

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Untersuchungen zur Seuchen- und Phytohygiene
in Anaerobanlagen
(Halb- bzw. großtechnische Anlagen)**

von

Andrea Knie, Renate Haumacher, W. Philipp,
W. Martens, R. Böhm

Universität Hohenheim
Institut für Tierhygiene

Förderkennzeichen: PUGU 98009

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit
Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

August 2001

Forschungsberichtsblatt

Zum Forschungsvorhaben

„Untersuchungen zur Seuchen- und Phytohygiene in Anaerobanlagen

PUGU 98009

1. Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse

Es sollte untersucht werden, inwieweit das phytopathogen bedeuende Tabak-Mosaik-Virus und *P. brassicae* sowie Tomatensamen als auch die seuchenhygienisch relevanten *S. senftenberg*, *E. coli*, Fäkalstreptokokken, Parvo-Viren, *C. perfringens* und *Campylobacter jejuni* durch die anaerobe alkalische Faulung (Biogasanlage) mit und ohne Vorerhitzung bei Verwendung unterschiedlicher Substratkombinationen (Rindergülle:Speisereste 3:1; Rindergülle:Speisereste:Bioabfälle 2:1:1; Rindergülle:Bioabfälle 1:1) inaktiviert werden, wobei speziell zu prüfen war ob sich die bisher der direkten Prozessprüfung von Kompostierungsanlagen eingesetzten Verfahren auch für die Überprüfung von Anaerobanlagen eignen.

1.1 Phytohygiene

Die Bedenken hinsichtlich des Einsatzes des phytopathogenen Testorganismus Tabak-Mosaik-Virus (TMV) zur Verwendung als aussagekräftiger Prüforganismus zur phytohygienischen Überwachung von Biogasanlagen in Prüfkörpern wie sie bei der Kompostierung üblich sind, konnten durch die vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeräumt werden.

Mesophile Faulung

In der mesophilen Faulung (33 °C) zeigte das TMV-Virus in den eingesetzten Prüfkörpern keine Abnahme der Infektiosität im Biotest bei einer Verweildauer der Einlegeproben von 7, 14 und 21 Tagen. Diese Ergebnisse wurden durch molekularbiologische Nachweismethoden unter Verwendung der LightCycler PCR bestätigt.

Thermophile Faulung

In der thermophilen Faulung (55 °C) lagen bei den gewählten Expositionstechniken und den Prüfungsmodalitäten die ermittelten Werte für die Anzahl der Läsionen nach einem 21-tägigen Aufenthalt der Proben in der Biogasanlage ebenfalls über dem Grenzwert der Bioabfallverordnung (BioAbfV) von 8 Läsionen. Die unterschiedlichen Substratkombinationen scheinen dabei keinen meßbaren Einfluss auf das Überlebensverhalten des TMV-Virus auszuüben.

Pasteurisierung

Wurde das Gärsubstrat einer einstündigen Pasteurisierung bei 70 °C ausgesetzt konnte bei den untersuchten Prüf- und Expositionstechniken ebenfalls keine Abnahme der Infektiosität von TMV festgestellt werden. Auch die Verwendung unterschiedlicher Blattmengen (1 g; 2g; 10 g) bei Einsatz verschiedener „Probenkeimträger“ (Polycarbonathülsen bzw. Dialysierschläuche) hatte keinen Einfluß auf die Inaktivierung des Virus. Auch die Pasteurisierung von zuvor dreiwöchig ausgefaultem Gärsubstrat erbrachte keine Abnahme der Infektiosität des TMV-Virus. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen von Proben aus Praxisanlagen bestätigt.

Die einstündige Pasteurisierung bei Temperaturen von 90 °C führte allerdings zur vollständigen Inaktivierung des TMV-Virus.

Tomatensamen und der pilzliche phytopathogene Erreger *Plasmodiophora brassicae* konnten dagegen sowohl bei einstündiger Pasteurisierung bei 70 °C und während einer dreiwöchigen Faulung unter mesophilen und thermophilen Bedingungen vollständig inaktiviert werden.

1.2 Seuchenhygiene

Mesophile Faulung

In der mesophilen Faulung wurden die untersuchten Keime unter Verwendung von speziellen Prüfkörpern zum Einbringen in den Faulreaktor, die sich zwar nicht in der Herstellung der Prüfkeimsituation wohl aber in der Konstruktion der Prüfkörper von den bei der Kompostierung vorgegebenen unterscheiden, innerhalb von 24 Stunden Aufenthaltszeit im anaeroben alkalischen Milieu in der Regel um eine Zehnerpotenz reduziert. Bei 7 Tagen

Aufenthaltszeit erfuhr *S. senftenberg* eine Reduktion um 3, bei 21 Tagen um 7 Zehnerpotenzen.

E. coli und Fäkalstreptokokken zeigten ein entsprechendes Verhalten in ihrer Absterberate. Nach 7 Tagen Aufenthaltszeit im Anaerobreaktor war keine wesentliche Reduktion der Anzahl dieser Keime zu ermitteln. Erst nach 21 Tagen konnten bei Fäkalstreptokokken Reduktionen von 3-5 Zehnerpotenzen festgestellt werden während *E. coli* nach dieser Zeitspanne nicht mehr nachzuweisen waren.

Clostridium perfringens in einem Gemisch von Sporen und vegetativen Zellen wurden innerhalb der Zeitspanne von 21 Tagen im mesophilen anaeroben Faulmilieu um 3, *Campylobacter jejuni* um 4 Zehnerpotenzen reduziert bei Ausgangskeimzahlen zwischen 10^6 bis 10^7 KBE/g Substrat. In den „Nullproben“ (Kontrollproben) konnte mit Ausnahme von *Campylobacter jejuni* (Reduktion um 4 Zehnerpotenzen) keine Veränderung bzw. Reduktion in der Anzahl der untersuchten Keime festgestellt werden.

Bovines Parvo-Virus erfuhr bei mesophiler Vergärung eine Reduktion um ca. 2 Zehnerpotenzen.

Thermophile Faulung

In der thermophilen Faulung waren *Salmonella senftenberg*, *E. coli* und *Campylobacter jejuni* nach einer Zeitspanne von 24 Stunden bei Ausgangskeimwerten zwischen 10^6 bis 10^7 KBE/g Substrat nicht mehr nachweisbar. Die Anzahl an *Streptococcus faecium* reduzierte sich innerhalb 24 Stunden um ca. 3 Zehnerpotenzen, nach 7 Tagen Faulzeit waren sie nicht mehr nachweisbar bei einem Ausgangskeimgehalt von 10^7 KBE/g Substrat.

Clostridium perfringens im Gemisch von Sporen und vegetativen Zellen wurden bei einem Ausgangskeimgehalt von 10^7 KBE/g Substrat innerhalb 24 Stunden ebenfalls um 3 Zehnerpotenzen wahrscheinlich auf den schon vorhandenen Sporenanteil reduziert. Eine 7- bzw.- 21 tägige Faulzeit erbrachte keine weitere Reduktion in der Anzahl dieser sporenbildenden Bakterien. Bovines Parvo-Virus wurde i.d.R. innerhalb 20 bzw. 24 Stunden um 2-3 Zehnerpotenzen reduziert. In den zwei überprüften großtechnischen Biogasanlagen bis zu 7 Zehnerpotenzen innerhalb einer 24 stündigen Kontaktzeit im Biogasreaktor.

Wichtig bleibt zu erwähnen, dass die wesentliche Keimzahlreduktion bei allen untersuchten Keimen innerhalb einer Aufenthaltszeit der untersuchten Erreger in den Biogasanlagen von 24 Stunden zu verzeichnen ist.

Pasteurisierung

Sowohl durch die Erhitzung vor der Faulung („Vorpasteurisierung“) als auch durch die Erhitzung nach dem Faulprozess („Nachpasteurisierung“) können *S. senftenberg*, *E. coli*, Fäkalstreptokokken und *Campylobacter jejuni* bei einstündlicher Erhitzung auf 70 °C mit Sicherheit inaktiviert werden. Wird vor der Faulung pasteurisiert, pendeln sich nach der Faulung des zuvor erhitzten Substrates hinsichtlich der Fäkalkeimflora (*E. coli* und Fäkalstreptokokken) wieder Keimzahlen zwischen 10^1 bis 10^3 KBE/g Substrat ein ohne dass es zu einer möglichen Wiederverkeimung mit pathogenen Keimen, z. B. Salmonellen kommt. Bovines Parvo-Virus konnte durch eine einstündliche Erhitzung auf 70 °C von Ausgangstitern bei 10^6 KID₅₀/ml um maximal 5 Zehnerpotenzen reduziert werden. Bei *C. perfringens* (Sporen und vegetative Zellen) konnte in Form einer Reduktion um ca. 2-3 Zehnerpotenzen eine deutliche Reduktion der vegetativen Anteile festgestellt werden. Der Anteil der Sporen blieb aber annähernd unverändert. Wurde auf 80 bzw. 90 °C eine Stunde lang erhitzt, konnte jeweils eine weitere Zehnerpotenz weniger an vegetativen Anteilen festgestellt werden. Eine sichere Inaktivierung unter Einfluß der Sporen wurde jedoch auch bei einstündlicher Erhitzung auf 90 °C nicht erreicht.

Insgesamt muß erwähnt werden, dass die entscheidenden Parameter für die mögliche Inaktivierung phyto- und seuchenhygienisch relevanter Keime in Biogasanlagen die Temperatur und die Dauer der Einwirkungszeit darstellen. Die in den Untersuchungen miterfassten prozesstechnischen Parameter wie pH-Wert, Redoxpotential, Gasproduktion und Gasqualität sowie die unterschiedlichen Substratkombinationen sind zwar wichtige Kriterien zur Beurteilung des Faulprozesses bzw. dessen erfolgreichen Verlaufes, sie geben jedoch nur begrenzt Hinweise auf das Absterbeverhalten der in den Untersuchungen berücksichtigten Bakterien, Viren und pilzlichen Erreger, wobei die zusätzlichen Inaktivierungseffekte nicht einem Parameter alleine zuzuordnen sind.

2. Welche Fortschritte ergeben sich in Wissenschaft und/oder Technik durch die Forschungsergebnisse ?

2.1 Phytohygiene

Als zunächst wichtige Erkenntnis konnte in Erfahrung gebracht werden, dass das für die Kompostierung angewandte Vorgehen zur Prüfung der Hygienisierung von phytopathogenen Keimen nicht ohne weiteres auf die anaerobe Bioabfallbehandlung (Biogasanlagen) zu übertragen ist. Als besonders problematisch stellte sich dabei heraus, dass sowohl in Labor-

als auch in Praxisanlagen die Eliminierung von TMV in dem exponierten nativen mehr oder weniger trockenem Blattmaterial im Prüfkörper weder im thermophilen Temperaturbereich bei dreiwöchiger Faulzeit mit vor- oder nachgeschalteter einständlicher Erhitzung bei 70 °C zu erreichen ist. Zur vollständigen Inaktivierung müssen dabei Temperaturen von 90 °C eine Stunde lang einwirken. Bei Tomatensamen und dem pilzlichen phytopathogenen Erreger *Plasmodiophora brassicae* dagegen traten dabei keine Probleme bei der Inaktivierung unter mesophilen und thermophilen Bedingungen bei allen gewählten Expositionstechniken auf.

Ein möglicher Ansatzpunkt für die unzureichende Eliminierung bzw. Inaktivierung von TMV könnte in der verwendeten Keimträgertechnik liegen. Aufgrund der Konstruktionsweise gewährleisteten diese einen zu geringen Kontakt des mit TMV beladenen Blattmaterials mit dem sie umgebenden Gärrestes. Hinzu kam, dass die angewandten Keimträger in den Praxisanlagen meist über ein Metallrohr in die Biogasanlagen eingelassen wurden. Obwohl diese Rohre auch mit einer Anzahl von Löchern perforiert sind, kam wahrscheinlich auch hier noch eine zusätzliche Abschirmung der Proben hinzu. Die Verwendung grobmaschiger Netze birgt die Gefahr in sich, das Probenmaterial während der Vergärung zu verlieren. Die Benutzung von Probenbeuteln, zum Beispiel aus Leinen oder Stoff aus Miederware zeigte, dass die verwendeten Tabakblätter, selbst nach dreiwöchigem Aufenthalt im Gärbehälter, im grünen Zustand entnommen werden konnten.

Zu den grundsätzlichen Fragen der Struktur des Blattmaterials (unzerstörte Blattstruktur oder homogenisiertes mit TMV-Virus infiziertes Blattmaterial) und des Probenumfangs sowie der Eignung von Prüfkörpern zur Einbringung phytopathogener Testorganismen in Anaerobreaktoren wurden Erkenntnisse in der Richtung gewonnen, als dass unbedingt eine Weiterentwicklung von Nachweisverfahren des „Leitorganismus“ Tabak-Mosaik-Virus (TMV-Virus) erfolgen und dessen grundsätzliche Eignung als „Prüforganismus“ von Biogasanlagen unter epidemiologischen Gesichtspunkten neu überdacht werden sollte.

