abbildung 20 zeigt eine Übersicht über die Zeit- bzw. Einwirkdauer der physikalischen und chemischen Einflüsse auf ausgewählte Prüforganismen zwischen den fünf Probenentnahmen vor und während des Hygienisierungsprozesses.

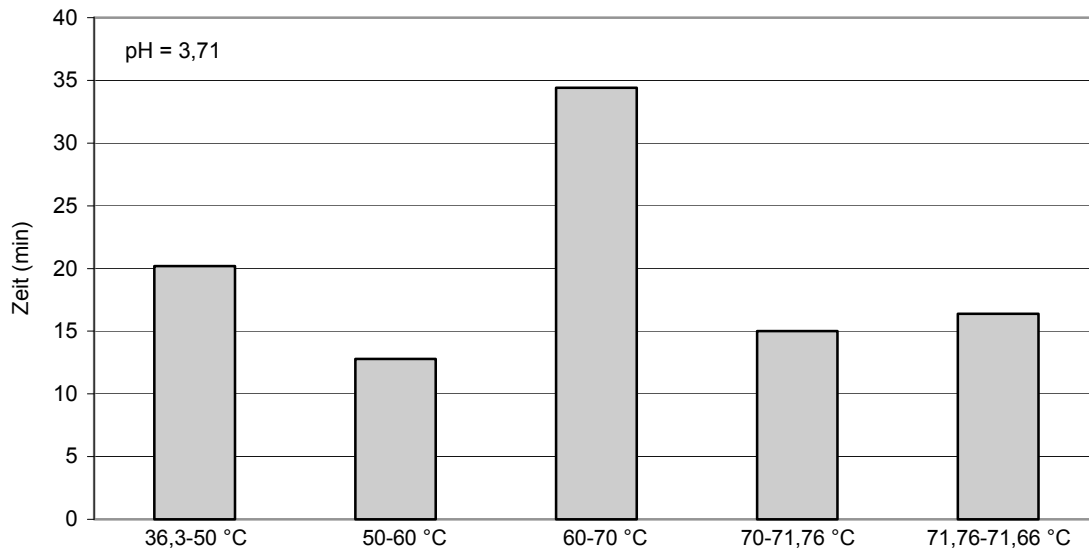


Abbildung 20: Grafische Darstellung der Einwirkungsdauer der Temperatur zwischen den Probenahmen im Hygienisierungsbehälter

Die erste Probenentnahme erfolgte bei 50 °C, die nach 20,2 Minuten erreicht worden war. Die zweite Probeentnahmetemperatur von 60 °C wurde bereits nach weiteren 12,8 Minuten erreicht, dem kürzesten Zeitintervall aller fünf Probenentnahmen. Bis zum Erreichen von 70 °C wurden 34,4 Minuten benötigt. Nach weiteren 15 Minuten wurde eine zusätzliche Probe entnommen, deren Temperaturmittelwert 71,76 °C betrug. Bis zum Ende der Hygienisierung nach durchschnittlich 16,4 Minuten wurde noch ein Temperaturmittelwert von 71,66 °C ermittelt. Die pH-Werte der fünf durchgeführten Versuche lagen zwischen minimal 3,44 und maximal 4,12, wobei der durchschnittliche pH-Wert 3,71 betrug.

#### 4.2.8.3 Tenazität der verschiedenen Mikroorganismen in der Pasteurisierungseinheit (PE) bei verschiedenen Zeit- und Temperaturstufen

Aus der Abbildung 21 wird ersichtlich, dass die untersuchten Prüforganismen mit Erreichen der Temperaturen von 70 °C, mit Ausnahme des Phagen T1, bis unter die Nachweisgrenze reduziert wurden. Nach 15 Minuten Einwirkdauer bei 70 °C und der Probennahme bei 71,76 °C war auch der Phage T1 nicht mehr nachweisbar. *Enterococcus faecalis* sowie *Salmonella Senftenberg* wurden dabei um 9 bzw. 8 Zehnerpotenzen reduziert. Der Phage T1 und der Phage „Wildstamm“ um ca. 5 Zehnerpotenzen. Es zeigt sich, dass eine funktionierende Hygienisierungseinheit in einer praktischen Anaerobanlage nach Erreichen von 70 °C und einer Haltezeit von nur 30 Minuten seuchenhygienisch relevante Mikroorganismen und Bakteriophagen zuverlässig eliminieren kann. Zur Erstellung des Diagramms wurde der jeweilige Mittelwert verwendet. Die Einzelwerte sind aus Tabelle A 23 im Anhang zu entnehmen.

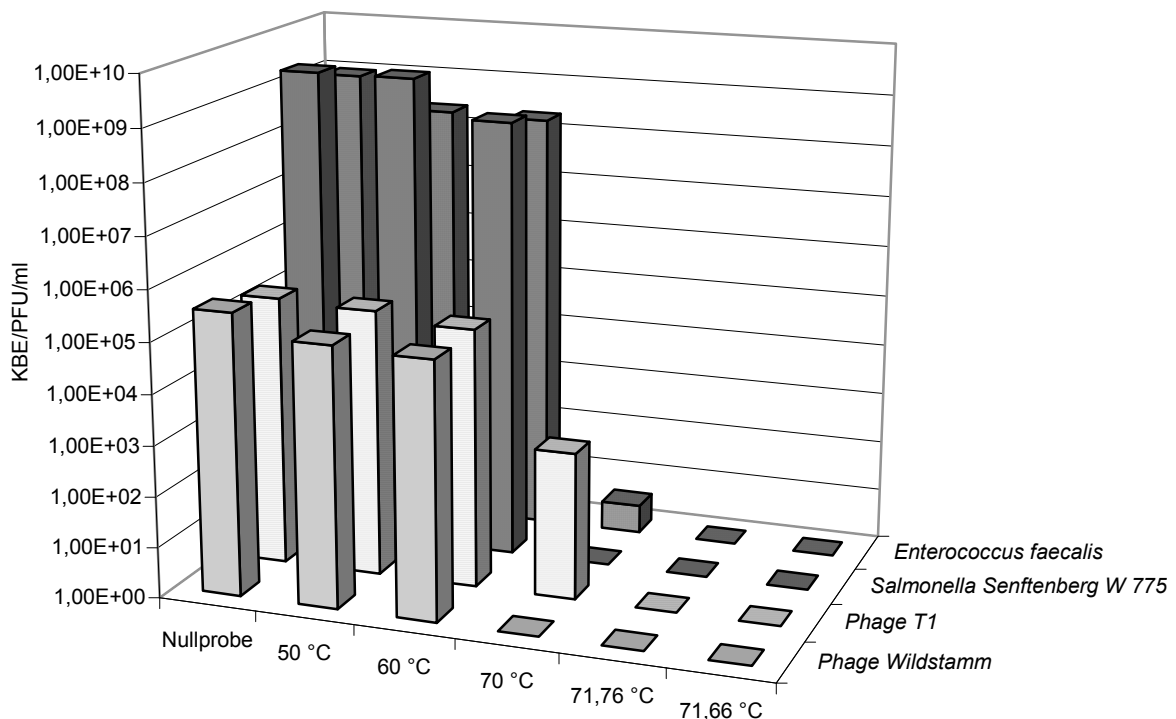


Abbildung 21: Vergleichende Darstellung der Tenazität der verwendeten Mikroorganismen während des Hygienisierungsprozesses

#### 4.2.9 Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage A (mesophil 44 - 47 °C)

Die Ergebnisse werden in Tabelle 20 zusammenfassend dargestellt.

Als Prüforganismus in der durchgeführten „direkten Prozessprüfung“ diente *Salmonella Senftenberg* W 775. Insgesamt wurden 24 Proben parallel untersucht. Die Aufenthaltszeit im Reaktor betrug 24 Stunden. Mit Hilfe von Diffusionsprüfkörpern vom Typ 1, in die 10 ml Gülle + 1 ml Salmonellensuspension eingegeben wurde und die mit Hilfe einer Eisenstange in den Faulraum eingebracht wurden, wurden die Prüforganismen dem Faulraummilieu in Abhängigkeit der verschiedenen Anlagentechnik unterschiedlich lange ausgesetzt. Aus Tabelle 20 wird deutlich, dass in 15 von 24 Proben *Salmonella Senftenberg* qualitativ noch nachzuweisen war, quantitativ jedoch nicht.

Tabelle 20: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit *Salmonella Senftenberg* W 775 im mesophil betriebenen Reaktor (44-47°C) der Anlage A , 24h

Diffusionsprüfkörper	qualitativ	quantitativ
1a	+	n. n.
1b	-	n. n.
2a	+	n. n.
2b	+	n. n.
3a	-	n. n.
3b	-	n. n.
4a	+	n. n.
4b	-	n. n.
5a	-	n. n.
5b	+	n. n.
6a	+	n. n.
6b	+	n. n.
7a	+	n. n.
7b	+	n. n.
8a	+	n. n.
8b	+	n. n.
9a	+	n. n.
9b	+	n. n.
10a	+	n. n.
10b	+	n. n.
11a	-	n. n.
11b	-	n. n.
12a	-	n. n.
12b	-	n. n.

n. n.: nicht nachweisbar

+: positiver Nachweis in 10 g Material - : negativer Nachweis in 10 g Material

#### 4.2.10 Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage B (mesophil 46 – 48 °C)

Die Ergebnisse werden in Tabelle 21 zusammenfassend dargestellt. Diese zeigt, dass nach 24 Stunden im Mesophilreaktor noch in 3 von 12 Proben *Salmonella Senftenberg* in einer Konzentration von  $10^0$  bis  $10^1$  KBE/g nachgewiesen werden konnte. Es fand eine Keimzahlreduktion von 7 bis 8 Zehnerpotenzen statt. Bei einer Aufenthaltszeit von 48 Stunden konnte der Prüforganismus *Salmonella Senftenberg* vollständig inaktiviert werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen des Prüforganismus *Coliphage Wildstamm*, so kann festgestellt werden, dass dieser sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden im Mesophilreaktor (46 – 48 °C) lediglich eine Reduktion um maximal drei Zehnerpotenzen erfährt.

Tabelle 21: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit *Salmonella Senftenberg* W 775 (12 Parallelansätze) und *Coliphage „Wildstamm“* (4 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage B (46 °C - 48 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 bzw. 48 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)

Diffusionsprüfkörper mit:	Ansätze	Ermittelte Keimzahl	
		nach 24 Stunden	nach 48 Stunden
<i>Salmonella Senftenberg</i> ( $3,3 \times 10^7$ *)	1a	n. n.	n. n.
	1b	n. n.	n. n.
	2a	n. n.	n. n.
	2b	n. n.	n. n.
	3a	n. n.	n. n.
	3b	n. n.	n. n.
	4a	$0,36 \times 10^0$	n. n.
	4b	n. n.	n. n.
	5a	$2,3 \times 10^0$	n. n.
	5b	n. n.	n. n.
	6a	$2,4 \times 10^1$	n. n.
	6b	n. n.	n. n.
<i>Coliphage „Wildstamm“</i> ( $1,3 \times 10^6$ *)	1a	$5,0 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$
	1b	$3,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$
	2a	$1,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
	2b	$1,8 \times 10^5$	$8,0 \times 10^3$

n. n.: nicht nachweisbar

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe

KBE: koloniebildende Einheiten

PFU: plaque forming units

#### 4.2.11 Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage C (Hygienisierungseinheit ca. 60 °C)

Die Ergebnisse werden in Tabelle 22 und 23 zusammenfassend dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Salmonellen nach 30 Minuten bei 60 °C fast vollständig reduziert, und bei einer Aufenthaltszeit von 60 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

Auch der Prüforganismus *Enterococcus faecalis* konnte sowohl nach 30 als auch nach 60 Minuten im Hygienisierungstank (60 °C) fast vollständig inaktiviert werden.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Prüforganismen zeigte sich der *Coliphage Wildstamm* resistenter und konnte in allen Proben noch nachgewiesen werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit *Salmonella Senftenberg* W 775 (2 Parallelansätze), *Coliphage* „Wildstamm“ (4 Parallelansätze) und *Enterococcus faecalis* (4 Parallelansätze) in der Pasteurisierungseinheit (60 °C) der Anlage C nach einer Aufenthaltszeit von 30 bzw. 60 Minuten (Angaben in KBE/PFU/g)

Diffusionsprüfkörper mit:	Ansätze	Ermittelte Keimzahl	
		nach 30 Minuten	nach 60 Minuten
<i>Salmonella Senftenberg</i> (4,3 x 10 <sup>7*</sup> )	1a	n. n.	n. n.
	1b	0,36 x 10 <sup>0</sup>	n. n.
<i>Coliphage</i> „Wildstamm“ (1,2 x 10 <sup>6*</sup> )	1a	3,1 x 10 <sup>2</sup>	2,8 x 10 <sup>2</sup>
	1b	7,0 x 10 <sup>1</sup>	6,0 x 10 <sup>1</sup>
	2a	8,0 x 10 <sup>1</sup>	8,0 x 10 <sup>1</sup>
	2b	8,0 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>2</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> (1,2 x 10 <sup>9*</sup> )	1a	n. n.	n. n.
	1b	0,36 x 10 <sup>1</sup>	n. n.
	2a	n. n.	0,36 x 10 <sup>1</sup>
	2b	0,36 x 10 <sup>1</sup>	0,36 x 10 <sup>1</sup>

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

PFU: plaque forming units

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe

Aus Tabelle 23 wird deutlich, dass eine Temperaturerhöhung um 10 °C auf 70 °C zu einer vollständigen Inaktivierung der Prüforganismen geführt hat.