TMV-Virus wurde unabhängig von epidemiologischen Überlegungen aufgrund seiner hohen Thermoresistenz als viraler Prüforganismus ausgewählt. Seine epidemiologische oder wirtschaftliche Bedeutung ist allerdings im Vergleich zu anderen Pflanzenviren vermutlich eher von geringerer Relevanz. Falls dies für andere Mosaikviren der Pflanzen auch zutrifft, müssen neue Überlegungen zur Auswahl eines alternativen Prüforganismus angestellt werden. Deshalb sollte hinsichtlich der Überprüfung der phytohygienischen Wirksamkeit von Biogasanlagen auch die Verwendung anderer Viren als Prüforganismen untersucht werden. Unter dem Aspekt der geringeren epidemiologischen und wirtschaftlichen Bedeutung des TMV-Virus als bisher angenommen bzw. in Fachkreisen diskutiert, muss die Auswahl und Überprüfung von relevanteren phytopathogenen „Prüforganismen“ erfolgen, bevor durch gesetzliche Regelungen auf EU-Ebene Temperatur-/Zeitkombinationen gefordert werden, die

für den überprüften Prozess unrealistisch sind und den Energieeinsatz unverhältnismäßig erhöhen, nur um das TMV-Virus vollständig zu inaktivieren.

Ein alternativer viraler Prüforganismus ist zunächst im Tabak-Rattle-Virus (TRV-Virus) zu sehen, für welches im Nachweisverfahren im Biotest, vergleichbar mit TMV, Lokalläsionen an Tabakpflanzen als Indikator für eventuell erhaltene Aktivität ausgezählt werden können. Neben viralen könnten auch bakterielle Phytopathogene in eine Überprüfung aufgenommen werden, z. B. das Bakterium *Erwinia amylovora*, der hochpathogene Erreger des Feuerbrandes des Kernobstes. In der Kompostierung wird dieser bakterielle Erreger schon bei Temperaturen im Mesophilbereich abgetötet. Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit bzw. Absterberate in Biogasanlagen stehen noch aus.

2.2 Seuchenhygiene

Im mesophilen Temperaturbereich können bei Salmonellen und Campylobacter bei einer Expositionszeit von 7 – 21 Tagen zwar Eliminationsraten von 6-7 Zehnerpotenzen erreicht werden, da es sich bei großtechnischen Biogasanlagen aber in der Regel um quasikontinuierliche Anlagen handelt mit einem kontinuierlichen Durchfluss von Anaerobmaterial bei einer garantierten Aufenthaltszeit von < 24 Stunden, ist die Eliminierung von Salmonellen nicht gewährleistet. Dies kann nur durch eine der Faulung vor- oder nachgeschalteten Pasteurisierung des Materials (70 °C/1h) erreicht werden oder bei einer garantierten Aufenthaltszeit aller Substratpartikel in thermophilen Biogasanlagen bei Mindesttemperaturwerten > 53 °C von mindestens 20 Stunden.

Weiterhin konnte in Erfahrung gebracht werden, dass mit den angewandten „Prüfkörpern“ vergleichbare Ergebnisse mit solchen Untersuchungen erzielt wurden, bei denen das Substrat direkt mit Keimen beimpft wurde. Damit steht eine „Überprüfungstechnik“ für Biogasanlagen in der Praxis zur Verfügung, um die in der BioAbfV geforderte „direkte Prozessprüfung“ hinsichtlich der „Seuchenhygiene“ durchführen zu können. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass hierbei mit einem „statischen Modell“ ein mehr oder weniger kontinuierlicher Prozess beprobt wird. Der Vorteil liegt allerdings in der exakten Angabe der Expositionszeit der zu untersuchenden Keimflora.

Zum Verhalten von anaeroben Bakterien mit toxigenem Potential bzw. mit pathogenen Eigenschaften in Anaerobanlagen konnte erstmalig das Verhalten von *Clostridium perfringens* (Sporen und vegetative Zellen) untersucht werden. Sowohl bei alleiniger thermophiler Faulung, allerdings nur in geringem Ausmaß, jedoch besonders bei einer

Erhitzung des Substrates auf 90 °C/1h konnte eine Reduktion von *C. perfringens* festgestellt werden. Eine vollständige Inaktivierung ist jedoch wegen dem Vorhandensein oder der Neubildung von Sporen bei diesen Temperaturen nicht zu erreichen. Die Frage der vollständigen Inaktivierung von *C. perfringens* stellt sich insofern, nachdem die von der Generaldirektion Umwelt ENV.E.3 im Oktober 2000 die Anforderung vorgeschlagen wurde, dass in einem Gramm Kompost bzw. Gärrückstand *Clostridium perfringens* nicht nachweisbar sein soll. Im Zusammenhang der zukünftigen Neuregelung der tierkörperbeseitigungsrechtlichen Vorgaben, wie sie die Europäische Kommission im Oktober 2000 dem Europäischen Parlament und dem Rat vorgeschlagen hat, sind nach entsprechender Vorbehandlung Rohmaterialien tierischer Herkunft (Tierkörper, Tierkörperteile und Erzeugnisse) zur Verwertung u.a. auch in Biogasanlagen zugelassen. Unter diesen zukünftigen Bedingungen, die aber eine erhebliche Erweiterung des gesetzlichen Begriffes „Bioabfall“ nach sich ziehen würden, was derzeit wegen der tierkörperbeseitigungsrechtlichen Vorgaben in Deutschland nicht möglich ist, erfährt *Clostridium perfringens* als „Leitorganismus“ einen anderen Stellenwert. Zuvor muß jedoch in breit angelegten Untersuchungen seine Eignung als „Leit- bzw. Indikatororganismus“ unter den in der Praxis vorhandenen verfahrenstechnischen und substratspezifischen Bedingungen überprüft werden.

3. Welche Empfehlung ergibt sich aus dem Forschungsergebnis für die Praxis ?

3.1 Phytohygiene

Als Empfehlung für die Praxis ist aufgrund der vorliegenden Untersuchungen, besonders hinsichtlich des Überlebens von TMV-Virus in Anaerobanlagen die Überprüfung von Praxisanlagen vorübergehend in der Weise durchzuführen, als dass zunächst die Verwendung von TMV-Virus ausgesetzt werden sollte. Nach unserer bisherigen Einschätzung spricht nichts dagegen, Gärreste, die die Prüfung zur "Seuchenhygiene" bestanden haben und wenn *Plasmodiophora brassicae* und Tomatensamen im Anaerobprozess abgetötet wurden, auf landwirtschaftliche Nutzflächen auszubringen. Dies vor allem vor dem Hintergrund der vielen kleinen landwirtschaftlichen Biogasanlagen (Kofermentationsanlagen), die neben ihrer eigenen Gülle Bioabfälle vergären und die Gärreste auf eigenen Flächen, ohne sie in Verkehr zu bringen, verwerten.

Bei großen kommunalen Biogasanlagen könnte man nach momentanem Kenntnisstand Abhilfe in der jetzigen Situation dadurch schaffen, indem man der Anaerobbehandlung eine

Kompostierung nach den Vorgaben der BioAbfV nachschaltet. Diese dem anaeroben Prozess nachgeschaltete aerobe Stufe ist bei Großanlagen ökonomisch vertretbar, da die Produkte aus den Großanlagen zwangsläufig in den Verkehr gelangen müssen und daher großflächig verteilt werden. Bei landwirtschaftlichen Kofermentationsanlagen erfolgt ein interner Kreislauf und durch die Mitverwertung von Gülle und anderen biogenen Substraten ein zusätzlicher Verdünnungseffekt. Daher kann eine landwirtschaftliche Biogasanlage, die neben Gülle Bioabfälle verwertet und im thermophilen Bereich gefahren wird bzw. die Bioabfälle vor der Vergärung auf 70 °C eine Stunde lang erhitzt, als nicht kritisch hinsichtlich der Problematik des TMV betrachtet werden.

Offene Fragen zu den Überprüfungsmodalitäten (Einbringungstechnik, weiterer alternativer phytopathogener Prüforganismen) werden in einem angelaufenen Forschungsprojekt des Bundesumweltministeriums abgeklärt. Bis zum Vorliegen weiterer Erkenntnisse empfiehlt es sich, diese Vorschläge in der Praxis zu berücksichtigen.

3.2 Seuchenhygiene

Aufgrund der Ergebnisse konnten aus seuchenhygienischer Sicht belastbare Daten hinsichtlich der notwendigen Betriebsbedingungen für Biogasanlagen (Temperaturhöhe/-Zeiteinwirkung; thermophile Betriebsweise bei garantierter Mindestaufenthaltszeit; Erhitzung (70 °C/1h vor oder nach der Faulung) erarbeitet werden, die ein seuchenhygienisch unbedenkliches Endprodukt erwarten lassen. Es wird geraten, sich strikt an diese Vorgaben zu halten und die Anlagen in der Praxis entsprechend zu überprüfen.

Zur direkten Prozessprüfung entsprechend den Vorgaben der BioAbfV sind Salmonellen (*S. senftenberg*) geeignete bakterielle „Leitkeime“ um die Effizienz und damit die seuchenhygienische Wirksamkeit von Anaerobverfahren hinsichtlich des Abtötens von relevanten Infektionserregern beurteilen zu können.

Bei möglicher zukünftiger Verwertung seuchenhygienisch brisanter Stoffe in dafür zugelassenen Biogasanlagen, z. B. tierkörperbeseitigungspflichtiger Stoffe aus Schlachthanlagen, verendete Tierkörper oder Tierkörperteile, müssen weitere Erhebungen zu verwendbaren Indikator- bzw. Prüfkeimen angestellt werden, die Erhebungen und Untersuchungen mit dem bovinen Parvo-Virus deuten auf eine vernünftige Praxistauglichkeit hin, Sorenbildner sind nicht geeignet die Wirkung biotechnologischer Prozesse im mesophilen oder thermophilen Bereich zu erfassen, da sie eine wesentlich höhere Thermoresistenz besitzen.

Teil 1:

**Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikatororganismen
(Phytohygiene) in anaeroben Kofermentationsanlagen**

von

Dipl. Biol. H. Lorenz

Dr. K.-H. Hellwald

Prof. Dr. H. Buchenauer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Tabak-Mosaik-Virus (TMV)	3
1.2	<i>Plasmodiophora brassicae</i> (Erreger der Kohlhérnie)	3
1.3	Tomatensamen (<i>Lycopersicon lycopersicum</i> St. Pierre)	4
2	Material und Methoden	6
2.1	Tabak-Mosaik-Virus (TMV)	6
2.2	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	7
2.3	Tomatensamen	8
2.4	Keimträger	9
2.5	Anaerobanlage im Labormaßstab	10
2.6	Praxisanlage I	15
2.7	Praxisanlage II	16
2.8	Pasteurierungsanlage im Labormaßstab	18
2.9	Wasserbad im Labormaßstab	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Tabak-Mosaik-Virus (TMV)	22
3.1.1	Anaerobe Vergärung	22
3.1.2	Pasteurisierung	28
3.1.3	Kombination anaerobe Vergärung – Pasteurisierung	31
3.1.4	Thermische Inaktivierung	33
3.1.5	Kontrollversuch	36
3.2	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	37
3.3	Tomatensamen	40
3.4	Anaerobanlage im Labormaßstab (Meßparameter)	47

4	Diskussion	49
4.1	Tabak-Mosaik-Virus (TMV)	49
4.2	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	61
4.3	Tomatensamen	64
4.4	Anaerobanlage im Labormaßstab	67
5	Zusammenfassung	70
5.1	Tabak-Mosaik-Virus (TMV)	70
5.2	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	72
5.3	Tomatensamen	73
6	Literatur	74
7	Anlagen	76
	52. Deutsche Pflanzenschutztagung: Beitrag (Nr. 676)	76
	52. Deutsche Pflanzenschutztagung: Poster	

1 Einleitung

Biologische Abfälle können unterschiedliche Pathogene enthalten. So können potentiell alle im europäischen Raum vorkommenden pflanzenpathogenen Erreger mit den jeweiligen Kulturen im Material sein, welches einer Wiederverwertung zugeführt werden soll. Mögliche Quellen für eine Kontamination von Abfällen mit phytopathogenen Schaderregern können zum Beispiel Fraktionen aus Gras- und Laubabfällen, Gartenabfälle, Häckselgut aus Baum- und Strauchschnitt, Rinde, Stroh oder Küchenabfälle sein. Die Erreger von Pflanzenkrankheiten können durch eine biotechnologische Aufbereitung der Abfälle (Kompostierung oder Vergärung) eliminiert bzw. inaktiviert werden.

Seit dem Inkrafttreten der Bioabfallverordnung (BIOABFV 1998) sind die stoffbezogenen Anforderungen an Bioabfälle und deren Verwertung im geregelten Nachweisverfahren definiert. Dabei wurde das Prüfsystem zur Feststellung der phytohygienischen Unbedenklichkeit bei der aeroben Abfallbehandlung (Kompostierung) analog für die anaerobe Behandlung (Vergärung) übernommen. Zu den Inaktivierungsmechanismen von Erregern mit phytohygienischer Bedeutung in Anaerobanlagen war bisher jedoch keine grundlegende Datenbasis vorhanden. Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es deshalb festzustellen, ob die im Anhang 2 der BIOABFV (1998) aufgeführten Bedingungen zur phytohygienischen Unbedenklichkeit von Gärprodukten aus Anaerobanlagen ausreichend sind, diesen Komplex fachlich abzudecken.

Um zur Etablierung eines praktikablen und standardisierten Prüfsystem für Anaerobanlagen beizutragen, wurde untersucht, ob die für die Kompostierung verwendete Methodik zur Prüfung der Hygienisierung von phytopathogenen Keimen auch auf die anaerobe Abfallbehandlung in Vergärungsanlagen übertragbar ist. Die in der BIOABFV (1998) genannten Techniken und Verfahren, welche sich für Untersuchungen zur Hygienisierung unter aeroben Bedingungen bewährt haben, wurden ohne vorangegangene systematische Untersuchungen zunächst auch für Anaerobanlagen festgelegt. Vor diesem Hintergrund mußte auch die Frage geklärt werden, ob die gleichen Prüfkeime, wie sie für die Überwachung von Kompostierungsanlagen benutzt werden, für Anaerobanlagen, unter Berücksichtigung ihrer epidemiologischen Relevanz, ebenfalls sinnvoll und geeignet sind.

Die anaerobe Vergärung von Abfällen als Alternative zur Kompostierung hat erst in den letzten Jahren einen großen Aufschwung erlebt. So waren im Jahr 1993 erst 3, 1996 bereits 19 und 1999 über 30 solcher Anlagen, welche ausschließlich Abfälle vergären, in Betrieb (HOPPENHEIDT et al. 1997, WEILAND 1999). Hinzu kommen zum Beispiel für das Jahr 1999 noch über 450 Biogasanlagen in der Landwirtschaft, welche zumeist als Kofermentationsanlagen ebenfalls bei der Abfallverwertung eine Rolle spielen. Wurde im

Jahr 1996 bundesweit ein Abfalldurchsatz von etwa 350.000 t in den Vergärungsanlagen erreicht (HOPPENHEIDT et al. 1997), so gingen Schätzungen für das Jahr 2000 davon aus, daß etwa 8 bis 10 Millionen Tonnen allein an Bioabfällen verarbeitet werden (PHILIPP 1999).

Für die in geschlossenen Behältern stattfindende Bioabfallverwertung gibt es hinsichtlich der Temperaturführung zwei Alternativen. Während einer sogenannten mesophilen Prozeßführung findet die Vergärung bei etwa 37 °C statt, wobei die BIOABFV (1998) eine zusätzliche Vor- oder Nachbehandlung für 60 Minuten bei 70 °C (Pasteurisierung) bzw. alternativ eine Nachbehandlung durch aerobe Rotte fordert, um eine Hygienisierung des Bioabfalls zu gewährleisten. Beim thermophilen Prozeß wird als Richtwert eine Behandlung bei einer Temperatur von ≥ 55 °C für mindestens 24 Stunden aufgeführt. Die hydraulische Gesamtverweildauer der Abfallmatrix in der Anlage beträgt dabei mindestens 20 Tage.

Zur Überprüfung der thermischen Inaktivierung der Prüforganismen wurden Versuche in drei verschiedenen Anaerobanlagen (Modell im Labormaßstab und zwei gewerbliche Großanlagen unter Praxisbedingungen) und in einer Pasteurierungsanlage (Labormaßstab) durchgeführt. Zur Verifizierung der in den Anaerobanlagen gewonnenen Erkenntnisse wurden weitere Untersuchungen zur Bestimmung des thermischen Inaktivierungspunktes der Prüforganismen bei feuchter Hitze, unter Verwendung eines Wasserbades (Labormaßstab), vorgenommen.

Die durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis des Wirkungsgrades der Hygienisierung durch das jeweilige Behandlungsverfahren passen in das Konzept der in der BIOABFV (1998) genannten "direkten Prozeßführung". Kleine Mengen der verwendeten Abfallmatrix wurden mit hohen Gehalten an ausgewählten thermoresistenten Testorganismen versetzt und mit Hilfe von Keimträgern durch den Verfahrensprozeß geschleust. Nach einer bestimmten Verweilzeit in der untersuchten Anlage bzw. nach einer festgelegten Einwirkzeit des umgebenden Milieus wurde im Biotestverfahren überprüft, ob die Einlegeproben hygienisiert wurden. Die eingebrachten Prüforganismen also in einem solchen Maß inaktiviert worden waren, daß das Auftreten von Pflanzenkrankheiten, von Pflanzenschädigungen und von Unkräutern verhütet wurde.

Hinsichtlich des jeweiligen Hygienisierungsprozesses in den untersuchten Anlagen wurden Prozeßparameter wie Substratzusammensetzung, Temperaturhöhe, Dauer der Temperatureinwirkung und die Dauer einer zusätzlichen Erhitzung (Pasteurisierung) besonders berücksichtigt.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Erarbeitung von Daten zur Beschreibung von Bedingungen, bei denen durch die Prozeßeinwirkung der anaeroben Vergärung von biologischen Abfällen die im Anhang 2 der BIOABFV (1998) genannten Testkeime sicher

eliminiert werden können. Für den Bereich der Phytohygiene sind dies die Leiterreger oder Indikatororganismen Tabak-Mosaik-Virus (TMV), *Plasmodiophora brassicae* (Erreger der Kohlhérnie) und Tomatensamen. Trotz einer großen Zahl von potentiellen Schaderregern mußte sich die Auswahl aus versuchstechnischen Gründen auf wenige Testorganismen beschränken. Als Auswahlkriterien können neben der Zugehörigkeit zu verschiedenen Erregergruppen, die Verfügbarkeit des Versuchsmaterials in größeren Mengen sowie eine relativ schnelle und sichere Überprüfbarkeit der Lebensfähigkeit bzw. Infektiosität der Prüforganismen in Biotests genannt werden.

1.1 Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

TMV zählt zu den Tobamoviren und ist eine weitverbreitete Viruskrankheit im Tabak- und Paprikaanbau mit einem ausgedehnten Wirtspflanzenkreis innerhalb der Familie der *Solanaceae* (HOPPENHEIDT et al. 1997).

Die wirtschaftliche Relevanz dieser Pflanzenkrankheit ist jedoch im Vergleich zu anderen Viren relativ gering. Das Virus wurde als viraler Leiterreger vor allem aufgrund seiner hohen Thermoresistenz ausgewählt, welche allgemein in der Literatur beschrieben wird. Bei HERRMANN et al. (1994) finden sich neben eigenen Ergebnissen zur Inaktivierung von TMV bei der Bioabfallkompostierung auch eine Auswahl von publizierten Versuchen zur thermischen Inaktivierung von TMV. Das Virus gehört zu den stabilsten Pflanzenviren, welches in getrockneten Tabakblättern Temperaturen von 120 °C bis 150 °C überstehen kann (BODE 1958, in MENKE & GROSSMANN 1971).

Neben einer Anzahl von Publikationen zu den Inaktivierungsmechanismen von TMV während der aeroben Kompostierung (z. B. HERRMANN et al. 1994, HOPPENHEIDT et al. 1997) gibt es nur vereinzelt Veröffentlichungen zum Komplex Phytopathogene und anaerobe Bioabfallverwertung. Einzelne Untersuchungen zur phytohygienischen Prozeßprüfung unter Praxisbedingungen mit dem Testorganismus TMV wurden von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) für eine mesophile und für eine thermophile Anaerobanlage sowie für die Pasteurisierungsstufe einer Anaerobanlage publiziert.

1.2 *Plasmodiophora brassicae* (Erreger der Kohlhérnie)

P. brassicae ist als obligater Endoparasit bei Kohlpflanzen ein phytopathologisch bedeutsamer Erreger. In Kohlanbaugebieten ist die Pflanzenkrankheit Kohlhérnie von wirtschaftlicher Bedeutung. Der bodenbürtige Schleimpilz verursacht infolge einer Wurzelhaarinfektion Geschwulst- oder Gallenbildungen an Lateral- und Hauptwurzeln

(Hernie = Wurzelkropf), welche u.a. die Wasser- und Nährstoffaufnahme der Pflanzen behindern. *P. brassicae* bildet sehr widerstandsfähige Dauersporen (Ruhe-, Hynosporen), welche mehrere Jahren infektiös im Boden überdauern können (BRUNS et al. 1989).

Der Pilz kann den komplexen Prozeß einer aeroben Abfallbehandlung überleben und nach Ausbringung des Kompostsubstrates Wirtspflanzen erneut befallen. Diese relativ hohe Rotte- und Temperaturreistenz wird in der Literatur mehrfach, so bei BRUNS et al. (1989) und HOPPENHEIDT et al. (1997), beschrieben.

Untersuchungen zur Inaktivierung von *P. brassicae* in Gallenmaterial von Senfpflanzen liegen für die anaerobe Vergärung zum Beispiel von WIEMER & KERN (1996) und von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) vor.

1.3 Tomatensamen (*Lycopersicon lycopersicum* St. Pierre)

Die Tomatensamen der Sorte St. Pierre zeichnen sich durch eine relativ schnelle, in hohen Raten stattfindende Keimung aus. Sie besitzen eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen Temperaturen (HOPPENHEIDT et al. 1997) und wurden deshalb als geeignete Prüforganismen, stellvertretend für Unkrautsamen bzw. für austriebsfähige Pflanzenteile, ausgewählt. Tomaten können als Abfallprodukt im Bioabfall einen beträchtlichen Anteil einnehmen. Die gute Keimfähigkeit der im Abfall enthaltenden Tomatensamen kann zum Beispiel häufig in der Umgebung von Kläranlagen beobachtet werden.

Neben den Versuchen zu Tomatensamen wurden auch Untersuchungen zur Tenazität von Samen der Unkrautarten Acker-Hundskamille (*Anthemis arvensis*), Floh-Knöterich (*Polygonum persicaria*), Flughafer (*Avena fatua*), Geruchlose Kamille (*Matricaria maritima*) und Stumpfblättriger Ampfer (*Rumex obtusifolius*) durchgeführt.

Bei WIEMER & KERN (1996) ist die Aussage zu finden, daß Samen von Hirse, Tomaten und *Rumex* im anaeroben Milieu insbesondere die hydrolytischen Bedingungen nicht vertragen. Bei einem einstufigen anaeroben Vergärungsverfahren soll es innerhalb weniger Tage zunächst zu Keimverzögerungen kommen und später zum Absterben des Samens. Unter thermophilen Bedingungen soll dieser Prozeß entsprechend schneller vonstatten gehen.

MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) untersuchten die Inaktivierung von Tomatensamen in einer Anaerobanlage für eine Verweildauer von 7 Tagen unter mesophilen und für 21 Tagen unter thermophilen Bedingungen. Weiterhin gibt es Untersuchungen von CYRIS (1997, in HOPPENHEIDT et al. 1997) zur Inaktivierung von Tomatensamen bei Temperaturen von 30 °C,

45 °C, 60 °C und 70 °C nach einer Verweilzeit von 10 bis 40 Minuten in einer Pasteurierungsanlage. Angaben zur Thermoresistenz von gequollenen und trockenen Tomatensamen sowie zu Samen des Gemeinen Windenknöterichs (*Fallopia convolvulus*) im Klimaschrank sind bei HERRMANN et al. (1994) zu finden.

2 Material und Methoden

Die im folgenden beschriebene Methodik kristallisierte sich erst nach einem bestimmten Untersuchungszeitraum als Standardverfahren heraus, orientierte sich aber von vornherein an der in der BIOABFV (1998) beschriebenen Prüfmethode für die drei Testorganismen der Phytohygiene. Abweichungen hiervon, zum Beispiel beim Umfang der verwendeten Probenmengen oder bei Unterschieden in der Art der Aufarbeitung der Einlegeproben und die angewendete Methodik bei der Überprüfung von Anaerobanlagen im Rahmen der BIOABFV (1998) werden jeweils besonders vermerkt.

2.1 Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

Das Virus wurde hauptsächlich in Form von TMV infiziertem Blattmaterial, in einigen Versuchen auch zusätzlich als eine aus Pflanzenpreßsaft gewonnene TMV Suspension, in die untersuchten Anlagen eingebracht. Je Einlegeprobe wurde 1 g frisches Blattmaterial von Tabakpflanzen der Art *Nicotiana tabacum* var. Samsun verwendet. Die TMV Suspensionen wurden aus der Homogenisierung von 1 g Blattmaterial mit 40 ml Phosphatpuffer (nach Sörensen: 1/15 M; pH-Wert 7,0) gewonnen, wovon 1 ml je Einlegeprobe verwendet wurde.

Die Aufarbeitung jeder Einlegeprobe erfolgte in einem sterilisierten Mörser durch Homogenisation mit 10 ml Phosphatpuffer. Die flüssigen Extrakte dieser aufgearbeiteten Proben wurden zur weiteren Testung separiert. Die so erhaltenen Proben wurden im Biotest an Tabakpflanzen der Art *Nicotiana glutinosa* überprüft, welche bei einer TMV Infektion Lokalläsionen ausbilden. Das Unvermögen der Testpflanzen diese Lokalläsionen auszubilden, bedeutete eine Inaktivierung des Virus in der behandelten Probe. Eine Aussage über eine etwaige Destruktion des Virusmoleküls kann in einem solchen Fall jedoch nicht abgeleitet werden (HERRMANN et al. 1994). Je Blatt wurden 20 µl der Probe über die halbe (Halbblattmethodik) bzw. über die gesamte Blattspreite inokuliert. In der Regel wurde jede Probe an drei Pflanzen mit je drei Blättern inokuliert. Die verbliebene Probensubstanz wurde in jeweils zwei Reaktionsgefäßen (2 ml Tubes) bei – 20 °C eingefroren.