Tabelle 23: Inaktivierung von *Salmonella Senftenberg* W775 und *Enterococcus faecalis* (je 4 Parallelansätze) im Hygienisierungstank (70 °C) durch die Temperaturerhöhung nach einer Aufenthaltszeit von 30 und 60 Minuten (Angaben in KBE/g)

Diffusionsprüfkörper mit:	Ansätze	Ermittelte Keimzahl	
		nach 30 Minuten	nach 60 Minuten
<i>Salmonella Senftenberg</i> (2,3 x 10 <sup>7*</sup> )	1a	n. n.	n. n.
	1b	n. n.	n. n.
	2a	n. n.	n. n.
	2b	n. n.	n. n.
<i>Enterococcus faecalis</i> (1,2 x 10 <sup>9*</sup> )	1a	n. n.	n. n.
	1b	n. n.	n. n.
	2a	n. n.	n. n.
	2b	n. n.	n. n.

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe



#### 4.2.12 Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage D (mesophil 38,5 - 40 °C)

Die Ergebnisse werden in Tabelle 24 zusammenfassend dargestellt.

Es wird deutlich, dass ein Aufenthalt 24 Stunden im Mesophilreaktor ausreichen, um *Salmonella Senftenberg* vollständig zu inaktivieren.

Im Vergleich hierzu konnte *Enterococcus faecalis* lediglich um eine Zehnerpotenz reduziert werden.

Tabelle 24: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit *Salmonella Senftenberg* W 775, *Coliphage T1* und *Enterococcus faecalis* (je 8 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage D (38,5 °C - 40 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)

Diffusionsprüfkörper mit:		
<i>Salmonella Senftenberg</i> ( $2,3 \times 10^{8*}$ )	<i>Enterococcus faecalis</i> ( $1,2 \times 10^{8*}$ )	<i>Coliphage T1</i> ( $4,3 \times 10^{6*}$ )
n. n.	$2,4 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$4,3 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$2,4 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$9,3 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$2,4 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$2,4 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$4,3 \times 10^7$	n. n.
n. n.	$4,3 \times 10^7$	n. n.

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

PFU: plaque forming units

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe

#### 4.2.13 Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage E (thermophil 52 - 55 °C)

Die Ergebnisse werden in Tabelle 25 zusammenfassend dargestellt.

Es wird ersichtlich, dass 24 Stunden Kontaktzeit der Prüforganismen im thermophilen Temperaturbereich (52 – 55 °C) ausreichen, um *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* vollständig zu inaktivieren. Bei vergleichender Betrachtung des Prüforganismus *Coliphage T1* kann wie auch in den vorangehenden Untersuchungen festgestellt werden, dass er wesentlich resistenter ist. 24 Stunden im Thermophilreaktor konnten lediglich eine Reduktion um drei Zehnerpotenzen bewirken.

Tabelle 25: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit *Salmonella Senftenberg* W775, *Coliphage T1* und *Enterococcus faecalis* (je 8 Parallelansätze) im mesophil betriebenen Reaktor der Anlage E (52 °C - 55 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)

Diffusionsprüfkörper mit:		
<i>Salmonella Senftenberg</i> (3,1 x 10 <sup>7*</sup> )	<i>Coliphage T1</i> (2,2 x 10 <sup>5*</sup> )	<i>Enterococcus faecalis</i> (4,8 x 10 <sup>7*</sup> )
n. n.	3,0 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	4,0 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	1,5 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	3,5 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	2,7 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	2,0 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	3,2 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	1,8 x 10 <sup>2</sup>	n. n.

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

PFU: plaque forming units

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe

#### 4.2.14 Direkte Prozessprüfung der großtechnischen Anlage F (thermophil 54 - 55 °C)

##### 4.2.14.1 Erster Beprobungsdurchgang

Die Ergebnisse werden in Tabelle 26 zusammenfassend dargestellt.

Aus Tabelle 26 wird deutlich, dass 24 Stunden im Thermophilreaktor ausreichen, um *Salmonella Senftenberg*, *Enterococcus faecalis* und *Coliphage „Wildstamm“* vollständig zu inaktivieren. *Coliphage T1* erfuhr jedoch lediglich eine Reduktion um 3 Zehnerpotenzen.

Tabelle 26: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung mit *Salmonella Senftenberg* W 775, *Coliphage T1* und *Enterococcus faecalis* (je 8 Parallelansätze) im thermophil betriebenen Reaktor der Anlage F (54 °C - 55 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)

Diffusionsprüfkörper mit:			
<i>Salmonella Senftenberg</i> ( $4,3 \times 10^{7*}$ )	<i>Col. Wildstamm</i> ( $3,8 \times 10^{5*}$ )	<i>Col. T1</i> ( $2,6 \times 10^{5*}$ )	<i>Enterococcus faecalis</i> ( $2,4 \times 10^{7*}$ )
n. n.	n. n.	$3,4 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$4,0 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$1,4 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$3,3 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$2,6 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$2,0 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$3,6 \times 10^2$	n. n.
n. n.	n. n.	$1,0 \times 10^2$	n. n.

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

PFU: plaque forming units

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe

*Col.*: *Coliphage*

#### 4.2.14.2 Zweiter Beprobungsdurchgang

Die Ergebnisse werden in Tabelle 27 zusammenfassend dargestellt.

Es wird deutlich, dass 24 Stunden im Thermophilreaktor ausreichen um *Salmonella Senftenberg*, *Enterococcus faecalis* und *Coliphage „Wildstamm“* vollständig zu inaktivieren. *Coliphage T1* wurde dagegen nur um 3 Zehnerpotenzen reduziert.

Tabelle 27: Ergebnisse der direkten Prozessprüfung (zweiter Beprobungsdurchgang) mit *Salmonella Senftenberg* W 775, *Coliphage „Wildstamm“*, *Coliphage T1* und *Enterococcus faecalis* (je 8 Parallelansätze) im thermophil betriebenen Reaktor der Anlage F (54 °C - 55 °C) nach einer Aufenthaltszeit von 24 Stunden (Angaben in KBE/PFU/g)

Diffusionsprüfkörper mit:			
<i>Salmonella Senftenberg</i> (4,3 x 10 <sup>7*</sup> )	<i>Col. Wildstamm</i> (2,9 x 10 <sup>5*</sup> )	<i>Col. T1</i> (3,7 x 10 <sup>5*</sup> )	<i>Enterococcus faecalis</i> (3,6 x 10 <sup>7*</sup> )
n. n.	n. n.	3,5 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	n. n.	8,0 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	n. n.	1,7 x 10 <sup>2</sup>	3,6 x 10 <sup>0</sup>
n. n.	n. n.	3,5 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	n. n.	2,4 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	n. n.	2,4 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	n. n.	3,2 x 10 <sup>2</sup>	n. n.
n. n.	n. n.	1,8 x 10 <sup>2</sup>	n. n.

n. n.: nicht nachweisbar

KBE: koloniebildende Einheiten

PFU: plaque forming units

\*: ermittelte Konzentration der Nullprobe

*Col.*: *Coliphage*

#### **4.2.15 Bestimmung der realen Aufenthaltszeit an den Praxisanlagen A, G und H**

Bei thermophil betriebenen Anaerobanlagen mit diskontinuierlicher bzw. kontinuierlicher Beschickung ohne Vorerhitzung der Substrate kann durch Traceruntersuchungen diejenige Zeitspanne ermittelt werden, die alle Substratanteile in fester und flüssiger Form als kürzeste Aufenthaltszeit (Mindestverweilzeit) im Anaerobreaktor haben. In diesem Zusammenhang sollte daher die Eignung des Einsatzes „biologischer Tracer“ überprüft werden, die mikrobiologisch arbeitenden Untersuchern ein wirkungsvolles Werkzeug in die Hand gibt.

Am meisten geeignet erschienen Sporen von *Bacillus globigii*. Die Sporen dieses Bakteriums kommen natürlicherweise nicht in biologischen Abfällen vor und sind im Oberflächenverfahren auf Standard-I-Agar aufgrund ihres charakteristischen, orangenen Wachstums einfach zu diagnostizieren.

##### **4.2.15.1 Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in der Anlage A**

Die Ergebnisse werden in Tabelle 28 dargestellt.

Bei dieser Anlage handelt es sich um einen stehenden Fermenter mit 350 m<sup>3</sup> Inhalt. Es wird einmal täglich mit 2 % des Inhaltes (7 m<sup>3</sup> Material) beschickt. Das Propellerrührwerk läuft einmal pro Stunde für 5 Minuten.

Es wurden 44 l Sporensuspension mit einer Konzentration von 10<sup>6</sup> Sporen/ml mit dem Beschickungsmaterial einmalig eingebracht. Der Landwirt zog einmal täglich eine Mischprobe am Auslauf des Fermenters.

Am dritten Tag nach der Beprobung konnten das erste Mal Sporen von *Bacillus globigii* am Auslauf des Fermenters nachgewiesen werden.

#### 4.2.15.2 Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in der Anlage G

Die Ergebnisse werden in Tabelle 28 dargestellt.

Es handelt sich hierbei um einen liegenden Fermenter mit 160 m<sup>3</sup> Inhalt, der ausschließlich mit Speiseabfällen betrieben und im Abstand von 2 Stunden mit 1 % des Inhaltes beschickt wird. Es wurden über einen Wasserschlauch 40 l *Bacillus globigii*-Sporensuspension mit einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Sporen/ml in den Reaktor eingebracht. Schon bei der ersten Probennahme, 30 Minuten nach Zugabe konnte der Prüforganismus am Auslauf des Fermenters nachgewiesen werden.

#### 4.2.15.3 Bestimmung der realen Aufenthaltszeit in der Anlage H

Die Ergebnisse werden in Tabelle 28 dargestellt.

Bei dieser Anlage handelt es sich um einen stehenden Fermenter mit 3.000 m<sup>3</sup> Inhalt. Er wird täglich mit 5 % des Inhaltes kontinuierlich über 12 Stunden mit Bioabfällen beschickt. Nach Betreiberangaben beträgt die „mittlere hydraulische Aufenthaltszeit“ der Anaerobanlage ca. 25 Tage. Um jedoch die kürzeste Zeitspanne in Erfahrung zu bringen, die die festen Partikel oder die flüssigeren Stoffe als „tatsächliche“ Aufenthaltszeiten in der Anlage haben, wurde der „biologische“ Tracerversuch unter Verwendung von *Bacillus globigii*-Sporen durchgeführt.

Es wurden 200 l einer *Bacillus globigii*-Sporensuspension mit einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Sporen/ml mit Beschickungsmaterial direkt in den Anaerobreaktor eingebracht. Anschließend wurden 27 Tage lang ein bis fünf Proben pro Tag an derselben Probenstelle entnommen, an der die „Outputproben“ gezogen wurden.

Sieben Stunden nach Zugabe konnten das erste Mal Sporen von *Bacillus globigii* am Auslauf des Fermenters nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Aufenthaltszeit (Zeit zwischen Einbringung mit dem Beschickungsmaterial und erstem Auftreten am Auslauf von *Bacillus globigii*) in den Anlagen A, G und H

<b>Anlage</b>	Eingebrachte Menge an Sporensuspension (in Liter)	Zeit bis zum ersten Auftreten von <i>Bacillus globigii</i> am Auslauf
<b>A</b> 350 cbm Inhalt stehend	44l	3 Tage
<b>G</b> 160 cbm Inhalt liegend	40l	30 Minuten
<b>H</b> 3000 cbm Inhalt stehend	200l	7 Stunden

## 5. Diskussion

### 5.1 Vorbemerkung

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tenazitätsuntersuchungen mit verschiedenen Mikroorganismen sollten weitere Daten zur Prozessüberwachung bzw. Validierung der biotechnologischen Prozesse, vor allem in kleinen Vergärungsanlagen (landwirtschaftliche Kofermentationsanlagen) erarbeitet werden. Um ein breites Spektrum von relevanten Prüforganismen testen zu können, wurden zusätzlich zu dem in der Bioabfallverordnung (ANONYM, 1998) vorgeschriebenen Prüforganismus *Salmonella Senftenberg*, folgende weitere Prüforganismen auf ihr Tenazitätsverhalten gegenüber verschiedenen Temperaturbereichen getestet:

- *Enterococcus faecalis*
- *Campylobacter jejuni*
- *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*
- *Ascaris suum*-Eier
- Coliphage T1
- Coliphage „Wildstamm“

Um geeignete Prüfkörper zum Einbringen der unterschiedlichen Prüforganismen zu erarbeiten, wurden verschiedene Varianten im Vorfeld an Laboranlagen geprüft und anschließend deren Einsatz in Biogasanlagen in der Praxis verifiziert. Als Laboranlagen dienten eine mesophile (35 °C) und eine thermophile (55 °C) Biogasanlage. Außerdem stand für die Untersuchungen bei höheren Temperaturen (70 - 90 °C) eine Pasteurisierungseinheit zur Verfügung.

Nach Abklärung offener Fragen im Vorfeld im Labor bezüglich der Praxistauglichkeit und Praktikabilität diverser Prüforganismen konnten die erzielten Ergebnisse anschließend in der Großtechnik überprüft werden. Hierfür entschied man sich nur für diese Mikroorganismen, die sich im Labor als geeignet für die direkte Prozessprüfung erwiesen. Die direkten Prozessprüfungen wurden an acht mesophil und thermophil betriebenen landwirtschaftlichen Kofermentationsbiogasanlagen verteilt in Deutschland durchgeführt.

In den Untersuchungen wurden jeweils parallel „In- und Outputproben“, d.h. Proben vor und nach der anaeroben Behandlung im Fermenter (Gärreaktor; Biogasreaktor) gezogen. Dabei wurden die Substrate auf ihren Gehalt an Salmonellen, Enterokokken und Gesamtcoliforme sowie Fäkalcoliforme untersucht. Das Ziel dieser Untersuchungen lag darin, die Effektivität der in den untersuchten Biogasanlagen ablaufenden Prozesse der anaeroben Fermentation sowie der angewandten Hygienisierungsverfahren zu überprüfen.



Des Weiteren wurde die reale Aufenthaltszeit (Mindestverweilzeit) des Materials im Reaktor bestimmt.

Seit Februar 2006 ist die Verordnung (EG) Nr. 208/2006 (ANONYM, 2006a) in Kraft getreten, welche für die Validierung der biotechnologischen Prozesse in den Biogas- und Kompostierungsanlagen *Salmonella Senftenberg* H<sub>2</sub>S negativ und *Enterococcus faecalis* fordert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schlagen sich in dieser nieder.

## 5.2 Beurteilung der verwendeten Probebehältnisse

Um herausfinden zu können, wie die ausgewählten Prüforganismen auf das sie umgebende Milieu bezüglich ihrer Tenazität reagieren, musste ein Prüfkörper entwickelt werden, der sie dem Milieu möglichst unverfälscht aussetzt.

Die beste Lösung wäre sicherlich eine Bakteriensuspension direkt in das durchmischte Substrat einzubringen. Jedoch ist es kaum möglich die Bakterien später wieder zu finden. Es liegt daran, dass manche untersuchten Bakterien, wie z. B. *Campylobacter jejuni*, leicht von den nativen im Substrat enthaltenen Mikroorganismen im Wachstum gehemmt werden können, was den Nachweis erschwert (ABULREESH et al., 2005; GALLAY et al., 2006). Weiterhin musste eine sehr große Menge an Suspension hergestellt werden, um ausreichend hohe Konzentration zu erreichen. Auch die gleichmäßige Durchmischung mit dem Substrat im Fermenter einer Praxisanlage kann nur schwer gewährleistet werden. Als weiteres Problem bei der Verwendung der Bakteriensuspension erweist sich die Tatsache, dass manche untersuchte Mikroorganismen wie z. B. *Enterococcus faecalis* nach dem Einbringen in das untersuchte Substrat durch konventionellen Nachweis nicht mehr von nativen Enterokokken zu unterscheiden sind (BÖHM, 2003).

Des Weiteren kommt hinzu, dass sichergestellt werden muss, dass die Prüforganismen nicht in die Außenwelt gelangen dürfen und zu einer Weiterverbreitung und damit Kontamination der Umwelt führen (BENDIXEN, 1998; EDER, 2001; BÖHM, 2003).

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden in der Vergangenheit Diffusionsprüfkörper und Prüfkörpertechniken etabliert (PESARO et al., 1995; RAPP, 1995; SPILLMANN et al., 1987; SCHWARZ, 2003), die den Anforderungen gerecht wurden. Auch BRAUMILLER et

al. (2000), MOSS (2000) und HOFERER (2001) haben diese Techniken angewandt und weiterentwickelt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Volumen-Prüfkörpersystem (Keimträger Typ 1) angewandt (RAPP, 1995). Es ermöglicht das Einbringen von Bakterien, die man zuvor mit dem entsprechenden Substrat vermischt. Dieses System gewährleistet eine permanente Milieuangleichung über semipermeable Membranen. Auch die einfache Handhabung bezüglich des Einbringens in die Reaktoren spricht für die Volumenprüfkörper. Im Labormaßstab werden sie mit Hilfe von Kabelbindern an Lochblechen angebracht und in der Großtechnik werden sie in entsprechende Behältnisse verbracht, die an einer Kette in den Fermenter eingebracht werden.

### **5.3 Untersuchungen an den Laboranlagen**

#### **5.3.1 Tenazitätsversuche**

Die Versuche, die an den Laborbiogasanlagen im Jahr 2002 durchgeführt wurden, dienten zur Abklärung der Frage, ob es möglicherweise Alternativindikatororganismen zur Beurteilung der Seuchenhygiene gibt, die jene in der Bioabfallverordnung (ANONYM, 1998) vorgeschriebenen ersetzen bzw. ergänzen könnten.

Sei es, weil sie sich aufgrund ihrer Handhabung in der Aufarbeitung im Labor besser eignen oder einfach eine höhere Tenazität aufweisen als z. B. *Salmonella Senftenberg* W 775 H<sub>2</sub>S negativ. Die Verwendung eines repräsentativen Prüforganismus zur Anlagenvalidierung für den Bereich Seuchenhygiene ist vor allem vor dem Hintergrund eines Ersatzes des sehr stabilen aber schlecht quantitativ zu erfassenden phytopathogenen Prüforganismus Tabak-Mosaik-Virus (TMV) von besonderer Bedeutung. Lässt sich hierbei ein mit konventionellen Techniken, schnell und kostengünstig ein Indikatororganismus mit hoher Thermoresistenz und ausreichender Repräsentativität für die in diesem Zusammenhang epidemiologisch bedeutsamen Krankheitserreger finden, ist kritisch zu hinterfragen, ob das TMV Virus weiterhin als „Prüforganismus“ für die „direkte Prozessprüfung“ nach Anhang 2 der BioAbfV (ANONYM, 1998) dienen soll und kann. Die Frage ob das TMV ein relevanter Prüforganismus zur Validierung der biotechnologischen Prozesse ist, wurde auch von HOPPENHEIDT und MÜCKE (2000) gestellt. In deren

Untersuchungen stellte sich heraus, dass die thermische Behandlung von Bioabfällen über eine Stunde bei 70 °C nicht ausreichend ist, um das TMV zu inaktivieren und damit die in der BioAbfV geforderte Inaktivierung des Virus einzuhalten. Auch die Ergebnisse der Tenazitätsuntersuchungen von SCHÜLER et al. (1996), in denen die Tabakblätter artifiziell mit TBV infiziert wurden, zeigten, dass die Wärmebehandlung bei 70 °C für eine Stunde nicht ausreichte um eine vollständige Inaktivierung des TMV zu bewirken. Das Virus bleibt nach der Wärmebehandlung noch über 21 Tage erhalten bzw. infektiös.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher *Campylobacter jejuni*, Coliphagen, *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* und Schweinespulwurmeier (*Ascaris suum*) mit in die Untersuchungen einbezogen. Parallel dazu wurden immer *Salmonella Senftenberg W775* H<sub>2</sub>S negativ und *Enterococcus faecalis* in die Anlagen eingebracht, um so einen direkten Vergleich bezüglich der Tenazität in allen Anlagen bei den diversen Substraten zu erhalten. Zur Einbringung der Mikroorganismen und Parasiten wurden Volumenprüfkörpern verwendet, die von RAPP (1995) entwickelt und von SCHWARZ (2003) modifiziert wurden.

Die Versuche mit den Diffusionsprüfkörpern im Thermophilreaktor (55 °C) zeigten, dass sowohl *Salmonella Senftenberg* als auch *Campylobacter jejuni* schon nach einer Stunde inaktiviert wurden, wohingegen *Enterococcus faecalis* und Coliphage „Wildstamm“ nicht eliminiert wurden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass *Enterococcus faecalis* nach 3 Stunden bei 55 °C nicht mehr nachweisbar waren, Coliphagen jedoch noch nach 24 Stunden.

Da sich *Campylobacter jejuni* bezüglich seiner Tenazität als wenig resistent erwies, seine Aufarbeitung im Labor aber relativ aufwändig ist, kam er als möglicher Alternativorganismus nicht in Frage. Die Ergebnisse von JUTEAU et al. (2004) zeigten, dass Temperaturen von 50–60 °C ausreichen, um *Campylobacter jejuni* während der anaeroben Vergärung in der Gülle bei einer Dauer von 6 Stunden zu inaktivieren. Auch DOYLE und ROMAN (1981) erkannten, dass *Campylobacter jejuni* durch eine Erhitzung auf 55 °C innerhalb der ersten Minuten um 90 % reduziert wird. Außerdem erweist sich der Mikroorganismus als empfindlich gegenüber pH-Werten über 8 (BUTZLER, 1984).

Im Gegensatz hierzu können die Coliphagen bezüglich ihrer Tenazität über *Enterococcus faecalis* gestellt werden.

Dazu kommt noch, dass sich ihre Aufarbeitung im Labor als relativ unproblematisch gestaltet und schon nach einem Tag das Ergebnis zu erhalten ist. Diese Fakten sprechen dafür, dass man Coliphagen zur Überprüfung der Entseuchung in Praxisanlagen einsetzte. Zu diesem Zweck wurde im Vorfeld ein thermoresistenter definierter Coliphagenstamm (*Coliphage T1*) ausgewählt.

Die höhere Thermoresistenz von Coliphagen gegenüber Bakterien konnte auch in den Untersuchungen von MOCÉ-LLIVINA et al. (2003) festgestellt werden. Diese Tenazitätsuntersuchungen mit Klärschlamm haben gezeigt, dass die thermische Behandlung bei 80 °C für 30 Minuten ausreichte um die *Salmonella Senftenberg* vollständig zu inaktivieren. Dagegen konnten die Coliphagen während der gesamten Hygienisierung nicht inaktiviert werden.

Eine Aufenthaltszeit im Mesophilreaktor von 24 Stunden bei 35 °C führte bei keinem der untersuchten Prüforganismen zu deren Inaktivierung. Diese Ergebnisse konnte auch DRČA (2007) bestätigen. In seinen Keimträger-Untersuchungen mit *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* in einer mesophil betriebenen Biogasanlage, wurde ebenfalls festgestellt, dass eine Aufenthaltszeit von 24 Stunden nicht ausreichte um die untersuchten Bakterien zu inaktivieren. Ein ähnliches Temperaturverhalten von Salmonellen und Enterokokken während der mesophilen anaeroben Vergärung konnten auch PINEPANK et al. (1997), WATANABE et al. (1997) und HOFERER (2001) in ihren Untersuchungen feststellen.

Mesophilanlagen werden auch in Zukunft nicht ohne Vorerhitzung zu betreiben sein. Es wurden daher Tenazitätsversuche mit *Coliphage T1*, *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, *Enterococcus faecalis* und Askarideneiern an einer halbtechnischen Pasteurierungsanlage durchgeführt. Als Ergebnis wurde festgestellt, dass sowohl *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* als auch die Askarideneier schon nach 30 Minuten bei 70 °C vollständig inaktiviert werden. Deshalb wurde darauf verzichtet diese Mikroorganismen in die Hygienisierungseinheit der großtechnischen Anlage C einzubringen.

Dass die Pasteurisierung ein sicherer Weg zur Inaktivierung von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* ist, konnten auch GREWAL et al. (2006) feststellen. Nach OLSEN et al (1985) fand eine vollständige Inaktivierung von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* während der anaeroben Vergärung von Gülle im Temperaturbereich zwischen 53–57 °C und einer Einwirkungszeit von drei Stunden statt.

Nach Untersuchungen von HAIBLE (1989) sind sehr lange Überlebenszeiten von Askarideneiern in abgelagerten Klärschlämmen bekannt. Das Substrat Gülle übt ebenfalls kaum einen schädigenden Einfluss auf die Eier von *Ascaris suum* aus, wie von HIEPE und BUCHWALDER (1991) bewiesen wurde. In den Untersuchungen von LANG (1987) wurde der Verlust der Infektionstüchtigkeit von Askarideneiern bei einer einstündigen (50 °C) und zwanzigminütigen (55 °C) Temperatureinwirkung festgestellt. Eine vollständige Eliminierung der *Ascaris suum*-Eier im Klärschlamm während der thermophilen anaeroben Fermentation bei 54 °C konnte schon nach zehn Minuten festgestellt werden (PLACHY, 1997). Desweiteren ergaben die Untersuchungen von SCHIRM (2005), dass sich die Zugabe von Branntkalk äusserst positiv auf die Hygienisierung auswirkt, da kürzere Zeiten unter bestimmten Temperaturen ausreichen, um die Askarideneier zu schädigen.

*Enterococcus faecalis*, *Coliphage „Wildstamm“* und *Coliphage T1* erwiesen sich thermoresistenter als *Ascaris suum* - Eier. Die drei Prüforganismen waren sowohl nach 10, 20 und 30 Minuten bei 70 °C in der Pasteurisierungseinheit noch nachweisbar. 60 Minuten bei 70 °C reichten zwar aus um *Enterococcus faecalis* und *Coliphage „Wildstamm“* zu inaktivieren, *Coliphage T1* war jedoch noch nachweisbar. Erst nach 90 Minuten bei 70 °C konnte *Coliphage T1* eliminiert werden.

Bei einer Betriebstemperatur von 80 °C wurden die drei ausgewählten Mikroorganismen nach 20 Minuten alle vollständig eliminiert.

Unter Betrachtung der Ergebnisse aus der eigenen Untersuchungen wäre die Forderung nach einer Vorerhitzung von 70 °C über 90 Minuten bzw. 80 °C über 30 Minuten aus seuchenhygienischer Sicht realistisch.

Die erzielten Ergebnisse waren die Grundlage für eine weitere Überprüfung bezüglich der Tenazität der Prüforganismen an Praxisanlagen. Dabei wurden *Enterococcus faecalis*, *Coliphage „Wildstamm“* und *Coliphage T1* sowie parallel dazu *Salmonella Senftenberg* eingebracht, um einen direkten Vergleich zu erhalten.

### 5.3.2 Reale Aufenthaltszeit des Materials

Da in der Landwirtschaft Produkte aus Kofermentationsanlagen als Dünger verwendet werden, muss gefordert werden, dass der Behandlungsprozess als Ganzes eine ausreichende Hygienisierung der Endprodukte sicherstellt. Kann dies nicht erfüllt werden, können in der Umwelt neue Infektionsketten geschaffen und Infektionskreisläufe geschlossen werden (GUAN und HOLLEY, 2003; ALBIHN und VINNERAS, 2007). Eine besondere Bedeutung kommt der Kofermentation deshalb zu, weil mit den Kofermentaten neue Pathogene aus verschiedenen Herkunftsquellen in die Behandlungsprozesse und anschließend über die Endprodukte in die landwirtschaftlichen Betriebe eingetragen werden könnten (MARTENS et al., 1999).