Als Positivkontrollen wurden verschiedene TMV Suspensionen genutzt. Als Maßstab für die Infektiosität des verwendeten TMV Materials diente der aus der Homogenisierung frischer Blätter gewonnene Pflanzenpreßsaft ("unverdünnte Suspension"). Solch eine "unverdünnte Suspension" kann jedoch bei einer Inokulation an *N. glutinosa* großflächige Nekrosen auf den Blättern sensitiver Testpflanzen verursachen. Um eine zählbare Anzahl von Läsionen zu erreichen, erwies sich eine Verdünnung dieser Suspensionen mit Phosphatpuffer auf bis zu 2 % (Suspension 2 %) als günstiger.

Eine weitere Suspension des Virus wurde aus einer Mischung von 1 g TMV infizierten Blattmaterial mit circa 15 ml Gülle durch die Homogenisation mit 10 ml Phosphatpuffer gewonnen. Diese als "Kontrolle Gülle" (KG) bezeichnete Positivkontrolle entspricht somit hinsichtlich der Qualität und Quantität einer unbehandelten Einlegeprobe in einem Volumenkeimträger (siehe Punkt 1.6).

Die Positivkontrolle wurde immer zeitgleich mit den Einlegeproben im Biotests getestet, jedoch an gesonderten Pflanzen aufgebracht, um so eine etwaige Vermischung von Probe und Kontrolle auf einem Blatt zu vermeiden.

Zur Überprüfung der Virulenz des verwendeten Virusstammes wurde in einem Kontrollversuch gereinigtes Virus getestet. Eine Stammlösung mit einer Viruskonzentration von 6 mg/ml wurde dabei jeweils mit Phosphatpuffer, mit Wasser (Bidest) und mit Outputmaterial auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt. Die Inokulation dieser Verdünnungen erfolgte zum einen sofort (Zeitpunkt 0) und zum anderen nach einer 24stündigen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur (Zeitpunkt 24 h).

Als Negativkontrollen dienten zum einen der zur Aufarbeitung der Proben verwendete Phosphatpuffer (keine weitere Behandlung) und zum anderen zusätzlich eingebrachte Einlegeproben mit gesundem Blattmaterial von *N. tabacum* var. Samsun (Blindproben). Zur Überprüfung, ob sich das Virus im Gärsubstrat der Anlage nachweisen läßt, wurden Kontrollproben direkt aus dem Substrat entnommen bzw. Kontrollen aus der Outputmatrix gezogen. Die Überprüfung im Biotest ergab fast immer ein vollständig negatives Ergebnis für diese Kontrollen, so daß im Ergebnisteil nicht jedesmal extra darauf hingewiesen wird.

2.2 *Plasmodiophora brassicae*

Es wurden je Keimträger 5 g zerkleinertes Gallenmaterial von an Kohlhernie erkrankten Sarepta-Senfpflanzen (*Brassica juncea*) der Sorte Vittasso verwendet. Jede behandelte Probe mit *P. brassicae* Gallenmaterial wurde im Biotest mit "Fruhstorfer Einheitserde" gemischt und gleichmäßig auf fünf Töpfe (je 500 ml Volumen) aufgeteilt. In jeden Topf wurden drei bis vier junge Sarepta-Senfpflanzen pikiert oder eingesät.

Für die Positivkontrolle wurde dasselbe Gallenmaterial wie für die Untersuchungen verwendet. Je 1 g des Gallenmaterials wurde in fünf Töpfe eingebracht. Als Negativkontrolle wurde die verwendete Erde im selben Umfang, jedoch ohne Gallenmaterial, ausgelegt.

Zur Ermittlung des Infektionspotentials bei abnehmender Inokulumdichte des verwendeten Pilzes wurde ein Kontrollversuch mit unbehandeltem Gallenmaterial durchgeführt. Jeweils 500 ml Erde wurden mit Wurzelgallen in Mengen von 1 g, 0,6 g, 0,4 g, 0,2 g, 0,1 g, 0,05 g und 0,01 g vermischt. Der Versuch wurde mit jeweils einer Wiederholung durchgeführt. Außerdem wurde die Infektiosität von *P. brassicae* bei Verwendung von unterschiedlichen Qualitäten der Wurzelgallen (frisch – gefroren, zerkleinert – unzerkleinert) im Biotest überprüft.

Die Wuchszeit der Pflanzen im Biotest betrug zwischen vier bis neun Wochen und lag im Durchschnitt bei etwa sechs Wochen. Innerhalb eines solchen Zeitraumes wird eine etwaige Gallenbildung an den Testpflanzen infolge einer Bodeninfektion des Pilzes deutlich ausgeprägt. Die Wurzeln der geernteten Pflanzen wurden ausgewaschen. Die Bonitur der Wurzelgallen bei positiven Befund orientierte sich an der Boniturskala von BUCZACKI et al. (1975, in BIOABFV 1998), ohne allerdings die Stärke der Gallenbildung in Befallsklassen zu unterteilen. Dies bedeutet, daß alle Testpflanzen mit positiven Befund den Befallsindex 3 und ohne Befund den Index 0 erhielten. Der Befallsindex einer Probe ergibt sich somit aus folgender Formel:

$$\text{Befallsindex} = \frac{\Sigma (\text{Anzahl befallener Pflanzen} \times 3)}{\text{Gesamtzahl Pflanzen}}$$

2.3 Tomatensamen

Je Keimträger wurden etwa 0,55 g Tomatensamen (Walz GmbH, Stuttgart), daß entspricht etwas mehr als 200 Samenkörner, eingebracht. Nach der Behandlung wurden je Keimträger 200 Samen entnommen und zu je 50 Korn auf vier, mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen aufgeteilt. Die Feuchtigkeit in den Petrischalen wurde konstant gehalten.

Als Kontrolle wurden 200 unbehandelte Samenkörner verwendet und ohne weitere Behandlung ebenso ausgelegt. Die Auszählung der gekeimten Tomatensamen fand über mehrere Wochen statt. Die Samen der Kontrollen waren in der Regel nach etwa sieben Tagen nahezu vollständig gekeimt.

Darüber hinaus wurden Untersuchungen bei Simulation von feuchter Hitze mit Samen von fünf Unkrautarten (Herbiseed, Berkshire, England) jeweils im Vergleich mit Tomatensamen

durchgeführt (siehe Punkt 2.9). Es wurden Samen der Arten Acker-Hundskamille (*Anthemis arvensis*), Floh-Knöterich (*Polygonum persicaria*), Flughafer (*Avena fatua*), Geruchlose Kamille (*Matricaria maritima*) und Stumpfblättriger Ampfer (*Rumex obtusifolius*) verwendet.

2.4 Keimträger

Als Keimträger wurden zunächst die von RAPP (1995) entwickelten Volumen- oder Diffusionskeimträger aus Polycarbonat verwendet. Diese Prüfkörper bestehen aus einem Hohlzylinder mit einem Volumen von etwa 15 ml, an dessen offenen Enden sich verschraubbare Filtrationseinheiten mit einem Durchmesser von 25 mm anbringen lassen. In diese Vorrichtungen kann man zusätzlich semipermeable Membranen aus Zellulosenitratfilter (Cellulose Nitrate Filter, Sartorius, Göttingen) und / oder aus Polycarbonat (Infiltec, Speyer) einlegen. Diese Membranen mit Porengrößen von 0,2 µm bzw. 0,01 µm gewährleisten, daß die Keimträger als "offene Systeme" fungieren. Eine Porengröße von 10 nm garantiert, daß Keime den Keimträger nicht verlassen können, gleichzeitig ist aber eine Diffusion des Außenmilieus (niedermolekulare Substanzen) in das Innere der Keimträger gewährleistet. Die als Einlegeproben verwendeten Pathogene sind somit fast direkt den chemischen und physikalischen inaktivierenden Eigenschaften des Substrates (pH-Wert, NH₃, Temperatur etc.) ausgesetzt. Verwendung fanden die Membranen aus Polycarbonat insbesondere bei der Einbringung der Proben mit TMV Suspensionen. Die Zellulosenitratfilter lösten sich unter thermophilen, anaeroben Bedingungen spätestens nach sieben Tagen auf. Bei den Einlegeproben mit TMV Blattmaterial wurde zumeist auf die Einlage zusätzlicher Membranen verzichtet, um so einen stärkeren Einfluß des Außenmilieus zu gewährleisten. Die Keimträger wurden mit den genannten Einlegematerial beschickt und zusätzlich mit Gülle als Grundsubstrat aufgefüllt.

Da die Volumenkeimträger nach RAPP (1995) nur die Einbringung begrenzter Mengen erlauben, wurde durch Verwendung von Dialyseschläuchen versucht, das Probenvolumen insbesondere an TMV Blattmaterial zu erhöhen. Entsprechend den in der BIOABFV (1998) genannten Mengen konnten 10 g TMV Blattmaterial und 100 ml Gülle je Schlauch verwendet werden. Damit konnte in etwa die zehnfache Menge an Probensubstrat gegenüber den Keimträgern aus Polycarbonat eingebracht werden. Probleme mit diesem Material gab es bei mechanischer Beanspruchung während der Pasteurisierung sowie während des Verbleibs unter anaeroben Bedingungen, da spätestens nach 21 Tagen die Dialyseschläuche (aus regenerierter Zellulose) abgebaut waren.

Zum Ende des Versuchszeitraumes wurde noch die Verwendung von verschiedenen Stoffbeuteln als Keimträger geprüft. Während Leinenbeutel (19 x 14,5 cm) nur für kürzere

Verweilzeiten in Anaerobanlagen geeignet scheinen (möglicher Abbau), haben sich Beutel aus Miederware (7 x 10,5 cm) als alternative Keimträger besser bewährt. Auf die Verwendung dieser Keimträger-Techniken wird im Ergebnisteil besonders hingewiesen.

Neben der Einbringung von Probenmaterial mittels Keimträger wurde TMV infiziertes Blattmaterial auch direkt in das Inputsubstrat von Anlagen eingegeben. Nach bestimmten Verweilzeiträumen wurde versucht, diese Einlegeproben wieder zurückzugewinnen (weitere Angaben unter den Punkten 2.5, 2.8).

2. 5 Anaerobanlage im Labormaßstab

Die für die Untersuchungen zur Verfügung stehende Anaerobanlage im Labormaßstab mit einem Reaktorvolumen (RV) von 400 l basiert auf dem bei OECHSNER (1996) beschriebenen Modell einer Laborbiogasanlage mit einem Reaktorvolumen von 16 l. Der zylinderförmige Anaerobbehälter (Abb. 1) ist mit einer isolierenden Schaumstoffschicht umgeben, in der sich die zur Beheizung der Anlage notwendigen Wasserschläuche eines externen Wasserbades (LAUDA E 200) befinden (Abb. 2). Im dem nicht unterteilten Gärbehälter sorgt ein zentrales Rührwerk für eine mechanische, relativ homogene Durchmischung des gesamten Gärsubstrates. An einem Ende der Anlage befindet sich ein Einfüllstutzen (Input) und am anderen Ende ein Überlaufstutzen (Output). Der Überlaufstutzen wird zur Aufnahme des Outputsubstrates (nicht umgesetzte Feststoffe und Abwasser) in ein Faß geführt.



Abb. 1:
Anaerobanlage (ohne Isolierung),
Inputstutzen.



Abb. 2:
Anaerobanlage (isoliert), Outputstutzen.
Rechts hinten das externe Wasserbad.

Die Oberseite der Anaerobanlage ist mit vier Öffnungen versehen (Probenstutzen), an denen jeweils ein in das Innere der Anlage führendes Metallrohr angebracht ist. In diese perforierten Rohre können die zu untersuchenden Proben fast direkt dem inneren Milieu der Anlage ausgesetzt werden. Ein direkter Zugriff zu den Proben während des gesamten Behandlungsprozesses kann somit gewährleistet werden. Weitere Öffnungen an der Anlage dienen der Abführung des gebildeten Biogases über eine Gaszähluhr (GMT, Groß-Gerau) und der Einbringung verschiedener Meßfühler.

Gemessen wurden u.a. die Temperatur im Inneren der Anlage (Meßgerät WTW pH 535, Weilheim), das Redoxpotential (Meßgerät WTW pH 91, Weilheim), der pH-Wert (Meßgerät WTW pH 530, Weilheim) und der Methangehalt (Meßgerät u.a. Siemens Ultramat 22).

Das Einkammersystem dieser Anlage stellt als Prinzip der Verfahrenstechnik einen vollständig durchmischten Durchflußreaktor dar. Das angewendete Anaerobverfahren ist ein einstufiges Naßverfahren (nach WEILAND 1999) und hat eine hohe Praxisrelevanz. Nach KERN (1999) werden etwa 60 % aller Anaerobanlagen in einem einstufigen Prozeß und etwa 83 % im Naßverfahren geführt.

Bei der einstufigen Naßvergärung finden alle Abbaureaktionen im Methanreaktor statt, während bei der zweistufigen Betriebsweise die Hydrolyse-Versäuerungsreaktion separat abläuft. Die Prozeßstabilität kann bei einer einstufigen Betriebsführung durch die Anreicherung von Versäuerungsprodukten, zum Beispiel bei Verwendung von Abfällen mit einem hohen Anteil leicht abbaubarer Komponenten, gefährdet sein (WEILAND 1999).

Bei einem einstufigen, volldurchmischten Reaktor besteht die theoretische Möglichkeit, daß das eingetragene Input-Frischmaterial nach einem kurzen Reaktordurchlauf gleich wieder ausgetragen wird. Diese Annahme sollte bei der genutzten Anlage nur von untergeordneter Bedeutung sein. Die relative Größe der Anlage sowie die Tatsache, daß das Rührwerk nicht im Dauerbetrieb war, sollten einen sofortigen Austrag der Inputmatrix als unwahrscheinlich erscheinen lassen. Das Rührwerk wurde zunächst zu jeder halben Stunde für zwei Minuten eingeschaltet. Das Ein- und Ausschalten des Rührwerkmotors wurde anhand einer programmierten Zeitschaltuhr gesteuert. Es ist davon auszugehen, daß das eingebrachte Inputmaterial wochentags mindestens über 24 Stunden (zeitlicher Abstand zwischen zwei Befüllungen) und an den Wochenenden (keine Befüllung) bis zu drei Tagen in der Anlage verblieb.

Die Befüllung der Anlage erfolgte täglich (wochentags) mit 20 l Vergärungssubstrat. Bei einem Reaktorvolumen (RV) von 400 l wird ein vollständiger Umsatz bzw. Austausch des Gärsubstrates theoretisch nach 26 Tagen erreicht. Auch bei Annahme, daß nicht das gesamte Reaktorvolumen mit Gärsubstrat aufgefüllt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß die

in der BIOABFV (1998) geforderte hydraulische Mindestverweilzeit der Abfallmatrix im Reaktor von 20 Tagen erreicht wurde.

Um einen stabilen Gärungsprozeß zu erreichen, wurde die Anlage zunächst im Monovergärungsverfahren ausschließlich mit Flüssigmist (Rindergülle) betrieben. Die Einlaufphase bis zum Erreichen eines stabilen Reaktorbetriebes betrug 28 Tage (siehe Tabelle 1) und bewegte sich damit im Rahmen der bei OECHSNER (1996) angegebenen 30 Tage.

Nach dem Erreichen einer ausreichenden Prozeßstabilität wurde die Anlage im Kofermentationsverfahren weiter betrieben. Als Grundsubstrat diente Flüssigmist (Gülle) mit einem Volumen-Anteil von 50 % bzw. 75 %. Die Kofermentate waren Speiseabfälle (Speisereste = SR) und Bioabfälle (Bio) bzw. eine Mischung von jeweils fünf Litern beider Substrate. Ein Mischungsverhältnis von etwa 70 % Rinder- oder Schweinegülle zu etwa 30 % landwirtschaftlicher Abfälle ist typisch für Kofermentationsanlagen zur Biogasgewinnung in der Landwirtschaft (WEILAND 1999).

Die Kofermentation mit Flüssigmist gewährleistet den Betrieb der Anaerobanlage im Naßverfahren. Der durchschnittliche Anteil organischer Trockensubstanz beträgt bei Rinderflüssigmist 6 - 9 % (pH-Wert 7,5 – 8,0). Die Abfallmaische weist daher bei der Kofermentation eine Trockensubstanz von etwa 15 % auf. Dagegen werden bei der Trockenvergärung die meisten Abfallstoffe (etwa 20 - 40 % TS) mit ihrem Ausgangswassergehalt verarbeitet (WEILAND 1999).

An Speiseabfällen fallen alleine in Westdeutschland jährlich etwa 0,8 Millionen Tonnen an (OECHSNER 1996). Diese müssen bei der Aufarbeitung in Biogasanlagen zunächst eine Pasteurisierungsstufe durchlaufen (1 h bei 70 °C). Die zum Betrieb der Anaerobanlage verwendeten Speiseabfälle (SR) waren, je nach Anfall in der Abfallküche der Mensa der Universität Hohenheim, relativ inhomogen. Der Durchschnitt organischer Trockensubstanz liegt bei etwa 17 - 25 % (pH-Wert 3,5 – 4,0). Aufgrund des niedrigen pH-Wertes und des hohen Anteils an hydrolytisch leicht abbaubaren Verbindungen (Kohlenhydrate, Fette, Proteine etc.) besteht bei der Verwendung von Speiseabfällen, wie bereits erwähnt, die Gefahr von Prozeßinstabilitäten aufgrund der Anreicherung von Versäuerungsprodukten. Um den Prozeß der Kofermentation nicht zu überlasten, sollte der Anteil der Speiseabfälle deshalb nicht über 25 % liegen (OECHSNER 1996).

Die Verwendung von Abfallstoffen mit einem hohen Anteil an Trockensubstanz, wie es zum Beispiel bei Bioabfällen der Fall ist, führte an der verwendeten Anlage immer wieder zu Ausfällen. Der Antriebsmechanismus des Rührwerkes (über Keilriemen) war nicht immer ausreichend, um die Abfallmatrix in der Anlage zu durchmischen. Nach mehrmaligen

Auftreten solcher Probleme wurde die Einschaltfrequenz des Rührwerkes zweimal so verändert, daß das Gärsubstrat öfter und länger durchmischt wurde (siehe Tabelle 1).

Zum Betrieb der Anaerobanlage wurde innerhalb der mesophilen Prozeßführung auch ausschließlich Pasteursubstrat (Pasteur) als Gärsubstrat verwendet. Dieses Substrat fiel während der Pasteurisierung im Labormaßstab an, wo es auf 70 °C erwärmt worden war.

Die Anlage wurde bei zwei Temperaturbereichen betrieben. Zunächst im mesophilen Bereich, welcher für Temperaturen von 33 °C bis 37 °C definiert ist und anschließend im thermophilen Bereich bei Temperaturen um 55 °C. Diese zwei Verfahrensstufen hinsichtlich der Temperaturführung decken die praktizierten Betriebsverfahren in Großanlagen voll ab. So werden Anlagen im einstufigen Naßverfahren zu 75 % im mesophilen Bereich gefahren, während beim Betrieb im einstufigen Trockenverfahren fast 80 % der Anlagen eine thermophile Prozeßführung aufweisen (KERN 1999).

Die Umstellung der Anlage vom mesophilen zum thermophilen Temperaturbereich erfolgte in folgenden Schritten: fünf Tage bei 39 °C, ein Tag bei 45 °C, fünf Tage bei 50 °C, ein Tag bei 53,5 °C und ein Tag bei 54,5 °C. Danach wurde die Temperatur im thermophilen Bereich zwischen 54,7 °C und 55,5 °C variiert.

Die thermophile Prozeßführung ermöglicht eine schnellere Umsetzung sowie einen um bis zu 10 % höheren Abbaugrad organischer Substanzen. Die Gasausbeute wird somit ebenfalls erhöht. Ein Nachteil dieser Prozeßführung kann möglicherweise eine leichtere Störung des temperaturabhängigen Gleichgewichts von Ammonium-Ammoniak sein, infolge einer Anreicherung des hemmend oder toxisch wirkenden Ammoniaks (WEILAND 1999).

Die Angaben zur Betriebsführung sind in der Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt. Die Einteilung der einzelnen Betriebsabschnitte (Betriebsnummern 1-19) erfolgte hauptsächlich nach der Betriebstemperatur (mesophil, thermophil) und nach der Zusammensetzung des verwendeten Inputmaterials.

Die Anaerobanlage im Labormaßstab wurde von Juli 1999 bis zum März 2001 an über 620 Tagen betrieben. Die Untersuchungen zur Phyto- und Seuchenhygiene fanden dabei parallel statt.

Tabelle 1: Betriebsführung der Anaerobanlage im Labormaßstab.

Betriebs-Nr.	Zeitraum (Tage)	Temperatur (Wasserbad)	Gärsubstrat Volumen-Anteil (%)			Bemerkungen
			SR	Bio	Pasteur	
1	06.07.99-02.08.99 (28)	33,0 - 33,3 °C	0	0	0	Einlaufphase mesophil (15 l Gülle/d)
2	03.08.99-26.08.99 (24)	33,3 °C	25	0	0	
3	27.08.99-03.09.99 (8)	33,3 °C	0	0	100	
4	04.09.99-15.09.99 (12)	33,3 °C	25	0	0	
5	16.09.99-07.10.99 (22)	33,3 °C	25	0	0	
6	08.10.99-17.11.99 (41)	33,3 °C	25	0	0	
7	18.11.99-09.12.99 (22)	33,7 °C	0	0	100	26.11.-29.11.: Ausfall Rührwerk
8	10.12.99-14.02.00 (67)	33,7 °C	25	0	0	
9	15.02.00-11.04.00 (57)	33,7 °C	0	0	100	
10	12.04.00-27.04.00 (16)	33,7 °C	25	0	0	
11	28.04.00-09.05.00 (12)	39 – 54,5 °C	25	0	0	Umstellung von mesophil auf thermophil
12	10.05.00-29.05.00 (20)	54,7 °C	25	0	0	
13	30.05.00-08.06.00 (10)	54,7 – 55,5 °C	25	0	0	kein stabiler Reaktorbetrieb
14	09.06.00-12.07.00 (34)	55,2 – 55,5 °C	25	0	0	
15	13.07.00-28.08.00 (47)	54,5-55,5 °C	25	25	0	Rührwerk: 5 min alle ½ h 20.07.-27.07.: Ausfall Rührwerk (zeitweise)
16	29.08.00-14.09.00 (17)	-	-	-	-	Ausfall der Anlage
17	15.09.00-27.11.00 (74)	54,0 °C	25	25	0	Rührwerk: 59 sek alle ¼ h 26.11.-29.11.: Ausfall Rührwerk
18	28.11.00-15.01.01 (49)	54,0 °C	0	50	0	mehrfach Störungen (Austritt Gärsubstrat)
19	16.01.01-07.03.01 (51)	55,0 °C	0	50	0	mehrfach Störungen (Austritt Gärsubstrat)

SR = Speiseabfälle, Bio = Bioabfälle, Pasteur = Pasteursubstrat.

In die Anaerobanlage im Labormaßstab, wie auch in die Pasteurierungsanlage, wurde TMV nicht nur mit Hilfe der unter Punkt 2.4 beschriebenen Keimträgertechnik eingebracht, sondern es fand auch eine direkte Kontamination der Anlage mit TMV infiziertem Blattmaterial statt. Von den durchgeführten drei Versuchsvarianten stehen für die Auswertung bisher zwei Versuche für die thermophile Prozeßführung zur Verfügung:

1.

Einbringung von etwa 1 l Blatt- und Sproßmaterial an 15 Tagen zusätzlich zum Inputmaterial (50 % Gülle, 25 % SR, 25 % Bio). Das Probenmaterial wurde von jeweils zwei Tabakpflanzen gewonnen, was etwa einer Masse von 90 bis 150 g entspricht. Ziehung von Outputproben (mit jeweils einer Wiederholung) an 10 Tagen, immer vor Einbringung von neuem Inputmaterial. Aufarbeitung von jeweils 1 g Probenmaterial mit 10 ml Phosphatpuffer. Inokulation im Biotest nach der Halbblattmethodik.

2.

Einbringung von 400 g Blattmaterial an 7 Tagen zusätzlich zum Inputmaterial (50 % Gülle, 50 % Bio). Ziehung von Outputproben (mit jeweils einer Wiederholung) an 13 Tagen, immer vor Einbringung von neuem Inputmaterial. Es wurde versucht, durch Auswaschung der Outputmatrix durch ein Sieb, ausschließlich Blattmaterial zurückzugewinnen. Aufarbeitung von jeweils 1 g Probenmaterial mit 10 ml Phosphatpuffer. Inokulation im Biotest nach der Halbblattmethodik.

Neben den Versuchen zur Anaerobbehandlung von Abfällen in der Anlage im Labormaßstab wurden auch Untersuchungen an zwei Praxisanlagen zur anaeroben Vergärung von Bioabfällen in Süd-Hessen (Praxisanlage I) und in SW-Bayern (Praxisanlage II) durchgeführt. Beide Anlagen können zu den einstufigen Naßvergärungsanlagen gezählt werden, welche im thermophilen Bereich arbeiten und entsprechen damit hinsichtlich der Betriebsführung der Anaerobanlage im Labormaßstab.

2. 6 Praxisanlage I

Die Untersuchungen an dieser Anlage fanden im Zeitraum Mai bis Juni 2000 statt. Die Anlage, welche im Probetrieb lief, wurde täglich mit 10 bis 15 t Bio- und Speiseabfällen beschickt, wobei im Normalbetrieb eine Verdopplung der Inputmenge möglich sein soll. Die Bioabfälle werden vor der Vergärung auf etwa 2 cm Partikelgröße zerkleinert und verbleiben danach für etwa zwei Tage in einer Vorrottebox, wo sie einer Vorhydrolyse unterliegen. Von dort kommen die Abfälle in den 900 m³ fassenden Fermentationsreaktor, welcher mit circa 800 m³ Gärs substrat aufgefüllt ist. Der pH-Wert des Inputmaterials liegt bei 4,5 bis 5,0. Über einen Entnahmetank mit etwa 2 m³ Volumen können mit Hilfe einer Vakuumpumpe circa 100 m³/h Outputmaterial entnommen werden, welches einen pH-Wert um 7,7 aufweist. Aus dem Entnahmetank kommt die Abfallmatrix in einem Behälter zur Verdichtung. Es entsteht dabei ein Substrat mit etwa 50 % TS, welches einer aeroben Nachrotte zugeführt wird. Der verbleibende Gärrückstand mit etwa 5 % TS wird auf 90 bis 100 °C erhitzt. Der so erhaltene

Restabfall mit etwa 20 % TS wird ebenfalls der Kompostierung zugeführt. Das bei diesen Prozessen entstandene Kondenswasser wird zurück in den Betriebskreislauf geführt.