Eine ausreichende Hygienisierung kann nur erfüllt werden, wenn sichergestellt ist, dass die Aufenthaltszeit des Materials in der Anlage bei entsprechend hoher Temperatur ausreichend lange ist. Deshalb war ein weiteres Ziel der vorliegenden Untersuchungen, eine Methode zu entwickeln, mit Hilfe derer das Inputmaterial gekennzeichnet werden konnte, um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt Beschickungsmaterial bzw. Teile davon erstmalig im Output erscheinen (Mindestverweilzeit). Nichtveröffentlichte Versuche in der Vergangenheit mit halben Tennisbällen und klein geschnittenen gefärbten Strohhalmen, die am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim durchgeführt wurden, schlugen fehl, da diese oben auf dem Material schwammen und so schneller zum Output gelangten als das originäre Faulsubstrat.

Es wurde daher eine *Bacillus globigii*-Sporensuspension angewandt, da sicher gewährleistet werden konnte, dass dieses thermoresistente Bakterium nicht in der natürlichen Bakterienflora des Reaktors vorkommt, sich optimal mit dem Beschickungsmaterial vermischt und die Prozesseinflüsse in einem mesophilen und thermophilen Anaerobmilieu die Sporen nicht eliminieren können. Im Labormaßstab wurde mit einer kleinen Menge der *Bacillussuspension* überprüft (je nach Anlage zwischen 10 – 150 l), ob diese Sporen wieder aus dem Output der Laboranlagen nach vorheriger artifizieller Kontamination des Inputs nachzuweisen sind.

Die in der eigenen Untersuchungen erfolgreiche Durchführung der Versuche an den Laboranlagen (Auftreten von *Bacillus globigii* nach 30 Minuten am Output) gab Anlass dazu, eine entsprechend große Menge an *Bacillus globigii*-Sporensuspension (je nach Anlage zwischen 40 – 200 l) herzustellen und die Ergebnisse, die man im Labormaßstab erhielt, an Praxisanlagen zu verifizieren.

## 5.4 Untersuchungen an den großtechnischen Anlagen

### 5.4.1 Direkte Prozessprüfung an den großtechnischen Anlagen A - F

Die Ergebnisse, die anhand von Untersuchungen an den Laboranlagen erarbeitet wurden, haben sich in den Praxisanlagen weitestgehend bestätigt.

Es wurden für die Untersuchungen zur Tenazität ausgewählter Mikroorganismen jene angewandt, die sich in den Laboranlagen als äußerst widerstandsfähig erwiesen, *Coliphage T1*, *Coliphage „Wildstamm“*, *Enterococcus faecalis* und *Salmonella Senftenberg W 775*. Da es mit ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, nach Indikatororganismen zu suchen, die eventuell *Salmonella Senftenberg W 775* ergänzen oder möglicherweise ablösen könnten, wurde die o. g. Mikroorganismen in Prüfkörpern eingebracht, um einen direkten Vergleich bezüglich ihrer Tenazität zu erhalten.

In den Mesophilreaktoren A (42-47°C) und B (45-49°C) konnte *Salmonella Senftenberg W 775* nach 24 Stunden nur noch qualitativ nachgewiesen werden, wohingegen die Coliphagen lediglich eine Reduktion von einer bis maximal drei Zehnerpotenzen erfuhren. Auch 48 Stunden im Mesophilreaktor genüigten nicht, um die Coliphagen zu eliminieren (sieheTabelle 21).

Die Ergebnisse bezüglich der Prüforganismen *Coliphage T1*, *Salmonella Senftenberg W 775* und *Enterococcus faecalis* an der großtechnischen Anlage D müssen vorsichtig beurteilt werden, da sich die Postzustellung der Proben verzögerte. Aufgrund der im Vorfeld erzielten Laborergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass 24 Stunden im Mesophilreaktor (43°C) nicht ausreichen die oben genannten Prüforganismen zu inaktivieren.

Betrachtet man nun die Ergebnisse an den beiden Thermophilreaktoren E (55°C) und F (55°C), so erkennt man, dass *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Senftenberg* und *Coliphage „Wildstamm“* nach 24 Stunden vollständig inaktiviert werden konnten, wohingegen *Coliphage T1* noch nachweisbar war (siehe Tabellen 25 bis 27). Auch PLYM-FORSELL (1983), HEROLD et al. (1999) und LUND et al. (2004) konnten Salmonellen und Enterokokken nach 24 Stunden bei 55 °C nicht mehr nachweisen.

Das Tenazitätsverhalten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mikroorganismen bestätigte die von WATANABE et al. (1997), BÖHM et al. (1999), SMITH et al. (2005) und GREWAL et al. (2007) vertretene These, dass in einem thermophilen Temperaturbereich eine Inaktivierung von Bakterien möglich ist.

Das Hygienisierungspotential und die damit verbundene Eliminierung vieler seuchenhygienisch bedeutsamer Mikroorganismen durch die anaerob-thermophile Vergärung wurden auch von anderen Autoren beschrieben (MONTEITH et al., 1986; TRAUB et al., 1986; SPILLMANN et al., 1987; BENDIXEN, 1994; LARSEN et al., 1994; TURNER et al., 1999; BÖHM et al., 1999; HEINONEN-TANSKI et al., 2006; SAHLSTRÖM, 2006).

Bei der Beprobung der Hygienisierungseinrichtung der Anlage C (70 °C) bestätigten sich die Ergebnisse aus den Laboranlagen hinsichtlich der Eliminierung von *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis*. Eine Stunde Aufenthaltsdauer bei 70°C war ausreichend, um die Mikroorganismen zu eliminieren. Vergleicht man diese Ergebnisse von *Salmonella Senftenberg* und *Enterococcus faecalis* mit anderen Untersuchungen, zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung. So zeigten die Ergebnisse von BAGGE et al. (2005) und DRČA (2007) eine vollständige Inaktivierung von Salmonellen und Enterokokken nach der Hygienisierung bei 70 °C für eine Stunde.

Bei den untersuchten Coliphagen ergaben sich Unterschiede zwischen den Ergebnissen in den Labor- und Praxisanlagen. Während der Prüforganismus in der Pasteurisierungseinheit der Laboranlage nach einer Stunde bei 70 °C noch nachweisbar war, konnte er durch die Prozesseinflüsse der Anaerobanlagen in der Praxis eliminiert werden. CARRINGTON et al. (1982) und SOLDIERER (1991) sind der Meinung, dass die Eliminierung von Mikroorganismen in den Praxisanlagen, bedingt durch verschiedene Besonderheiten, schneller stattfindet. Nach MARTENS et al. (1999) und STÖCKLEIN (2005) muss unter Praxisbedingungen mit einer erheblich größeren Schwankungsbreite an Ergebnissen gerechnet werden, weil sich unter Praxisbedingungen im Gegensatz zu Laborversuchen die Versuchs-Rahmenbedingungen oft nicht mit wünschenswerter Genauigkeit und Datendichte erfassen lassen und einige der zur Versuchsinterpretation gewünschten (bzw. erforderlichen) Begleitinformationen manchmal nicht, oder nur unvollständig zu erhalten sind (z.B. Art, Zusammensetzung, Herkunft, Gehalt an Trockensubstanz, Alter von Gülle und Kosubstraten, Redoxpotential, NH<sub>3</sub>-Konzentration). Auch von anderen Autoren wurden Unterschiede in den Ergebnissen, die an Praxisanlagen gewonnen wurden und solchen aus Laborversuchen beschrieben, u.a. von SOLDIERER (1991), PINKEPANK (1997), BRAUMILLER (2000), HOFERER (2001).



#### **5.4.2 Reale Aufenthaltszeit des Materials**

Da sich die Verwendung von *Bacillus globigii* im Labor als eine durchaus praktikable Methode zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit des Materials im Reaktor erwies, wurden die Erkenntnisse auf ausgewählte Praxisanlagen (Anlage A, G und H) übertragen. Die benötigte Menge an Sporensuspension wurde berechnet und mit dem Input eingebracht. Daraufhin wurden in bestimmten Zeitabständen Proben am Output gezogen. An jeder der drei ausgewählten Anlagen konnte *Bacillus globigii* wieder gefunden werden, unabhängig von der Größe der Reaktoren (Anlage A 350 cbm und 3 Tage bis zum Auftreten, im Vergleich Anlage H 3000 cbm und 7 Stunden bis zum Auftreten) und der Art des Beschickungsmaterials.

Die Vorteile dieses Prüforganismus sind sicherlich seine Thermoresistenz, die Tatsache, dass er im Material nicht vorkommt, sein schneller Nachweis (24 Stunden) und seine seuchenhygienische Unbedenklichkeit. Hinzu kommt, dass diese Untersuchungen jedes mikrobiologisch arbeitende Labor ohne zusätzliche kostenintensive Grundausstattung durchführen kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die *Bacillus globigii*-Methode künftig zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit (Mindestverweilzeit) des Materials im Reaktor empfohlen werden.

#### **5.5 In- und Outputanalysen (Produktprüfungen) in den Laboranlagen sowie in den Anlagen A - G**

Während der direkten Prozessprüfungen an den Laboranlagen und den großtechnischen Anlagen wurden parallel In- und Outputanalysen durchgeführt. Es wurde das Material auf das Vorkommen von Fäkalstreptokokken, Gesamtcoliformen, Fäkalcoliformen und Salmonellen überprüft. An den Laboranlagen wurden 14 Analysen des Inputmaterials, des Outputmaterials aus dem Mesophilreaktor (35 °C) und dem Thermophilreaktor (55 °C) durchgeführt (vgl. Tabellen 1 - 4). Abschließend konnte festgestellt werden, dass in keiner Probe Salmonellen nachzuweisen waren. Es konnte damit die Forderung der BioAbfV (ANONYM, 1998), die in 50 g Outputmaterial keine Salmonellen zulässt, in den Modellanlagen erfüllt werden. Eine ausreichende Hygienisierung bei Anlagen im mesophilen Temperaturbereich ohne eine zusätzliche Hygienisierungsstufe wurde nicht erreicht. Fäkalstreptokokken, die im Inputmaterial mit einer Konzentration von  $10^4$  und  $10^5$  KBE/g

nachgewiesen wurden, waren im Mesophiloutput noch in einer Konzentration von  $10^3$  und  $10^4$  KBE/g vorhanden. Dagegen konnten sie im Output aus den Thermophilanlagen in 5 von 14 Proben nicht mehr nachgewiesen werden. Sowohl Gesamtcoliforme als auch Fäkalcoliforme lagen im Inputmaterial bei einer Konzentration von  $10^3$  und  $10^4$  KBE/g und konnten im Thermophiloutput nicht mehr nachgewiesen werden. Im Mesophilreaktor waren sie in einer Konzentration von  $10^0$  bis  $10^2$  KBE/g nachweisbar.

Dies kann durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden, die zeigten, dass unter mesophiler anaerober Fermentation eine Reduktion der untersuchten Mikroorganismen zu erreichen ist, jedoch keine Eliminierung erreicht werden kann (STRAUCH, 1981; STROMBERG, 1984; BENDIXEN, 1998; PHILIPP, 1998 PHILIPP und MARTENS, 2000; EDER, 2001).

BÖHM et al. (2002) untersuchten Inputstoffe und Substratproben vor und nach der anaeroben Behandlung an 20 verschiedenen Biogasanlagen mit unterschiedlichen technischen Einrichtungen und Verfahrensprozessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Proben, die direkt aus den Anaerobreaktoren gezogen wurden eine Reduktion der Keimzahl aufwiesen, dass es jedoch im Endlager zur Erhöhung der Keimzahl kam. Zunächst ist an eine mögliche „Wiederverkeimung“ des Substrates im Endlager zu denken. Andererseits kann im Nachhinein nicht ausgeschlossen werden, dass in die Endlager oberflächlich als auch über „Kurzschlussleitungen“ Gülle und Jauche und möglicherweise auch fäkalkeimkontaminierte Oberflächenwässer (z. B. Sammelwasser einer Festmistplatte) gelangten. Über die Problematik einer Rekontamination der vermentierten Substrate berichten auch SIDHU et al. (2001), BAGGE et al. (2005) und ALBIHN und VINNERAUS (2007).

Die Frage, ob die Gülle generell auch dem Erhitzungsgebot unterzogen werden sollte, wenn sie zu Energiezwecken gemeinsam mit anderen Abfällen in Form von Kosubstraten in Anaerobanlagen verwertet wird (GEISLINGER, 2002), wurde im Februar 2006 durch die Verordnung (EG) 208/2006 (ANONYM, 2006a) geregelt. Diese Verordnung verlangt eine Erhitzung der Gülle bei  $70\text{ °C}$  für eine Stunde. Vorteile hinsichtlich des Fäkalkeimgehaltes und Salmonellenfreiheit in Proben der Endlager wären zu erwarten, vorausgesetzt, es findet keine sekundäre Kontamination des Endlagerbehälters mit unbehandelter Gülle oder Jauche statt.

An den großtechnischen Anlagen A - F wurden kontinuierlich In- und Outputanalysen durchgeführt.