Die angewandte Methodik zum Umfang der Einlegeproben und die Art der Probenaufbereitung orientierte sich an den bis dahin gewonnenen Erkenntnissen aus der halbtechnischen Anaerobanlage im Labormaßstab. In die Praxisanlage I, welche bereits bautechnisch mit drei Probestutzen ausgerüstet ist, wurden 10 Rappgefäße mit jeweils 1 g TMV infiziertem Blattmaterial eingebracht. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde je Stutzen ein Rappgefäß (nach 21 Tagen aus einem Stutzen zwei Proben) und zusätzlich nach 21 Tagen Substratproben als Negativkontrollen aus allen drei Stutzen entnommen.

Die Aufarbeitung der TMV Proben erfolgte durch Homogenisation mit 30 ml Phosphatpuffer. Die so erhaltenen Proben wurden im Biotest überprüft. Je Blatt wurden 20 µl der Probe über die gesamte Blattspreite der Testpflanzen inokuliert. Für jede Probe wurden jeweils drei bis vier Pflanzen mit je drei Blättern verwendet. Als Positivkontrolle diente eine 2 %ige Verdünnung von Pflanzenpreßsaft.

2. 7 Praxisanlage II

Die kombinierte Vergärungs- und Kompostierungsanlage in SW-Bayern arbeitet nach dem Prinzip des thermophilen Vergärungsverfahrens und ist für eine Kapazität von bis zu 11.500 Jahrestonnen an Bioabfällen und biologischen Gewerbeabfällen ausgelegt. Der überwiegende Anteil der zu vergärenden Ausgangsmaterialien besteht aus Bio- und Pflanzenabfällen, welche vor der Einbringung in wäßrige Lösung gebracht werden. Der Anteil an Gewerbeabfällen wird gesondert hygienisiert ($> 70\text{ °C}$, $> 30\text{ min}$), anschließend mit den Bioabfällen vermengt und in die Fermenter befördert. Der Vergärung ist eine automatisierte aerobe Rotte nachgeschaltet.

Die Anlage besteht aus drei geschlossenen, 7 m hohen Gärbehältern. Jeder Behälter wird auf etwa 6 m mit Gärsubstrat aufgefüllt, so daß ein Gasraum von 1 m Höhe verbleibt. Das Reaktorvolumen (Gärvolumen) beträgt insgesamt 3.500 m^3 . Die Fermentationsreaktoren korrespondieren untereinander, wobei der dritte Fermenter ausschließlich als Überlauf dient (keine Rückkopplung). Die Abfallmatrix wird in den Behältern durch zwei Rührer im 10 bis 15 Minuten Takt homogen durchmischt. Die pH-Werte des Inputmaterials liegen bei etwa 5,2 bis 6,2. In den einzelnen Gärbehältern kommt es schließlich zu einer Alkalisierung der Abfallmatrix (Reaktor 1: pH-Wert 5,3 - 6,6; Reaktor 2: pH-Wert 7,8 - 8,2; Reaktor 3: pH-Wert 7,7 - 8,3; Output: pH-Wert 8,3 - 8,6). Innerhalb einer hydraulischen Verweilzeit der

Abfallmatrix von 20 Tagen in der Anaerobanlage werden etwa 45 % der organischen Substanz zu Biogas umgesetzt.

Durch das Hintereinanderschalten mehrerer Reaktoren kann die anaerobe Hydrolyse verstärkt im ersten Reaktor ablaufen. Dort liegt eine hohe Konzentration von Exoenzymen bei reduziertem, leicht sauren pH-Wert vor.

Die Anlage war bautechnisch nicht mit Probestutzen versehen gewesen, so daß ein perforiertes Rohr aus Metall hergestellt wurde (150 x 10 x 10 cm), welches an der Abdeckung des ersten Reaktors angebracht wurde. In diesen Probenstutzen wurden sämtliche Einlegeproben sowie ein Temperaturmeßgerät (Firma Gemini) eingebracht.

Die Untersuchungen an dieser Anlage fanden im Rahmen einer direkten Prozeßprüfung im Zeitraum August bis September 2000 statt. Im Mittelpunkt der phytohygienischen Untersuchungen standen die Überprüfung der Hygienisierung der drei im Anhang 2 der BIOABFV (1998) genannten phytopathogenen Prüforganismen Tabak-Mosaik-Virus (TMV), *P. brassicae* und Tomatensamen. Die dabei verwendeten Probenmengen entsprachen den Vorgaben der BIOABFV (1998) und waren folgende: 18 Proben zu je 10 g TMV Blattmaterial (zusätzlich noch 4 Proben zu je 1 g), 18 Proben je 10 g *P. brassicae* Gallenmaterial und 18 Proben zu je 1 g Tomatensamen.

Die Aufarbeitung der Einlegeproben mit TMV Blattmaterial erfolgte jeweils durch Homogenisation mit 30 ml Phosphatpuffer. Die so erhaltenen Proben wurden im Biotest überprüft. Je Blatt wurden 20 µl der Probe über die halbe Blattspreite der Testpflanzen inokuliert (Halbblattmethodik). Für jede Probe wurden jeweils drei Pflanzen mit je drei Blättern verwendet. Als Positivkontrollen dienten der aus der Homogenisierung frischer Blätter gewonnene Pflanzenpreßsaft sowie 2 %ige und 8 %ige Verdünnungen dieser Suspension. Als Negativkontrolle wurde der jeweils zur Aufarbeitung der Proben verwendete Phosphatpuffer getestet.

Jede behandelte Probe mit *P. brassicae* Gallenmaterial wurde mit "Fruhstorfer Einheitserde" gemischt und in je einen Topf (Ø 14 cm) eingebracht. Zum Nachweis im Biotest wurden in jeden Topf vier etwa zwei Wochen alte Sarepta-Senfpflanzen pikiert. Für die Positivkontrolle wurde dasselbe Gallenmaterial wie für die Untersuchungen verwendet. Je 1 g des Gallenmaterials wurde in fünf Töpfe eingebracht (zu je 500 ml). Als Negativkontrolle wurde die verwendete Erde im selben Umfang wie bei der Positivkontrolle, jedoch ohne Gallenmaterial, in insgesamt sechs Töpfe ausgelegt. In die Töpfe für die Kontrollen wurden jeweils drei Pflanzen pikiert. Die Bonitierung der Wurzeln der Testpflanzen erfolgte nach sechs bis neun Wochen.

Von den Tomatensamen wurden nach der Behandlung je Keimträger 200 Samen entnommen und zu je 50 Korn auf vier, mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen aufgeteilt. Als Kontrolle wurden 200 unbehandelte Samenkörner verwendet. Die Auszählung der gekeimten Tomatensamen fand jeweils nach 7, 14 und 21 Tagen statt.

Als Keimträger dienten Leinenbeutel (19 x 14,5 cm) für die Einbringung des *P. brassicae* Gallenmaterials sowie Beutel aus Miederware (7 x 10,5 cm) für die TMV Blattproben. Zusätzlich wurden für die Einbringung von vier TMV Einlegeproben (zu je 1 g) die von RAPP (1995) entwickelten Diffusions- oder Volumenkeimträger aus Polycarbonat verwendet. Die Tomatensamen wurden in Verbandmull eingewickelt und zu dem Gallenmaterial in die Leinenbeutel beigelegt. Aus allen Proben wurden vier Probesätze zusammengestellt, welche mittels 25,5 x 35,5 cm großen Crispac-Beuteln (Fa. Baumann Saatzuchtbedarf, Waldenburg) in das perforierte Einfüllrohr des Reaktors eingebracht wurden.

Die Verweildauer der Einlegeproben in der Anaerobanlage orientierte sich an den im Anhang 2 der BIOABFV (1998) genannten Zeiträumen. Jeweils 9 Proben wurden nach 7 Tagen (Tomatensamen: 8 Proben) entnommen und jeweils 9 Einlegeproben verblieben 20 Tage (Tomatensamen: 10 Proben) im Reaktor. Von den Volumenkeimträgern wurden zwei nach 7 und zwei nach 20 Tagen der Anlage entnommen.

2. 8 Pasteurisierungsanlage im Labormaßstab

Es fanden Versuche mit einer Pasteurisierungsanlage im Labormaßstab im Rahmen einer Vor- bzw. Nachpasteurisierung zur Anaerobbehandlung sowie ausschließlich Untersuchungen zur Pasteurisierung statt. Für diese Versuche stand eine Modellanlage mit 50 l Raumvolumen im Modellmaßstab zur Verfügung (Abb. 3), welche mit etwa 40 l Substrat je Versuch gefüllt wurde. Eine homogene, mechanische Durchmischung des Pasteursubstrates wird in dieser Anlage durch ein internes, zentrales Rührwerk gewährleistet. An dem Rührwerk sind zugleich zwei perforierte Metallrahmen befestigt, in denen die Einlegeproben in den Pasteur eingebracht wurden. Über einen automatischen Zeitschaltmechanismus wird das Rührwerk und zwei damit verbundene Probestutzen intervallartig alle zwei Minuten für eine Dauer von zwei Minuten in Betrieb gesetzt. Über ein externes Wasserbad (LAUDA E 100), welches als Heizung dient, kann ein gewünschter Sollwert eingestellt werden. Die Temperaturmessung im Inneren der Anlage fand mit Hilfe eines Digitalthermometers (GTH 215, Greisinger elektronik) statt.

Das verwendete Pasteursubstrat benötigte bei einer Ausgangstemperatur von 15 °C bis 30 °C (jahreszeitliche Unterschiede) etwa 210 bis 240 Minuten, um eine eingestellte Solltemperatur

von 70 °C zu erreichen (Abbildung 4). Die Temperatur stieg dabei relativ schnell innerhalb von 100 Minuten auf Werte von etwa 60 °C. Dieselbe Zeitspanne wurde dann noch einmal benötigt, um das Substrat um die verbleibenden 10 °C zu erwärmen. Wurden während dieser Aufheizphase (AP) bereits Proben eingebracht, so wird im Ergebnisteil darauf besonders hingewiesen. Die Verweilzeit der Einlegeproben in der Anlage betrug ansonsten 60 Minuten. Eine zusätzliche Verweildauer von etwa 10 Minuten, welche zur Temperaturangleichung des Keimträgerinneren (Volumenkeimträger nach RAPP 1995) zum Außenmilieu notwendig war, wurde dabei berücksichtigt. Bei Versuchen zur thermischen Inaktivierung von TMV wurden darüber hinaus höhere Temperaturen von 75 °C, 80 °C, 85 °C sowie 90 °C am Pasteur angelegt.



Abb. 3: Pasteurisierungsanlage im Modellmaßstab.

Das Pasteursubstrat setzte sich zumeist aus denselben Grundsubstraten zusammen, welche auch zum Betrieb der Anaerobanlage zum Versuchszeitpunkt verwendet wurden. Neben einem homogenen Substrat aus 100 % Rindergülle waren dies Mischungen aus 75 % Gülle zu 25 % Speiseabfällen sowie 50 % Gülle zu 50 % Bioabfall. Im Rahmen von Nachpasteurisierungen zur Anaerobbehandlung wurde ausschließlich Outputsubstrat aus der halbtechnischen Anaerobanlage verwendet.

TMV infiziertes Blattmaterial wurde auch direkt in den Pasteur eingebracht und nach der Pasteurisierung bzw. nach bestimmten Verweilzeiten in einem 50 l Faß (Lagerung bei etwa 25 °C) zurückgewonnen. Die im Faß gelagerte Pasteurmatrix wurde täglich einmal manuell gerührt. Zur Auswertung liegen drei Versuche vor:

1.

Zusätzliche Einbringung von 400 g Blattmaterial, welches 60 Minuten bei 70 °C (+ AP: 230 min) in einem Pasteurgemisch aus 75 % Gülle und 25 % Speiseresten pasteurisiert wurde. Die Proben wurden nach der Aufheizphase (AP), nach 60 Minuten (+ AP) sowie nach 6 bzw. 7

Tagen zusätzlicher Lagerung im Faß gezogen. Von den gewonnenen Proben wurden jeweils 1 g mit 20 ml Phosphatpuffer homogenisiert und im Biotest über das gesamte Blatt der Testpflanzen inokuliert.

2.

Zusätzliche Einbringung von 3100 g Blatt- und Sproßmaterial, welches 60 Minuten bei 70 °C (+ AP: 195 min) in einem Pasteurgemisch aus 75 % Gülle und 25 % Speiseresten pasteurisiert wurde. Die Proben wurden nach 60 Minuten (+ AP), nach 24 Stunden sowie nach 4, 6, 11 und 14 Tagen Lagerung im Faß gezogen. Von den gewonnenen Proben wurden jeweils 1 g mit 10 ml Phosphatpuffer homogenisiert und im Biotest jeweils 20 µl über das gesamte Blatt bzw. über das halbe Blatt der Testpflanzen inokuliert.