Bezüglich der Salmonellen konnten alle Anlagen die Forderung der BioAbfV (ANONYM, 1998), die in 50 g Outputmaterial keine Salmonellen zulässt, erfüllen.. In allen Input- und Outputproben konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete hier die Biogasanlage C, in der der Nachweis von Salmonellen in den Inputproben möglich war. Eine Möglichkeit des Vorkommens von Salmonellen in der Gülle muss nach STRAUCH (1981) und PACHEPSKY et al. (2006) immer in Betracht gezogen werden. Das „Nichtnachweisen“ von Salmonellen im Output aller untersuchten Anlagen hat einerseits damit zu tun, dass die Salmonellen im Beschickungsmaterial möglicherweise überhaupt nicht vorhanden waren oder dass mit dem Beschickungsmaterial in die einzelnen Anlagen nur sporadisch eingebracht wurden und dies in aller Regel in geringen Konzentrationen. Das anaerobe, alkalische Faulraummilieu, auch im mesophilen Temperaturbereich hat ein Reduktionspotential (EFSA, 2007). Eine Vermehrung von Salmonellen ist daher auch in mesophilen Reaktoren nicht zu erwarten. Durch den zusätzlichen Verdünnungseffekt der Salmonellen in den Anaerobanlagen sind daher in vielen Fällen, Salmonellen im Output mesophiler Anlagen mit konventionellen Nachweismethoden nicht nachzuweisen, weil die Nachweisgrenze unterschritten ist. Allerdings konnten im Inputmaterial der Anlage C qualitativ Salmonellen nachgewiesen werden. Da in dieser Anlage C eine Hygienisierungseinheit vorgeschaltet ist (70 °C/1 Stunde) konnten die Salmonellen in dieser Erhitzungsstufe inaktiviert werden und erschienen in keiner der Outputproben. Dass die Salmonellen die Hygienisierung nicht überleben können, konnten auch MITSCHERLICH und MARTH (1984), STÖCKLEIN (2005), VINNERAS et al. (2006) und DRČA (2007) in ihren Untersuchungen feststellen.

## **5.6 Beurteilung der Prüforganismen im Vergleich zu *Salmonella Senftenberg***

Bei abschließender Betrachtung der erzielten Ergebnisse wird deutlich, dass die *Coliphagen* aufgrund ihrer höheren Tenazität und einfacherer Handhabung bzw. schnelleren Nachweis durchaus in der Lage wären, *Salmonella Senftenberg* W 775 als mikrobiologischen Parameter bei der Prozessvalidierung (Prozessüberwachung) abzulösen.

BÖHM (2003) bestätigte diese Tatsache und merkte jedoch an, dass noch Forschungsbedarf bezüglich der Phagen bestünde.

Betrachtet man *Campylobacter jejuni* so kann festgestellt werden, dass dessen Tenazität unter der von *Salmonella Senftenberg* liegt. Diese Ergebnisse wurden auch von STÖCKLEIN (2005) und DRČA (2007) bestätigt.

*Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* kann aufgrund seiner komplizierten und lang andauernden kulturellen Anzucht (ca. 9 - 12 Wochen), was auch von JÖRGENSEN (1977) angemerkt wurde, als Prüforganismus ausgeschlossen werden. Außerdem weist es bei höheren Temperaturen eine im Vergleich zu anderen getesteten Prüforganismen relativ geringe Tenazität auf.

Ähnlich wie bei den Mykobakterien gestaltet sich der Sachverhalt bei den Parasitendauerstadien von *Ascaris suum*. Bis eine entwicklungsfähige Larve entsteht, bedarf es einer Bebrütung von ca. 28 Tagen.

Die Enterokokken (*Enterococcus faecalis*) weisen zwar eine etwas höhere Tenazität auf als *Salmonella Senftenberg* W 775. Sie sind jedoch schwerer aus dem Substrat nachzuweisen, da es in den biologischen Abfällen zu Kontaminationen kommt, die vom Prüforganismus nicht abzugrenzen sind. Hierbei käme lediglich *Enterococcus faecalis* in Frage (BÖHM, 2003). Um allerdings den möglichen Prüforganismus *Enterococcus faecalis* von anderen Enterokokken, z. B. *Enterococcus faecium* eindeutig unterscheiden zu können, muss deren Nachweis neben der kulturellen Anzucht durch den molekularbiologischen Nachweis der PCR (quantitative PCR) bestätigt werden (BAYER et al., 2002).

## 6. Zusammenfassung

Um ein standardisiertes und praxistaugliches Verfahren zur „direkten Prozessprüfung“ sowohl für große kommunale als auch für kleinere landwirtschaftliche Kofermentationsanlagen zu erarbeiten, wurden zunächst in anaerob mesophil und thermophil betriebenen Laboranlagen sowie in einem Pasteurisierungsbehältnis (70 - 90 °C) geeignete Prüfkörper getestet sowie die Tenazität unterschiedlicher Prüforganismen untersucht. Dabei galt es einen Indikatororganismus zu finden, der mit konventionellen Techniken, schnell und kostengünstig nachzuweisen ist, eine hohe Thermoresistenz und epidemiologische Bedeutung besitzt.

In thermophil betriebenen Laboranlagen (55 °C) wurde daher die Tenazität von *Salmonella Senftenberg* W 775, *Ascaris suum*, *Campylobacter jejuni*, Coliphagen „Wildstamm“ sowie Coliphage T1 und *Enterococcus faecalis* untersucht. Während *Salmonella Senftenberg* W 775, *Ascaris suum* und *Campylobacter jejuni* bereits innerhalb einer Stunde inaktiviert werden konnten, überlebten *Enterococcus faecalis* 3 Stunden und ein Coliphagen „Wildstamm“ wurde noch nach mehr als 24 Stunden nachgewiesen.

Tenazitätsversuche in den mesophil betriebenen Laboranlagen (35 °C) führte bei keinem der untersuchten Prüforganismen zu einer Inaktivierung innerhalb von 24 Stunden.

Bei der Erhitzung in einem Pasteurisierungsbehältnis (70 - 90 °C) zeigte sich, dass *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* als auch *Ascaris suum* innerhalb 30 Minuten bei 70 °C zu eliminieren sind. *Enterococcus faecalis*, Coliphage „Wildstamm“ und Salmonellen waren bei 70 °C nach einer Stunde Einwirkzeit nicht mehr nachweisbar. Der Coliphage T1 konnte bei 70 °C erst nach 90 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen in acht Praxisanlagen weitestgehend bestätigt, mit der Ausnahme, dass sowohl der Coliphage „Wildstamm“ als auch der Coliphage T1 unter Praxisbedingungen bei der Pasteurisierung von 70 °C eine Stunde lang zu inaktivieren ist. Die alleinige thermophile Faulung (52 – 55 °C) reicht jedoch nicht aus, um Coliphage T1 innerhalb von 24 Stunden zu inaktivieren.

*Coliphage T1* stellt einen Prüforganismus dar, der in seiner Thermoresistenz über *Salmonella Senftenberg* W 775 und *Enterococcus faecalis* einzustufen ist. Er ist leicht handhabbar und innerhalb von einem Tag steht ein Ergebnis fest. Sein Einsatz als „Prüforganismus“ zur Prozessvalidierung ist, vor allem vor dem Hintergrund der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (ANONYM, 2002) bei der Verwertung von Kategorie-3-Material zu diskutieren, wobei in diesem Zusammenhang noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

Um ein seuchenhygienisch unbedenkliches Produkt zu erzielen, wird vorgeschlagen, im Rahmen einer direkten Prozesskontrolle in Anaerobanlagen folgende Temperatur-/Zeitkombinationen zu wählen:

- Thermophile Anlagen: 55 °C/22 - 24 Stunden
- Pasteurisierung: 70 °C/1 Stunde.

Sollte allerdings zukünftig als Prüforganismus der *Coliphage T1* relevant werden, müssen nach den vorliegenden Ergebnissen aus den Laboranlagen in der Erhitzung 70 °C/90 Minuten bzw. 80 °C/30 Minuten gefordert werden. Die thermophile Betriebsweise bei 55 °C und einer garantierten Aufenthaltszeit von 22 - 24 Stunden reicht nicht aus, um *Coliphage T1* zu eliminieren.

Im Hinblick auf thermophil betriebene Nassvergärungsverfahren ohne Vor- oder Nacherhitzungseinrichtungen, die nachweislich keine Pfropfenströmung (Durchflusströmung) gewährleisten können, ist es unerlässlich, exakte Daten zur „tatsächlichen“ Aufenthaltszeit (Mindestverweilzeit) von Substratpartikeln oder der Flüssigphase zu erhalten. Durch die Bestimmung der tatsächlichen Aufenthaltszeit von Partikeln in einer thermophil betriebenen Anaerobanlage wird die Möglichkeit eingeräumt, an jeder Anlage individuell die Kontaktzeiten der Indikatororganismen bei der Durchführung der direkten Prozessprüfung auf die vorher ermittelten Aufenthaltszeiten zu begrenzen. Die strikte Vorgabe der vorgegebenen Aufenthaltszeit bei der Prozessprüfung von 22 - 24 Stunden bei 55 °C kann damit unterschritten werden.

Als „biologischer Tracer“ wurde eine *Bacillus globigii*-Sporensuspension angewandt, da zunächst in Laboranlagen sicher gewährleistet werden konnte, dass dieses thermo-resistente Bakterium nicht in der natürlichen Flora des Substrates von Anaerobanlagen

vorkommt, sich optimal mit dem Beschickungsmaterial vermischen lässt und die Prozesseinflüsse in Anaerobanlagen nicht in der Lage sind, *Bacillus globigii* zu eliminieren.

Der Einsatz einer *Bacillus globigii*-Sporensuspension wurde an 3 ausgewählten Praxisanlagen überprüft. Ihre Verwendung als „biologischer Tracer“ zur Bestimmung der realen Aufenthaltszeit hat sich u. a. auch in einer großen kommunalen Anaerobanlage (>3.000 m<sup>3</sup>) sowie u.a. auch in einer Mischtrommel zur Klärschlamm-trocknung bewährt.

Zusätzlich zu der „direkten Prozessprüfung“ wurden die Substrate der unterschiedlichen Biogasanlagen vor und nach der thermischen Behandlung („Input- und Outputkontrolle“) auf ihren Gehalt an Salmonellen, Enterokokken und Gesamtcoliforme sowie Fäkalcoliforme untersucht. Das Ziel der Untersuchungen lag darin, die Effektivität der in den untersuchten Biogasanlagen ablaufenden Prozesse zu überprüfen. Daraus wurde ersichtlich, dass eine Inaktivierung von Mikroorganismen im thermophilen Bereich (55°C) eher gewährleistet war als im mesophilen Bereich (35°C). Jedoch ist eine vollständige Abtötung der Mikroorganismen ohne zusätzliche Hygienisierung nicht zu erreichen.

## 7. Summary

### **Studies on the microbiological safety of bio-waste fermentation products after treatment in biogas plants**

In order to establish a standardised and practice relevant method for 'direct process control', which is suitable for large communal as well as smaller agricultural co-fermentation plants, we first analysed the suitability of germ carriers and the tenacity of various test organisms. These analyses were conducted in anaerobic mesophilic and thermophilic lab-scale fermenters and in a pasteurising container (70-90°C). The aim was to identify an indicator organism that can be detected quickly and inexpensively by conventional techniques, and which is also highly thermoresistant and has epidemiological relevance.

In thermophilic lab-scale fermenters (55 °C), the tenacity of *Salmonella Senftenberg* W775, *Ascaris suum*, *Campylobacter jejuni*, 'wild type' coliphage, as well as coliphage T1, and *Enterococcus faecalis* was investigated. Whereas *Salmonella* Senftenberg W775, *Ascaris suum*, and *Campylobacter jejuni* could be inactivated within 3 hours, *Enterococcus faecalis* survived for more than 3 hours, and a wild type coliphage could be detected even after more than 24 hours.

Tenacity experiments in mesophilic lab-scale fermenters (35 °C) showed no inactivation of any of the test organisms within 24 hours.

Heating to temperatures between 70-90°C showed that both *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* and *Ascaris suum* were eliminated within 30 minutes at 70°C. *Enterococcus faecalis*, wild type coliphage, and Salmonellae could not be detected after 1 hour of incubation at 70°C. The coliphage T1 could be eliminated only after 90 minutes at 70°C.

For the most part, these results were confirmed by investigations in operating fermentation plants, with the exception that, under practice conditions, wild type coliphage as well as coliphage T1 need to be pasteurised for 1 hour at 70°C to be inactivated. The thermophilic fermentation alone (52 – 55 °C) is not enough to inactivate coliphage T1 within 24 hours.



*Coliphage T1* presents a test organism that, with regard to its thermoresistance, should be placed above *Salmonella* Senftenberg W775 and *Enterococcus faecalis*. Its handling is unproblematic and results can be obtained within a day. Its use as a 'test organism' should be discussed, especially in relation to the regulation (EC) no. 1774/2002 (ANONYM, 2002), for usage of category III material, whereby further research is needed in this context.

In order to obtain a product, which is safe with regard to health risks, it is suggested to choose the following temperature/ time combinations for direct process control in anaerobic fermenters:

- Thermophilic fermenters: 55 °C/ 22 - 24 hours
- Pasteurising: 70 C/ 1 hour.

However, if the coliphage T1 will become relevant as a test organism in the future, the present results show that heating to 70°C/ 2 hours or 80°C/ 1 hour are required. The thermophilic processes at 55°C and an assured retention time of 22-24 hours are not sufficient to eliminate coliphage T1.

With regard to thermophilic wet fermentation processes without pre- or post heating steps, which do not warrant plug flow, it is absolutely necessary to obtain data for the exact retention times (minimum retention time) of substrate particles or the liquid phase. Establishing the exact retention time of particles in a thermophilic fermentation plant offers the possibility to limit the contact times of indicator organisms to predetermined retention times of a particular fermenter during the conduct of direct process monitoring. The strict demand of the required incubation times during process monitoring of 22-24 hours could thus be shortened.

A *Bacillus globigii* spore suspension was used as a biological tracer because it could previously be shown in lab-scale fermenters that this thermoresistant bacterium, which is not present in the natural flora of substrates used in anaerobic fermenters, can be optimally mixed with infeed materials, and the influences of processes in anaerobic fermenters are unable to eliminate *Bacillus globigii*.

The use of a *Bacillus globigii* spore suspension was investigated in 3 selected treatment plants. Its value as a biological tracer to determine absolute retention times was, amongst other things, also seen in a large communal anaerobic fermentation plant (>3.000 m<sup>3</sup>), as well as in a mixing drum for drying sewage sludge.