3.

Zusätzliche Einbringung von 400 g Blattmaterial, welches 60 Minuten bei 90 °C in einem Substrat aus 100 % Outputmaterial pasteurisiert wurde. Es wurden nach der Behandlung zwei Blattproben zurückgewonnen, mit jeweils 1 g mit 10 ml Phosphatpuffer homogenisiert und im Biotest mit der Halbblattmethodik getestet.

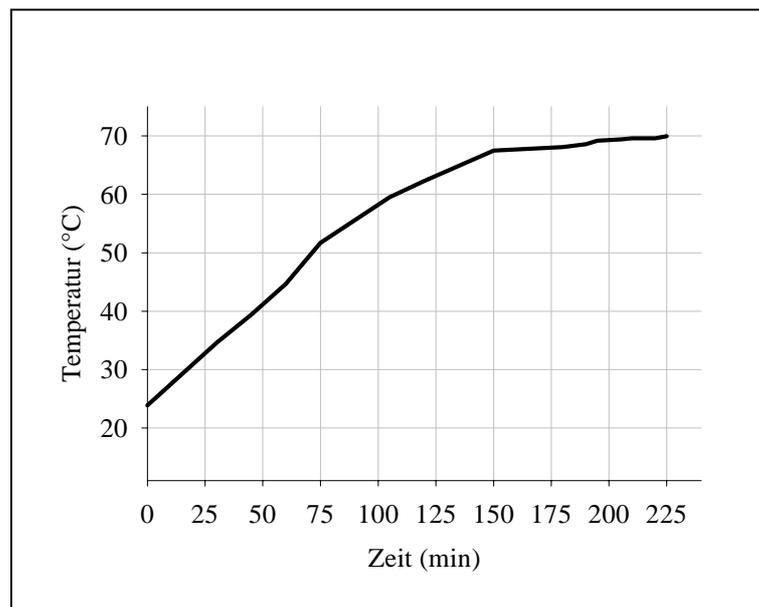


Abb. 4:

Pasteurierungsanlage im Modellmaßstab: typischer Temperaturverlauf während der Aufheizphase (AP) zum Erreichen einer angelegten Temperatur von 70 °C.

2. 9 Wasserbad im Labormaßstab

Das verwendete Wasserbad (Ultra-Thermostat, Firma Haake, Berlin) wurde mit etwa 10 l Wasservolumen betrieben. Ein integriertes Rührwerk erlaubt eine dauerhaft gleichmäßige Erwärmung des Wassers auf den eingestellten Sollwert. Die verwendeten Volumenkeimträger nach RAPP (1995) wurden in der Regel durch direktes Eintauchen in den Kessel mit Wasser aufgefüllt.

Die Versuche im Wasserbad wurden bei unterschiedlich hohen Temperaturen (Temperaturreihen) und unter Variierung der Verweilzeiten der Proben (Zeitreihen) durchgeführt. Zur Bestimmung des thermalen Inaktivierungspunktes wurden die Einlegeproben jeweils 10 Minuten bei Temperaturen von 30 °C bis 90 °C in das Wasserbad eingebracht. Zur Simulation mesophiler bzw. thermophiler Bedingungen wurden weiterhin Temperaturen von 37 °C bzw. 55 °C angelegt und die Einlegeproben für Verweilzeiten von 10 Minuten bis 28 Stunden in das Wasserbad eingebracht. In weiteren Versuchen mit dem Wasserbad wurden die Temperaturbedingungen bei einer Pasteurisierung simuliert. Die Einlegeproben wurden dabei Temperaturen von 70 °C bis 90 °C bei einer Verweilzeit von jeweils 60 Minuten ausgesetzt.

Bei den Untersuchungen zur Inaktivierung von Unkrautsamen bei feuchter Hitze wich die angewandte Methodik im Vergleich zu den Tomatensamen (Punkt 2.3) ab. Bei diesen Versuchen wurden jeweils 20 Korn der genannten Unkrautsamen sowie die gleiche Menge Tomatensamen in Verbandmull (Ypsigaze, Holthaus Medical, Remscheid-Lüttringhausen) eingewickelt und in das Wasserbad eingebracht.

3 Ergebnisse

3.1 Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

Aufgrund der großen Datenmenge, erzielt aus einer Fülle sehr unterschiedlicher Versuchsvarianten, können hier nur ausgewählte repräsentative Werte für die einzelnen Anlagen wiedergegeben werden. Um stereotype Wiederholungen zu vermeiden, wird nicht stets erneut angegeben, daß jeder einzelne Wert den Mittelwert der Anzahl der Läsionen für jeweils eine Einlegeprobe mit TMV infiziertem Material darstellt. In Klammern ist jeweils der Wert für die Standardabweichung hinzugefügt. Die mit einem Asteriskus (*) versehenen Werte wurden durch die Inokulation der jeweiligen Proben über die gesamte Blattfläche der Testpflanzen gewonnen. Dies trifft insbesondere auf die Angaben zu den Versuchen in der Anaerobanlage im Labormaßstab unter mesophilen Bedingungen, für die Praxisanlage I, für die Wasserbadversuche, für die Kontrollversuche mit dem gereinigten Virus und einen Teil der Pasteurversuche zu. Die übrigen Werte beziehen sich auf Inokulationen nach der Halbblattmethodik und werden hier nicht extra gekennzeichnet.

3.1.1 Anaerobe Vergärung

Ausgewählte Ergebnisse zu den Untersuchungen in der Anaerobanlage im Labormaßstab unter mesophilen und thermophilen Bedingungen sowie für beide Praxisanlagen sind in der Abb. 5 und in der Tabelle 2 dargestellt.

Zunächst wurde Probenmaterial in die Anaerobanlage im Labormaßstab unter mesophilen Bedingungen eingebracht. Das verwendete Inputmaterial zur Betreibung der Anlage bestand in einer Versuchsvariante aus 75 % Gülle und 25 % Speiseabfällen. Die Einlegeproben wurden nach 7, 14 und 21 Tagen wieder entnommen (Abb. 5).

Eine Inaktivierung von TMV wurde weder nach einer 7tägigen Verweilzeit noch nach einer Verweildauer von 14 Tagen im Anaerobreaktor erzielt. Auch eine Einbringungszeit von 21 Tagen war nicht ausreichend, um die Infektiosität des Virus herabzusetzen. Typische Werte sind für diese Proben 363* (153), 197* (83), 278* (85) und 317* (178) Läsionen.

Eine Positivkontrolle aus einer 2 %igen Suspension erzielte einen Mittelwert von 31* (6) Läsionen (erste Kontrolle in Abb. 5).

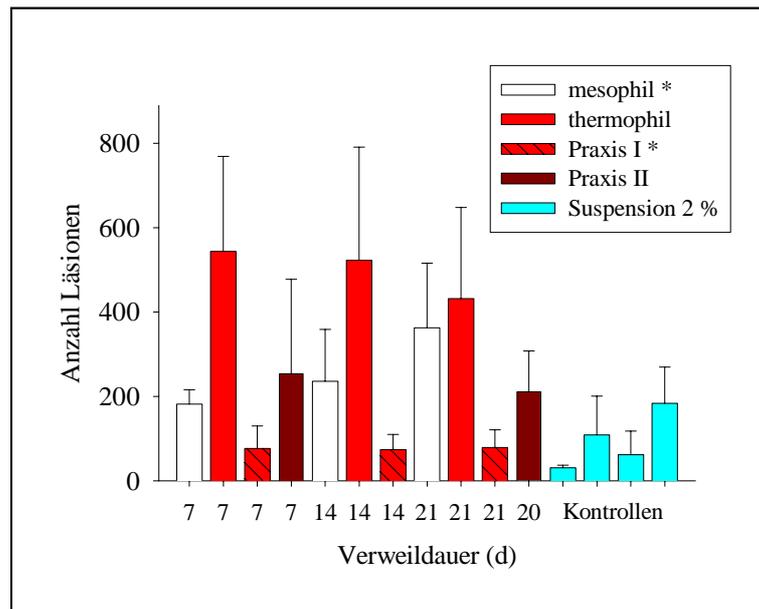


Abb. 5:

Anaerobanlage im Labormaßstab (mesophil, thermophil), Praxisanlagen I und II (thermophil): Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung) bei unterschiedlicher Verweilzeit der Einlegeproben. Jede Säule ist identisch mit einer untersuchten Probe (ausgewählte repräsentative Werte).

Ebenfalls zu keiner Reduzierung der Infektiosität von TMV kam es bei einer zweiten Versuchsvariante unter Verwendung von Pasteursubstrat als Inputmatrix. Nach einer Verweildauer von 21 Tagen wurden noch Läsionenwerte von 705* (283) und 796* (342) erzielt.

Die auf 2 % verdünnte Suspension von Pflanzenpreßsaft erbrachte als Maßstab für die Positivkontrolle einen Mittelwert von 40* (34) Läsionen.

Für diesen Versuchsdurchgang liegen auch zwei Werte für Einlegeproben mit jeweils 1 ml TMV Suspension vor. Für beide Proben konnte nach 21tägiger Verweildauer in der Anaerobanlage unter mesophilen Bedingungen eine fast vollständige Inaktivierung von TMV erzielt werden. Der ermittelte Mittelwert lag bei jeweils einer Läsion.

Bei der Einbringung von TMV Proben in die Anaerobanlage im Labormaßstab unter thermophilen Bedingungen wurden Proben bereits nach einer Verweilzeit von 24 Stunden zurückgewonnen. Für diese Verweildauer wurde keine Reduktion oder Inaktivierung des Virus gefunden. Bei der Verwendung einer Substratkombination aus 50 % Gülle, 25 % Speiseabfällen und 25 % Bioabfällen wurden Werte von 509 (195) und 511 (214) Läsionen gefunden. Für die Substratkombination aus 50 % Gülle und 50 % Bioabfällen lagen die Mittelwerte zum Beispiel bei 618 (342) und 924 (262) Läsionen.

Ähnliche Werte wurden auch für längere Verweilzeiten von 7, 14 und 21 Tagen in der Anaerobanlage unter thermophilen Bedingungen ermittelt. Ausgewählte Werte für die Substratkombination aus 50 % Gülle, 25 % Speiseabfällen und 25 % Bioabfällen sind für diese Verweilzeiten in der Abb. 5 dargestellt. Für eine 21tägige Verweilzeit wurde zum Beispiel noch eine durchschnittliche Anzahl von 432 (216) oder von 326 (158) Läsionen erzielt.

Auch bei Variierung der Keimträgertechnik ändern sich die Zahlen nicht. So wurde für denselben Versuchsdurchgang bei Verwendung von 10 g TMV infiziertem Blattmaterial in Keimträgern aus Miederware zum Beispiel ein Mittelwert von 246 (180) Läsionen ermittelt. Die Positivkontrolle aus einer unverdünnten Suspension von Pflanzenpreßsaft ergab einen Mittelwert von 625 (177) Läsionen.

Für die Substratkombination aus 50 % Gülle und 50 % Bioabfällen konnten nach einer 21tägigen Verweilzeit der Einlegeproben unter thermophilen Bedingungen Werte von 202 (73) oder von 170 (84) Läsionen ausgezählt werden.

Die unverdünnte TMV Suspension ergab als Positivkontrolle einen Mittelwert von 557 (177) und auf 2 % verdünnt einen Mittelwert von 109 (92) Läsionen.

Die im Biotest erzielten Werte für die Anzahl der Läsionen lagen für die Einlegeproben, welche bei einer Substratkombination aus 75 % Gülle und 25 % Speiseabfällen in die Anaerobanlage im Labormaßstab eingebracht wurden, niedriger als die bisher dargestellten Werte. Nach einer Verweilzeit von 14 Tagen wurden zum Beispiel durchschnittlich 55 (27) Läsionen und nach 21 Tagen Werte von 69 (36) oder 79 (57) Läsionen ermittelt.

Die Positivkontrolle aus einer 2 %igen Suspension von Pflanzenpreßsaft führte im Biotest zu durchschnittlich 36 (21) bzw. 13 (10) Läsionen.

Tabelle 2:

Anaerobanlage im Labormaßstab (mesophil, thermophil), Praxisanlagen I und II (thermophil): Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung) bei Verwendung verschiedener Substratkombinationen und bei unterschiedlichen Verweilzeiten der Einlegeproben (Keimträgertechnik).

Anlage	Substratkombination	Verweilzeit	Läsionen (STABW)
Anaerobanlage (Labormaßstab) mesophil	75 % Gülle : 25 % SR	21 d	363* (153)
	dito	21 d	197* (83)
	dito	21 d	278* (85)
	dito	21 d	317* (178)
	Pasteursubstrat	21 d	705* (283)
	dito	21 d	796* (342)
Anaerobanlage (Labormaßstab) thermophil	50 % Gülle : 25 % SR : 25 % Bio	24 h	509 (195)
	dito	24 h	511 (214)
	50 % Gülle : 50 % Bio	24 h	618 (342)
	dito	24 h	924 (262)
	50 % Gülle : 25 % SR : 25 % Bio	21 d	432 (216)
	dito	21 d	326 (158)
	dito	21 d	246 (180) [Miederware]
	50 % Gülle : 50 % Bio	21 d	202 (73)
	dito	21 d	170 (84)
	dito	21 d	79 (57)
Praxisanlage I thermophil	Bio- und Speiseabfälle	7 d	77* (53)
		14 d	74* (36)
		21 d	79* (42)
Praxisanlage II thermophil	Bioabfälle und biologische Gewerbeabfälle	7 d	164 (118)
		7 d	254 (224)
		7 d	212 (129) [Miederware]
		7 d	457 (245) [Miederware]
		20 d	171 (83)
		20 d	211 (97)
		20 d	203 (91) [Miederware]
20 d	329 (183) [Miederware]		

SR = Speiseabfälle, Bio = Bioabfälle.