In addition to the 'direct process control', the substrate from the different biogas plants, was examined for its *Salmonella*, enterococci and total and faecal coliforms content before and after the thermal treatment. The purpose of these assays was to ensure the efficiency of the process used in the biogas plants. According to the results of this study, thermophilic anaerobic digestion ensures better inactivation of microorganisms than anaerobic digestion at mesophilic temperatures. However, the complete inactivation of microorganisms was not possible without additional pasteurisation.

It is advisable to still call for the so-called 'direct process control' even under an amended bio-waste regulation (BioAbfV). For it provides a definite indication that the processes in a particular plant, with its given technical set-up by using defined substrates, are principally able to yield a hygienically risk-free end product.

This study was carried out in 2002. According to Regulation (EC) No. 2008/2006 (Anonymus, 2006a) from February 2006, the validation of biotechnological processes in composting and biogas plants must to be carried out using two test organisms: *Salmonella* Senftenberg H<sub>2</sub>S negative and *Enterococcus faecalis*.

## 8. Literatur

**ABULREESH, H.H., PAGET, T.A., GOULDER, R. (2005):** Recovery of thermophilic campylobacters from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. *Water Res.* **39**, 2877-2882

**ALBHIN, A., VINNERAS, B. (2007):** Biosecurity and arable use of manure and biowaste – Treatment alternatives. *Livestock Science* **112** (3), 232-239

**ANONYM (1991):** EU-Abfallrichtlinie 91/156/EWG des Rates vom 18. März 1991 zur Änderung der Richtlinie 75/442/EWG über Abfälle

**ANONYM (1994):** Gesetz zur Vermeidung, Verwertung und Beseitigung von Abfällen (-KrW-/AbfG) vom 27. September 1994, Bundesgesetzblatt I, 2705

**ANONYM (1998):** Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung – BioAbfV). Bundesgesetzblatt Teil I, G 5702, Nr. 65, ausgegeben zu Bonn am 28. September 1998, 2955-2981

**ANONYM (2002a):** Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte; Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 03. Oktober 2002

**ANONYM (2002b):** BMVEL, Hrsg. Bundesministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Merkblatt zur Errichtung und zum Betrieb von Biogasanlagen im landwirtschaftlichen Bereich, Berlin

**ANONYM (2003):** Düngemittelverordnung, Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln. vom 26. November 2003, Bundesgesetzblatt I 2003 Nr. 57

**ANONYM (2004):** Gesetz zur Durchführung gemeinschaftsrechtlicher Vorschriften über die Verarbeitung und Beseitigung von nicht für den menschlichen Verzehr bestimmten tierischen Nebenprodukten (TierNebG) vom 25. Januar 2004 (BGBl. I S. 82)

**ANONYM (2005a):** Verordnung (EG) Nr. 12/2005 der Kommission vom 6. Januar 2005 zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 809/2003 hinsichtlich der Verlängerung der Gültigkeit der Übergangsmaßnahmen für Kompostier- und Biogasanlagen gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates (ABl. EG Nr. L 5 S. 3)

**ANONYM (2005b):** Verordnung (EG) Nr. 79/2005 der Kommission vom 19. Januar 2005 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Verwendung von Milch, Erzeugnissen auf Milchbasis und aus Milch gewonnenen Erzeugnissen, die in der genannten Verordnung als Material der Kategorie 3 definiert sind (ABl. EG Nr. L 16 S. 46)

**ANONYM (2005c):** Verordnung (EG) Nr. 92/2005 der Kommission vom 19. Januar 2005 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Maßnahmen zur Beseitigung oder Verwendung tierischer Nebenprodukte und zur Änderung des Anhangs VI hinsichtlich der Biogas-Verarbeitung und der Verarbeitung von ausgelassenen Fetten (ABl. EG Nr. L 19 S. 27)

**ANONYM (2005d):** Verordnung (EG) Nr. 93/2005 der Kommission vom 19. Januar 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Verarbeitung von aus Fischen gewonnenen tierischer Nebenprodukte und der Handelspapiere für die Beförderung von tierischen Nebenprodukten (ABl. EG Nr. L 19 S. 34)

**ANONYM (2006a):** Verordnung (EG) Nr. 208/2006 der Kommission vom 7. Februar 2006 zur Änderung der Anhänge VI und VII der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments mit den Daten hinsichtlich der Verarbeitungsstandards für Biogas- und Kompostieranlagen sowie den Bestimmungen über Gülle. ABL. L 273 vom 10.10.2002 der 1. Verordnung zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) nr. 416/2005 der Kommission (ABL. L 66 vom 12.3.2005, S.10)

**ANONYM (2006b):** Entwurf einer Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes (Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung TierNebV). Bundesrat Drucksache 365/06 vom 26. Mai 2006

**ANONYM (2007):** Fachverband Biogas e.V.: Biogasnutzung in den Bundesländern – 2007 Quelle: Erhebung bei Ministerien und angegliederten Behörden durch den Fachverband Biogas e.V., Stand: 09/07,\* geschätzt): Angerbrunnenstraße 12 D-85356 Freising

**APHA (1998):** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation, Washington, D.C, 20<sup>th</sup> Edition

**BAGGE, E., SAHLSTRÖHM, L., ALBIHN, A. (2005):** The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* **39** (20), 4879-4886

**BANG, B. (1906):** Die chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berl. Tierärztl. Wochenschr.* **42**, 759-763

**BAYER, C., BAYER, W., BÖHM, R., PHILIPP, W. (2002):** Untersuchungen zur Eignung von Indikatororganismen zur Beurteilung der Hygienisierung in Anaerobanlagen – Evaluierung und Etablierung eines neuen PCR-Konzeptes zum quantitativen Nachweis phyto- und seuchenhygienisch relevanter Organismen. AZ – 08965 Dt. Bundesstiftung Umwelt, 49007 Osnabrück

**BEHMEL U., GLEIXNER, A.J. (1995):** Mikrobiologische und technologische Grundlagen der Biogaserzeugung aus organischen Reststoffen und organisch hoch belasteten Abwässern. *Innovas News* **2**, 1-8

**BENDIXEN, H.J. (1994):** Safeguards against pathogens in danish biogas plants. *Wat. Sci. Tech.* **30** (12), 171-180

**BENDIXEN, H.J. (1998):** Hygienische und sanitäre Anforderungen an dänische Biogasanlagen. Tagungsband „50 Jahre Biogas in der Landwirtschaft“. Fachverband Biogas e. V.

**BISPING, W., AMTSBERG, G. (1988):** Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, 119-120

**BLOBEL, H., SCHLIESSER, T. (1994):** Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart, Jena-Stuttgart

**BOCH, J., SUPPERER, R. (1992):** Veterinärmedizinische Parasitologie. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 4. Auflage

**BÖHM, R. (1993):** Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **100**, 275-278

**BÖHM, R. (1995):** Die Problematik der Festsetzung mikrobiologischer Grenz- und Richtwerte in der Umwelthygiene. Tagungsband zur 27. Hohenheimer Umwelttagung: Grenzwerte und Grenzwertproblematik im Umweltbereich, 27. Januar 1995, Universität Hohenheim, 75-86

**BÖHM, R., MARTENS, W., BITTIGHOFER, P.M. (1998):** Aktuelle Bewertung der Luftkeimbelastung in Abfallbehandlungsanlagen. M.I.C. Baeza-Verlag, Witzenhausen, Deutschland

**BÖHM, R. (2003):** What need for specific rules for composting of biowaste and catering waste. In: LANGENKAMP, H., MARMO, L. (Hrsg.): Biological treatment of biodegradable waste, technical aspects, Workshop, European Commission, Joint Research Centre, EUR 20517 EN, 45-63

**BÖHM, R. (2005):** Auswirkungen der veränderten rechtlichen Rahmenbedingungen auf die Verwertung organischer Rest- und Abfallstoffe in Kofermentationsanlagen aus der Sicht der Hygiene (EU-Bund-Land) unveröffentlichter Bericht, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart

**BRAUMILLER, P. (2000):** Dissertation. In Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart

**BRAUMILLER, P., MARTENS, W., PHILIPP, W., BÖHM, R. (2000):** Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikator-Bakterien und –Viren im Kompostierungsprozess. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben 95 HS 059: Aerobe und anaerobe Behandlung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft unter den Aspekten der Seuchenhygiene, Teil B, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart

**BRENNAN, P.J., NIKAIDO, H. (1995):** The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29-63

**BUROW, H. (1998):** *Salmonella Typhimurium* DT104 bei Lebensmitteluntersuchungen in Nordbayern – Vergleichende Analyse zu *S. Enteritidis* PT4/6. *Bundesgesundheitsblatt* **4**, 153-156

**BUTZLER, J.-P. (1984):** *Campylobacter* infection in man and animals. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida

**CARRINGTON, E.G., HARMAN, S.A., PIKE, E.B. (1982):** Inactivation of *Salmonella* during anaerobic digestion of sewage sludge. *J. Appl. Bacteriol.* **53**, 331-334

**CHIODINI, R.J., VAN KRUININGEN, H.J., MERKAL, R.S. (1984):** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornvell Vet.* **74**, 218-262

- CHIODINI, R.J., HERMON-TAYLOR, J. (1993):** The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. Invest **5**, 629-631
- CLARKE, C.J. (1997):** The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp Pathol. **116**, 217-261
- COLLINS, M.T. (1996):** Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12** (2), 357-371
- DEDIE, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.-J., WEINKE T. (1993):** Streptokokkeninfektionen als Zoonosen. In: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 330-334
- DE MAN, J. C. (1983) :** MPN Tables, Corrected. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. **17**, 301-305
- D'HERELLE, F. (1917):** Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. C. R. Acad. Sci. Ser. D **165**, 373-375
- DOYLE, M. P., ROMAN, D.J. (1981):** Growth and survival of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* as a function of temperature and pH. J. Food Protect. **44**, 596-601
- DRČA, M., PHILIPP, W., BÖHM, R. (2004):** Standardisierung von Biogasanlagen zur Verwertung hygienisch bedenklicher Reststoffe und nachwachsender Rohstoffe im Rahmen einer ganzheitlichen Energienutzung („Biokraft Donaueschingen“). Endbericht Teil 2 zum Forschungsvorhaben KF 0226701 KGWO, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart
- 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. Vet.-med. Diss., Universität Leipzig
- EDER, B. (2001):** Hygienisierungswirkung von Biogasanlagen. In: SCHULZ, H., EDER, B. (Hrsg.): Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele. Ökobuch, Staufen bei Freiburg, 130-136
- EEG - ERNEUERBARE-ENERGIEN-GESETZ (2004):** Gesetz für den Vorrang erneuerbarer Energie vom 1. August 2004. BGBl. I S. 2378

**EFSA (2007):** Opinion 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

**ENIGK, K., THAER, R., DEY-HAZRA, A., AHLERS, R. (1975):** Die Überlebensfähigkeit parasitärer Dauerformen bei der Fermentation von Rinderflüssigmist unter erhöhten Temperaturen. Zbl. Vet. Med. B **22** (8), 687-702

**ERICHSEN, H., ULLMANN, U. (1994):** Zur Entwicklung der durch Salmonellen verursachten Enteritidis infectiosa in Schleswig-Holstein in den Jahren 1989 bis 1992. Bundesgesundheitsblatt **2**, 69-73

**FARMER, J.J., BRENNER, D.J. (1977):** Concept of a bacterial species: importance to writers of microbiological standards for water. In: HOADLEY, A. W.; B. J. DUTKA (Eds.): Bacterial indicators/Health hazards associated with water. ASTM STP 635, American Society for Testing and Materials, 37-47

**GALLAY, A., DE VALK, H., COURNOT, M., LADEUIL, B., HEMERY, C., CASTOR, C., BON, F., MEGRAUD, F., LE CANN, P., DESENCLOS, J.C. (2006):** A large multipathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. Clin. Microbiol. Infect. **12**, 561-70

**GAY, J.M., SHERMAN, D.M. (1992):** Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. Vet. Med. **87**, 1133-1139

**GERICKE, B.; H. CLAUS; M. VOIGT; H. TSCHÄPE; G. RASCH; H. HOLLER; H. WAGNER (1999):** Die epidemiologische Situation der Salmonellose in Deutschland 1997. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **42**, 196-205

**GEWECKE, M., KÜNZEL, H. (1989):** Human- und Veterinärhygiene. In: FRICKE, K., TURK, T., VOGTMANN, H. (Hrsg.): 1. Witzenhausener Abfalltage: Grundlagen zur Kompostierung von Bioabfällen, Packnicke Druck, 227-242

**GREWAL, S.K., RAJEEV, S., SREEVATSAN, S., MICHEL, F.C. (2006):** Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Other Zoonotic Pathogens during Simulated Composting, Manure Packing, and Liquid Storage of Dairy Manure. Appl. Environ. Microbiol. **72** (1), 565–574

**GREWAL, S., SREEVATSAN, S., MICHEL, F.C. (2007):** Persistence of *Listeria* and *Salmonella* During Swine Manure Treatment. Compost Science & Utilization **15** (1), 53-62



**GUAN, T.Y., HOLLEY, R.A. (2003):** Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness – A review. *J. Environ. Qual.* **32**, 383-392

**HAHN, G., HEESCHEN, W., TOLLE, A. (1970):** *Streptococcus*. Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte **22**, 333-546

**HAIBLE, C. (1989):** Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen über die Langzeitlagerung von Klärschlamm. Vet.-med. Diss., Universität Gießen

**HARTUNG, M. (1993):** Vorkommen der Enterits-Salmonellen in Lebensmitteln und bei Nutztieren 1991. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **100**, 252-255

**HEINONEN-TANSKI, H., MOHAIBES, M., KARINEN, P., KOIVUNEN, J. (2006):** Methods to reduce pathogen microorganisms in manure. *Livestock Science* **102** (3), 248-255

**HEROLD, T., KLICHE, R., HENSEL, A. (1999):** Effect of aerobic fermentation on the survival of *Salmonella typhimurium* (DT 104) and *Escherichia coli* in swine liquid manure. *Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr.* **112** (12), 448-53

**HERTWIG, K.-P. (2004):** Seuchenhygienische Untersuchungen bei der Trocknung und Pelletierung von Klärschlamm. Diplomarbeit, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, Stuttgart

**HIEPE, T., BUCHWALDER, R. (1991):** Wirtschaftsdünger als Vektor für Parasiten - ein Erfahrungsbericht. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **98**, 268-272

**HILLIGER, H.G., FRERKING, H., JACOB, A., KÜTTLER, D., LOTTHAMMER, K.-H. (1991):** Tierärztliche Stellungnahme zum infektionshygienischen Risiko beim Betrieb von Gemeinschaftsanlagen für Flüssigmistlagerung. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **98**, Heft 2, Februar 1991, 41-76

**HOBSON, P.N., SHAW, B.G. (1974):** The bacterial population of piggery-waste anaerobic digesters. *Water Res.* **8**, 507-516

**HÖCHST, C. (2002):** Genehmigung und Überwachung von Biogasanlagen im landwirtschaftlichen Bereich. Beitrag im Tagungsband 11. Jahrestagung: Biogas und Bioenergie in der Landwirtschaft, 5. und 6. Dezember, Rot am See, Internationales Biogas und Bioenergie Kompetenzzentrum, Kirchberg

**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. Vet.-med. Diss., Freie Universität Berlin

**HOPPENHEIDT, K., MÜCKE, W. (2000):** Hygieneanforderungen an Verfahren und Produkte bei der Bioabfallverwertung. LfU-Fachseminar „Vollzug der Bioabfallverordnung“ – 06. Juni 2000, Augsburg

**ISLAM, M., MORGAN, J., DOYLE, M.P., PHATAK, S.C., MILLNER, P., JIANG, X. (2004):** Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Appl. Environ. Microbiol. **70**, 2497-2502

**JOHNE, H.A., FROTHINGHAM, L. (1885):** Ein eigentümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. Dtsch. Zschr. Tiermed. **21**, 438-454

**JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J.; J. B. KANEENE (1997):** Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. **210**, 1735-1740

**JÖRGENSEN, J.B. (1977):** Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet. Med. **24**, 267-270

**JUTEAU, P., TREMBLAY, D., OULD-MOULAYE, C.-B., BISAILLON, J.-G., BEAUDET, R. (2004):** Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors. Water Res. **38**, 539-546

**KEHRES, B. (2003):** Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 zur Hygiene ist seit 01.05.2003 in Kraft. In: BGK und BHE (Hrsg.): Humuswirtschaft und Kompost 2/03, **9.** Jahrgang, 96-104

**KERN, M. (1999):** Übersicht über ökonomische Rahmenbedingungen bei der Kompostierung und der Anaerobbehandlung. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29. - 31. März 1999, Universität Hohenheim, 95-111

**KLAGES, S. (2003):** Bilddokumentation bei einer Biogasanlagenbesichtigung. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), Bartningstraße 49, 64289 Darmstadt

**KLAUS, S., KRÜGER, D.H., MEYER, J. (1992):** Bakterienviren. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

**KÖHLER, B. (1993):** Beispiele für die Anreicherung von Salmonellen in der Umwelt. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **100**, 264-274

- LAMBRECHT, R.S., CARRIERE, J.F., COLLINS, M.T. (1988):** A model of analysing growth kinetics of a slowly growing Mycobacterium sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 910-916
- LANG, A. (1987):** Mikrobiologische Untersuchungen über die Eignung verschiedener Indikatororganismen zur seuchenhygienischen Beurteilung von Klärschlamm. *Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim*
- LARSEN, H.E., MUNCH, B., SCHLUNDT, J. (1994):** Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in biogas plants. *Zbl. Hyg.* **195**, 544-555
- LIEBMANN, H. (1967):** Die hygienischen Anforderungen an die Schlammpasteurisierung und ihre Kontrolle in der Praxis. *I. A. M. Informationsblatt Nr. 30/1967*
- LOCHER, S. (1954):** Die Widerstandsfähigkeit von Zooparasiteneiern und Larven gegen Gülle und Jauche. *Vet.-med. Diss., Universität München*
- LUND, B., JENSEN, V.F., HAVE, P., AHRING, B. (2004):** Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek.* **69** (1), 25-31
- DE MAN, J.C. (1983):** MPN-Tables, Corrected. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 301-305
- MARTENS, W., FINK, A., PHILIPP, W., WEBER, A., WINTER, D., BÖHM, R. (1999):** Seuchenhygienische Bedeutung von Anaerobverfahren. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.- 31. März 1999, Universität Hohenheim, 150-163
- MERKAL, R.S., KOPECKY, K.E., LARSEN, A.B. (1968):** Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am. J. Vet. Res.* **29**, 1533-1538
- MERKAL, R.S., KOPECKY, K.E., LARSEN, A.B. (1970):** Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* **31**, 475-485
- MEYER, H., STEINBACH, G., METHNER, U. (1993):** Bekämpfung von Salmonella-Infektionen in Tierbeständen - Grundlage der Reduzierung des Salmonelleneintrags in Lebensmittel. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **100**, 249-300
- MITSCHERLICH, E., MARTH, E.H. (1984):** *Microbial survival in the Environment.* Springer Verlag - Berlin

- MOCÉ-LLIVINA, L., MUNIESA, M., PIMENTA-VALE, H., LUCENA, F., JOFRE, J. (2003):** Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9), 1452-1456
- MOMOTANI, E., WHIPPLE, D.L., THIERMANN, A.B., CHEVILLE, N.F. (1988):** Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* **25**, 131-137
- MONTEITH, H.D., SHANNON, E.E., DERBYSHIRE, J.B. (1986):** The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. *J. Hyg.* **97**, 175-184
- MOSS, A. (2000):** Aerobe und anaerobe Behandlung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft unter den Aspekten der Seuchenhygiene. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere. 95 HS 095
- OLSEN, J.E., JÖRGENSEN, J.B., NANSEN, P. (1985):** On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion. *Agric. Wastes* **13**, 273-280
- PACHEPSKY, Y.A., SADEGHI, A.M., BRADFORD, S.A., SHELTON, D.R., GUBER, A.K., DAO, T. (2006):** Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. *Agricultural Water Management* **86**, 81-92
- PALUSZAK, Z., OLSZEWSKA, H. (2000):** Einfluß der Temperatur auf die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* in gelagerter Rindergülle. *Tierärztl. Umschau* **55**, 45-48
- PESARO, F., SORG, I., METZLER, A. (1995):** In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1), 92-97
- PHILIPP, W., GRESSER, R., MICHELS, E., STRAUCH, D. (1990):** Vorkommen von Salmonellen in Gülle, Jauche und Stallmist landwirtschaftlicher Betriebe in einem Wasserschutzgebiet, *Forum Städte-Hygiene* **41**, 209-212
- PHILIPP, W., KUHN, E. (1998):** Hygiene und Umweltaspekte. In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (Hrsg.): Kofermentation, KTBL-Arbeitspapier 249, KTBL, Darmstadt, 29-40

**PHILIPP, W. (2002a):** Hygieneprobleme und Risikobetrachtung bei der Anwendung von organischen Düngemitteln. Bericht, Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim

**PHILIPP, W. (2002b):** Verfütterungsverbot von Speiseresten-Zukünftige Verwertung in Biogasanlagen. Beitragung im Tagungsband 11. Jahrestagung, Biogas und Bioenergie in der Landwirtschaft, 5. und 6. Dezember 2002, Rot am See, Internationales Biogas und Bioenergie Kompetenzzentrum, Kirchberg

**PHILIPP, W. (1998):** Ausbringung von Biogasgülle in Wasserschutzgebieten. In: F. B. e.V. (Hrsg.): 50 Jahre Biogas in der Landwirtschaft

**PHILIPP, W., MARTENS, W. (2000):** Hygieneuntersuchungen - Anforderungen, Probleme, Lösungswege. Tagungsband "Mit Biogas ins nächste Jahrtausend". Fachverband Biogas e.V.

**PINKEPANK, T., BÖHM, R., MARTENS, W., PHILIPP, W. (1997):** Untersuchungen zur Seuchenhygiene bei der Vergärung (Kofermentation) von Speiseabfällen zusammen mit Gülle. Abschlußbericht zum FVO, Nr. U 47-95.07/2, Institut für Umwelt und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim

**PLACHY, P., PLACHA, I., JURIS, P. (1997):** Effect of anaerobic stabilization of sewage sludges on the survival of *Ascaris suum* under laboratory conditions. *Helminthologia* **34**, 229-234

**PLYM-FORSHELL, L. (1995):** Survival of *Salmonellas* and *Ascaris suum* eggs in a termophilic BGP. *Acta. Vet. Scand.* **36** (1), 79-85

**RAPP, A. (1995):** Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Güllegemeinschaftsanlagen. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim

**RICHARDS, W.D. (1988):** The apparent effect of environmental acidity on the incidence of paratuberculosis. In: MERKAL, R.S., THOREL, M.F (Eds.): Second International Colloquium on Paratuberculosis, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Maisons-Alfort, France

**ROLLE, M., MAYR, A. (1993):** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Auflage

**ROSENBERGER, G. (1978):** Infektionskrankheiten des Verdauungsapparates. In: ROSENBERGER, G. (Hrsg.): Krankheiten des Rindes, Verlag Parey, Berlin, Hamburg, 2. Auflage, 756-760

**SAHLSTRÖM, L. (2006):** Recycled biowaste as a source of infection. Doctoral thesis-Swedish University of Agricultural Sciences-Uppsala. ISSN 1652-6880

**SCHIRM, V. (2005):** Entwicklung einer sicheren Methode zur Bioabfallhygienisierung mit Kalk. Vet.-med. Diss., Universität Gießen

**SCHLEIFER, R., KILPPER-BAELZ, K.H. (1984):** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Internat. J. System. Bacteriol. **34**, 31-34

**SCHNIEDER, T. (2000):** Helminthosen des Schweines. In: ROMMEL, M., ECKERT, J., KUTZER, E., KÖRTING, W., SCHNIEDER, T.: Veterinärmedizinische Parasitologie, Parey Buchverlag, Berlin, 5. Auflage, 445-485

**SCHOLWIN, F., WEIDELE, T., GATTERMANN, H., SCHATTAUER, A., WEILAND, P. (2004):** Grundlagen der anaeroben Fermentation. In: Handreichung-Biogasgewinnung. Herausgegeben von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. 2004; 36-85

**SCHROETER, A., PIETZSCH, O., STEINBECK, A., BUNGE, C., BÖTTCHER, U., WARD, L.R., HELMUTH, R. (1991):** Epidemiologische Untersuchungen zum *Salmonella Enteritidis*-Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland 1990. Bundesgesundheitsblatt **4**, 147-151

**SCHULZE, E. (1996):** *Campylobacter*. In: SCHULZE, E. (Hrsg.): Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 87-92

**SCHÜLER, C., IDELMANN, M., WALDOW, F., WOLF, G.A. (1996):** Phytohygiene der Bioabfallkompostierung – Ergebnisse der DBU-Vorhabens (Projekt 01766). In: STEGMANN, R. (Hrsg.): Neue Techniken der Kompostierung. Dokumentation des 2. BMBF-Statusseminars in Hamburg vom 6.-8. November 1996, Hamburger Berichte 11, Economica Verlag. 201-219

**SCHWARZ, M. (2003):** Vergleichende seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an horizontal und vertikal beschickten, bewachsenen Bodenfiltern mit vorgeschalteter Mehrkammerausfallgrube bzw. einem als Grobstoff-Fang dienenden Rottebehälter (Rottefilter). Vet.-med. Diss., Freie Universität Berlin

**SEITZ, S.E., HEIDER, L.E., HEUSTON, W.D., BECH-NIELSEN, S., RINGS, D.M., SPANGLER, L. (1989):** Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. **194**, 1423-1426

**SELBITZ, H.J. (1992):** Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

**SIDHU, J., GIBBS, R.A., HO, G.E., UNKOVICH, I. (2001):** The role of indigenous microorganisms in suppression of *Salmonella* regrowth in composted biosolids. Water Res. **35**, 913-20

**SMITH, S.R., LANG, N.L., CHEUNG, K.H., SPANOUDAKI, K. (2005):** Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. Waste Manag. **25**, 417-25

**SKIRROW, M.B., BLASER, M.J. (1992):** Clinical and Epidemiological Considerations. In: NACHAMKIN, I., BLASER, M.J., TOMKINS, L.S. (Eds.): *Campylobacter jejuni*, Current Status and Future Trends, American Society of Microbiology, Washington D. C., 3-9

**SOLDIERER, W. (1991):** Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß einer thermischen Desinfektion von Flüssigmist auf die Vermehrungsfähigkeit ausgewählter Mikroorganismen. Vet.-med. Diss., Universität Gießen

**SOLDIERER, W., STRAUCH, D. (1991):** Kinetik der Inaktivierung von Salmonellen bei der thermischen Desinfektion von Flüssigmist. J. Vet. Med. B. **38**, 561-574

**SORLINI, C., BONFATI, P. (1989):** Digestion of animal slurries: Technological, chemical, microbiological, and managerial aspects. Biological Waste Treatment 203-234

- SPILLMANN, S.K., TRAUB, F., SCHWYZER, M., WYLER, R. (1987):** Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** (9), 2077-2081
- SPOELSTRA, S. F. (1983):** Microbial observations on the storage of pig waste as slurry and cage layered manure as silage. In: STRAUCH, D. (Ed.): Hygienic problems of animal manures. Proc. CEC-, DVG-, FAO-meeting, Universität Hohenheim, Stuttgart, 45-62
- STELZER, W., JAKOB, J., SCHULZE, E., MOCHMANN, H. (1991):** Untersuchungen zum Vorkommen und Überleben von *Campylobacter* im Klärschlamm. *Zentralbl. Mikrobiol.* **146**, 17-23
- STÖCKLEIN, B.A. (2005):** Untersuchungen zur Tenazität von ausgewählten Mikroorganismen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von *Campylobacter jejuni* und *Clostridium perfringens*. *Vet.-med. Diss.*, Freie Universität Berlin
- STRAUCH, D. (1971):** Massentierhaltung und öffentliche Gesundheit. *Hohenheimer Arbeiten* **57**, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 5-18
- STRAUCH, D. (1981):** Hygienische Gesichtspunkte der Lagerung und Ausbringung von Stallmist und Gülle. *D. Tierzüchter* **33**, 149-150
- STRAUCH, D. (1987):** Hygiene of animal waste management. In: STRAUCH, D. (Ed.): *Animal production and environmental health*. Elsevier, Amsterdam, 155-202
- STRAUCH, D. (1997):** Hygieneaspekte bei der Nutzung landwirtschaftlicher Biogasanlagen zur Kofermentation. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* **1+2**, 61-69+121-132
- STRAUCH, D., BERG, T. (1980):** Mikrobiologische Untersuchungen zur Hygienisierung von Klärschlamm, 6. Mitteilung: Mikrobiologische Untersuchungen an einem Verfahren zur Schlammverfestigung mit Branntkalk, *Gwf Wasser/Abwasser* **121** (10), 493-495
- STROMBERG, A.V. (1984):** Mesophiler aerober bzw. fakulatativ anaerober Keimbesatz von Frischgülle und Faulschlamm der Biogaskgewinnung. *Vet. med. Diss.*, München
- SWEENEY, R.W. (1996):** Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**, 305-312.



**SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., ROSENBERGER, A.E. (1992):** *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol. **30**, 166-171

**TAYLOR, T.K., WILKS, C.R., MCQUEEN, D.S. (1981):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne`s disease. Vet. Rec. **109**, 532-533

**THOREL, M.F., KRICHEVSKY, M., LEVY-FREBAULT, V.V. (1990):** Numeral taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* ssp. *avium* ssp. nov., *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ssp. nov., and *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* ssp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**, 254-260

**TRAUB, F., SPILLMANN, S.K., WYLER, R. (1986):** Method for determining virus inactivation during sludge treatment process. Appl. Environ. Microbiol. **52** (3), 498-503

**TURNER, C., WILLIAMS, S.M., BURTON, C.H., CUMBY, T.R., WILKINSON, P.J., FARRENT, J.W. (1999):** Pilot scale thermal treatment of pig slurry for the inactivation of animal virus pathogens. J. Environ. Sci. Health B **34** (6), 989-1007

**VINNERAS, B., SCHÖNNING, C., NORDIN, A. (2006):** Identification of the microbiological community in biogas system and evaluation of microbial risks from gas usage. Sci. Total Environ. **267**, 606-615

**WATANABE, H., KITAMURA, T., OCHI, S., OZAKI, M. (1997):** Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions. Wat. Sci. Tech. **36**, 25-32

**WEIGEL, T. (1995):** Untersuchungen des Infiltrationsverhaltens von Mikroorganismen in Böden mittels Gruben- und Laborversuchen sowie eines selbst entwickelten Prototyps zur Probennahme ohne Sekundärkontamination. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim

**WEILAND, P. (1999):** Übersicht über angewendete Anaerobverfahren zur biologischen Abfallbehandlung. Tagungsband zum 7. Hohenheimer Seminar: Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 29.-31. März 1999, Universität Hohenheim, 83-94

**WELLINGER, A., BASERGA, U., EDELMANN, W., EGGER, K., SEILER, B. (1991):** Biogas-Handbuch. Verlag Wirz AG, Aarau

**WESTPHAL, P.A., CHRISTENSEN, G.L. (1983):** Lime Stabilisation: Effectiveness of Two Process Modification. Journal WPCF **55** (11), 1381-1386

**WHITLOCK, R.H., HUTCHINSON, L.T., SWEENEY, R.W., SPENCER, P.A., ROSENBERGER, A.E., VAN BUSKIRK, M.A. (1994):** Pattern of detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infected cattle in ten dairy herds cultured every six months for four years. In: CHIODINI, R.J., COLLINS, M.T., BASSEY, E.O.E. (Eds.): Proceedings on the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis, Cambridge, 17.-21. July, 47-53

**WHO (1986):** Programme for control of diarrhoeal diseases. Interim Programme Report, WHO/CDD/87.26

**ZESCHMAR-LAHL, B., JAGER, E., RÜDEN, H. (1994):** Die Hygieneproblematik in der Abfallwirtschaft. Entsorgungspraxis 1-2, 20-25

## 9. Anhang

Vorbemerkung: Parallel mit dem Einbringen der Prüfkörper zur direkten Prozessprüfung der großtechnischen Anlagen A bis F wurden mehrfach Proben zur In- und Outputanalyse entnommen. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf KBE/PFU g (Koloniebildende Einheiten/Plaque forming units) Substrat.

Tab. A 1: Erste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage A (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Gülle+Fett)</b>	$1,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	n. n.	6,77
<b>Fermenter</b>	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	n. n.	7,81
<b>Lager</b>	$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	n. n.	7,78

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 2: Zweite Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage A (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Gülle+Fett)</b>	$9,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	n. n.	6,81
<b>Fermenter</b>	$9,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	n. n.	6,88

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 3: Erste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage B (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Fermenter</b>	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	n. n.	7,28

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 4: Zweite Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage B (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
Fermenter	$1,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	n. n.	7,56

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 5: Dritte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage B (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
Input (Mist)	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	n. n.	8,44
Fermenter	$1,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	n. n.	7,78
Lager	$2,0 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	n. n.	7,72

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 6: Vierte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage B (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
Input (Mist)	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	n. n.	8,3
Fermenter	$2,3 \times 10^3$	$7,5 \times 10^1$	$7,5 \times 10^1$	n. n.	7,9
Lager	$9,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	n. n.	7,9

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 7: Erste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage C (mesophil mit vorgeschalteter Hygienisierungseinheit)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	Coliphagen	pH-Wert
Input (Gülle)	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	0:7	$2,3 \times 10^2$	7,24
Fermenter 1	$1,5 \times 10^1$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	8,04
Fermenter 2	$1,5 \times 10^3$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,92
Hygieneinput	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	0:7	$3,1 \times 10^2$	7,06

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 8: Zweite Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage C (mesophil mit vorgeschalteter Hygienisierungseinheit)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	Coliphagen	pH-Wert
Input (Gülle)	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	0:7	$4 \times 10^2$	7,4
Fermenter 1	$9,2 \times 10^0$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	n. n.	n. n.	8,1
Fermenter 2	$2,4 \times 10^2$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	8,0
Hygieneinput	$2,4 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	0:7	$1,5 \times 10^2$	7,3

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 9: Dritte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage C (mesophil mit vorgeschalteter Hygienisierungseinheit)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	Coliphagen	pH-Wert
Input (Gülle)	$9,3 \times 10^4$	$9,2 \times 10^3$	$9,2 \times 10^3$	0:7	$5 \times 10^2$	7,23
Fermenter 1	$4,3 \times 10^2$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	8,10
Fermenter 2	$4,3 \times 10^2$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	8,02
Hygieneinput	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	0:7	$2 \times 10^2$	7,27

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 10: Vierte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage C (mesophil mit vorgeschalteter Hygienisierungseinheit)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	Coliphagen	pH-Wert
Input (Gülle)	$9,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	0:7	$4 \times 10^2$	6,72
Fermenter 2	$2,4 \times 10^2$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,96
Hygieneoutput	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,60
Hygieneinput	$9,3 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	0:7	$3 \times 10^2$	6,54

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 11: Erste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage D (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	Coliphagen	pH-Wert
<b>Input (Gülle)</b>	$2,4 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	n. n.	$3 \times 10^2$	7,91
<b>Fermenter 1</b>	$4,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	n. n.	n. n.	8,08
<b>Fermenter 2</b>	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^1$	$2,4 \times 10^1$	n. n.	n. n.	8,10

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 12: Zweite Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage D (mesophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	Coliphagen	pH-Wert
<b>Input (Gülle)</b>	$2,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	n. n.	$2,8 \times 10^2$	7,80
<b>Fermenter 1</b>	$2,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	n. n.	n. n.	7,90
<b>Fermenter 2</b>	$2,3 \times 10^6$	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	8,00

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 13: Erste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett)</b>	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	n. n.	4,10
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	n. n.	7,46

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 14: Zweite Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	4,64
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$7,5 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	n. n.	7,79
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,89
<b>Endlager</b>	$9,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	n. n.	5,67

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 15: Dritte Probenahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n. n.	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	n. n.	5,20
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$9,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	n. n.	7,70
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,80
<b>Endlager</b>	$4,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	n. n.	6,10

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 16: Vierte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n. n.	$2,3 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	n. n.	5,20
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$9,3 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	n. n.	7,70
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,80
<b>Endlager</b>	$4,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	n. n.	6,10

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 17: Fünfte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n.n.	$3,6 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$	n. n.	4,70
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$2,4 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	$3,6 \times 10^0$	n. n.	7,70
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,90
<b>Endlager</b>	$9,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	n. n.	5,80

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 18: Sechste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n. n.	$3,6 \times 10^0$	$3,6 \times 10^0$	n. n.	4,16
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	n. n.	8,00
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	$3,6 \times 10^0$	n. n.	n. n.	n. n.	7,85
<b>Endlager</b>	$2,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	n. n.	6,82

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 19: Siebte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	4,30
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$4,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	n. n.	7,98
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	$2,1 \times 10^1$	n.n.	n. n.	n. n.	7,80
<b>Endlager</b>	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	n. n.	6,95

n. n.: nicht nachweisbar



Tab. A 20: Achte Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage E (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input (Fett + Kart)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	3,94
<b>Fermenter 1 (mesophil)</b>	$4,3 \times 10^5$	$3,6 \times 10^0$	$3,6 \times 10^0$	n. n.	7,47
<b>Fermenter 2 (thermophil)</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,86
<b>Endlager</b>	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	n. n.	4,30

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 21: Erste Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage F (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input</b>	$7,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	n. n.	7,90
<b>Fermenter 1</b>	$4,3 \times 10^4$	n. n.	n. n.	n. n.	6,10
<b>Lager</b>	$4,3 \times 10^5$	n. n.	n. n.	n. n.	7,70

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 22: Zweite Probennahme zur In- und Outputanalyse an der Anlage F (thermophil)

Art der Probe bzw. Entn.ort	Fäkalstreptokokken	Gesamtcoliforme	Fäkalcoliforme	Salmonellen	pH-Wert
<b>Input</b>	$4,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	n. n.	7,80
<b>Fermenter 1</b>	$4,3 \times 10^1$	n. n.	n. n.	n. n.	6,00
<b>Lager</b>	$4,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	n. n.	7,80

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. A 23: Einzelergebnisse der Tenazitätsversuche während der Hygienisierung  
(Angaben in KBE/g)

<b>Phage T1</b>					
Entnahme	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
Nullprobe	$4,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
50 °C	$2,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
60 °C	$2,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
70 °C	n.n.	$7,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
71,76 °C	n.n.	n.n.	$1,4 \times 10^1$	n.n.	$1,4 \times 10^1$
71,66 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Phage "Wildstamm"</b>					
Entnahme	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
Nullprobe	$5,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
50 °C	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
60 °C	$1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$6,4 \times 10^4$
70 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
71,76 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
71,66 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Salmonella Senftenberg W775</b>					
Entnahme	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
Nullprobe	$1,5 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$	$9,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$5,8 \times 10^5$
50 °C	$9,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^4$
60 °C	$9,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$
70 °C	n.n.	n.n.	n.n.	$9,3 \times 10^0$	n.n.
71,76 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
71,66 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<b>Enterococcus faecalis</b>					
Entnahme	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
Nullprobe	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$9,3 \times 10^8$
50 °C	$1,5 \times 10^9$	$3,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^8$
60 °C	$1,5 \times 10^9$	$2,1 \times 10^7$	$9,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
70 °C	$3,6 \times 10^0$	n.n.	n.n.	$9,2 \times 10^0$	$9,2 \times 10^0$
71,76 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
71,66 °C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

## Danksagung

Abschliessend möchte ich mich noch recht herzlich bei allen, die mich bei der Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben, bedanken:

- Herrn Prof. Dr. R. Böhm für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung des schriftlichen Teils.
- Herrn Prof. Dr. G. Schlenker für die Übernahme dieser Arbeit zur Vorlage beim Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.
- Herrn Dr. W. Philipp für die fachliche Betreuung und die nette verständnisvolle Art, mit der er mir ständig zur Verfügung stand.
- Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Petra Veith und Frau Dr. Birgit Hunsinger, die einem jederzeit geduldig und hilfsbereit zur Verfügung standen.
- Herrn Dr. Th. Weigel für die Korrekturlesungen.
- Herrn Dr. M. Drca, der mir während der Arbeit am Institut ein Freund geworden ist und mich auch in der Endphase meiner Dissertation mit Korrekturlesen tatkräftig unterstützt hat.

Zum Schluß möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein erfolgreiches Tiermedizinstudium ermöglicht haben und bei meinem lieben Ehemann, der mich bei diversen Computerproblemen tatkräftig unterstützt hat und so manches Mal viel Geduld beweisen musste.

### **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.  
Ich versichere, dass ich ausschliesslich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Sachsenheim, den 24. 06. 2008

Katja Ade-Kappelmann