Die bisher dargestellten Ergebnisse für die thermophile Betriebsführung der Anaerobanlage im Labormaßstab konnten auch bei den Untersuchungen an den zwei gewerblichen Großanlagen in der Praxis festgestellt werden.

Bei der Praxisanlage I konnte keine Abnahme der Infektiosität von TMV bei Verweilzeiten der Einlegeproben von 7 bis 21 Tagen erzielt werden. Die im Biotest ermittelten Werte für die durchschnittliche Anzahl der Läsionen fielen für alle Untersuchungszeiträume sehr ähnlich

aus. Typische Mittelwerte waren zum Beispiel für die Verweilzeit von 7 Tagen 77* (53), für 14 Tage 74* (36) und für 21 Tage 79* (42) Läsionen.

Die Positivkontrolle aus einer 2 %igen Suspension ergab einen Mittelwert von 62* (56) Läsionen (dritte Kontrolle in Abb. 5).

Konstante Werte für die Anzahl der Läsionen wurden auch bei den Untersuchungen in der Praxisanlage II ermittelt und dies unabhängig von der verwendeten Keimträgertechnik. Für eine Verweildauer von 7 Tagen wurden für die zwei Einlegeproben mit je 1 g TMV infiziertem Blattmaterial (Volumenkeimträger nach RAPP 1995) Werte von 164 (118) und 254 (224) Läsionen erzielt. Die neun Werte für die 10 g Einlegeproben (Keimträger aus Miederware) bewegten sich in einer Spanne von durchschnittlich 212 (129) bis 457 (245) Läsionen. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Einlegeproben, welche 20 Tage in der Praxisanlage II verblieben. Die zwei Werte der Proben in den Volumenkeimträgern ergaben 171 (83) und 211 (97) Läsionen. Durchschnittliche Werte für die Einlegeproben in den Beuteln aus Miederware reichten von 203 (91) bis 329 (183) Läsionen.

Die Werte für die Positivkontrollen lagen für diese Versuche bei 377 (108) Läsionen für die unverdünnte Suspension aus Pflanzenpreßsaft, bei 261 (115) Läsionen für eine Verdünnung dieser Suspension auf 8 % und für eine 2 %ige Verdünnung betrug die durchschnittliche Anzahl der Läsionen 184 (86, vierte Kontrolle in Abb. 5).

Für die Anaerobanlage im Labormaßstab liegen neben den Untersuchungen zu den Einlegeproben in Keimträgern auch Ergebnisse zu zwei Versuchen vor, in denen TMV infiziertes Pflanzenmaterial während der thermophilen Prozeßführung direkt zur Inputmatrix dazugegeben wurde. Bei einem ersten Probelauf wurde an 15 Tagen Material von jeweils zwei Pflanzen eingebracht und an 10 Terminen jeweils zwei unselektierte Outputproben gezogen. Etwaiges Pflanzenmaterial in diesen Outputproben verblieb zuvor in der Anlage während einer Mindestverweilzeit von 24 Stunden, von 2 oder von 3 Tagen und einer Maximalverweilzeit von 17 Tagen. In keiner Probe konnte im Biotest TMV nachgewiesen werden.

Die Positivkontrollen entsprechen denen unter der Praxisanlage II vorgestellten Werten.

Die Ergebnisse des zweiten Versuches sind in der Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt. An 7 Tagen wurde jeweils 400 g TMV infiziertes Blattmaterial in die Anlage eingebracht und an 13 Terminen wurden jeweils zwei Outputproben entnommen. Durch gezieltes Auswaschen der Outputmatrix wurde ab dem 2. Tag der Probenziehung versucht, das eingebrachte Blattmaterial zurückzugewinnen.

Tabelle 3:

Anaerobanlage im Labormaßstab (thermophil): Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung) bei unterschiedlichen Verweilzeiten der Einlegeproben (direkte Einbringung von Blattmaterial, Versuch 2).

maximale Verweilzeit (d)	minimale Verweilzeit (d)	Läsionen (STABW)	Einbringung Blattmaterial Bemerkungen
0	0	0 0	400 g Blatt, Ziehung Nullproben
1	1	0 (0) 3 (2)	400 g Blatt
2	1	555 (152) 401 (121)	400 g Blatt
3	1	329 (160) 410 (192)	400 g Blatt
6	3	282 (229) 289 (100)	400 g Blatt
7	1	363 (275) 262 (96)	400 g Blatt
8	1	448 (123) 699 (227)	400 g Blatt
9	1	441 (248) 663 (249)	
15	6	0 0	keine eindeutige Identifizierung der Blattproben mehr möglich
16	7	0 0	
17	8	0 0	
21	12	0 0	
23	14	0 0	

Tag der maximalen Verweilzeit entspricht dem Tag der Probenziehung.

Die Mindestverweildauer des Probenmaterials in der Anlage variierte dabei von 24 Stunden bis 14 Tage. Die maximale Verweilzeit der beiden zuletzt gezogenen Proben betrug 23 Tage. Für die Tage 2, 3, 6, 7, 8 und 9 des Untersuchungszeitraumes konnte im Output immer Tabakblattmaterial eindeutig zurückgewonnen werden. Die Mindestverweilzeit dieser Proben betrug 24 Stunden bzw. 3 Tage. Für beide Verweilzeiten zeigten die im Biotest erzielten Werte keine Abnahme der Infektiosität des Virus. Am 8. Tag wurde letztmalig TMV infiziertes Blattmaterial in die Anlage eingebracht. Danach wurden weitere Proben nach einer Mindestverweilzeit von 6, 7, 8, 12 und 14 Tagen der Anlage entnommen. Da die vormalig eingebrachten Tabakblätter im Output nicht mehr klar erkennbar waren, wurde jeweils eine unselektierte Outputprobe und eine Probe mit "blattähnlichen Strukturen" entnommen. In keiner dieser Proben konnte TMV im Biotest nachgewiesen werden.

3.1.2 Pasteurisierung

Nachdem weder eine mesophile noch eine thermophile Temperatureinwirkung über eine Verweildauer von 21 Tagen in den untersuchten Anaerobanlagen zu einer Inaktivierung von TMV führte, wurden Versuche zur Pasteurisierung in einer Anlage im Labormaßstab durchgeführt. Die Versuchsvarianten differierten hinsichtlich der Zusammensetzung des verwendeten Pasteursubstrates, der Höhe der angelegten Temperatur und der Verweildauer in der Anlage (1 h, AP + 1 h) sowie hinsichtlich der verwendeten Keimträgertechnik und den damit verbundenen Unterschieden in der Qualität und in der Quantität der Einlegeproben. Einzelne Werte für eine einstündige Einbringung von TMV infiziertem Blattmaterial bei 70 °C sind in der Abb. 6 dargestellt.

Bei der Verwendung eines Substratgemisches aus 80 % Gülle und 20 % Speiseabfällen wurden Werte von 231* (57) und 343* (161) Läsionen ermittelt. Für denselben Versuchsdurchgang lagen die Zahlen für Einlegeproben aus TMV Suspensionen bei 180* (57) und 13* (8) Läsionen.

Die Positivkontrollen erzielten für diese Versuche einen Wert von 274* (70) für eine unverdünnte Suspension sowie Werte von 32* (7) und von 116* (44) Läsionen für eine 2 %ige Suspension.

Für ein Substratgemisch aus 75 % Gülle und 25 % Speiseabfällen konnten durchschnittliche Werte von 260 (84), von 207 (98) und von 255* (147) Läsionen ermittelt werden. Bei der Verwendung von jeweils 5 ml TMV Suspension als Einlegeprobe wurden Werte von 100 (37), von 50 (20) und von 30 (13) Läsionen gezählt. Bei einem Versuch mit der Standardmenge von 1 ml TMV Suspension als Einlegeprobe wurde dagegen nur ein Wert von 2* (2) Läsionen erzielt.

Eine 8 %ige Suspension als Positivkontrolle erzielte einen Mittelwert von 45 (32) und eine 2 %ige Suspension einen Wert von 40* (16) Läsionen.

Bei der Pasteurisierung mit Outputmaterial aus der Anaerobanlage im Modellmaßstab lagen die Läsionenzahlen auf einem ähnlichen Niveau. Es wurden Durchschnittswerte von 291 (138) und 272 (95) Läsionen erzielt. Auch die Nutzung alternativer Keimträger aus Miederware, mit jeweils 10 g TMV infiziertem Blattmaterial, erbrachte keine Verringerung der Infektiosität des Virus. Ein Mittelwert für eine solche Keimträgerprobe, aufgefüllt mit Gülle, lautet 333 (218) Läsionen (dargestellt als zweiter Plot in Abb. 6). Eine weitere Probe mit solch einem Keimträger, welcher nicht mit Gülle aufgefüllt wurde, ergab einen Durchschnittswert von 381 (193) Läsionen. Die Positivkontrolle "Kontrolle Gülle" (KG), also ein Extrakt aus 1 g Blattmaterial vermischt mit 15 ml Gülle, erzielte einen Wert von durchschnittlich 463 (240) Läsionen.

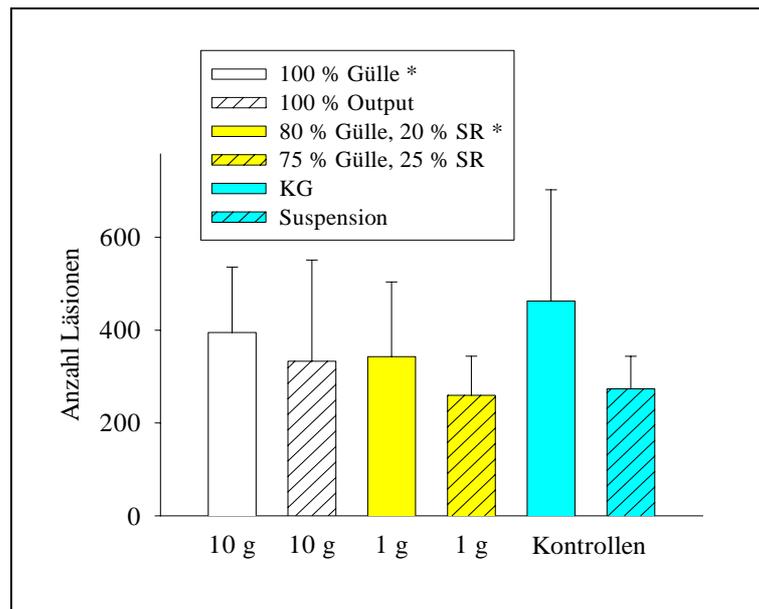


Abb. 6:

Pasteurisierung (1 h, 70 °C, verschiedene Pasteursubstrate): Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung) bei unterschiedlicher Quantität der Einlegeproben. Jede Säule ist identisch mit einer untersuchten Probe (ausgewählte repräsentative Werte). KG = "Kontrolle Gülle".

Einlegemengen im Umfang von 10 g TMV infiziertem Blattmaterial wurden auch mittels Keimträger aus Dialyseschlauchmaterial in den Pasteur eingebracht und bei einem Substrat aus 100 % Gülle pasteurisiert. Als Mittelwerte zweier Proben wurden 395* (141, dargestellt als erster Plot in Abb. 6) und 418* (170) Läsionen ermittelt. Dagegen konnte bei der Verwendung von 10 ml TMV Suspension im Dialyseschlauch nach der Behandlung fast kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen werden. Der Mittelwert betrug 2* (3) Läsionen.

Die Positivkontrolle einer 5 %igen Suspension des verwendeten Pflanzenpreßsaftes ergab dagegen durchschnittlich 243* (107) Läsionen.

Neben einer ausschließlichen Pasteurisierung bei einer Verweildauer von 60 Minuten wurden Einlegeproben analog zu den oben beschriebenen Versuchsvarianten auch zu Beginn der Aufheizphase (AP) eingebracht. Die dabei ermittelten Ergebnisse weichen nicht von den bisher dargestellten ab. Bei keiner Einlegeprobe mit Blattmaterial konnte eine Inaktivierung des Virus festgestellt werden. Als Beispiel sei eine Einlegeprobe mit 10 g Blattmaterial (Keimträger: Dialyseschlauchmaterial) genannt, welche in einem Substrat aus 100 % Outputmaterial pasteurisiert wurde. Der Mittelwert für die Anzahl der Läsionen lag hier bei 388* (147).

Unterschiedlicher fallen dagegen die Ergebnisse mit Einlegeproben aus TMV Suspensionen für diese Versuche aus. So wurden Mittelwerte von 2 (2), von 14* (13) bis hin zu 225* (88) Läsionen für Pasteurisierungen mit einem Gemisch aus Gülle und Speiseabfällen ermittelt.

Neben der Verwendung von Keimträgern wurde TMV infiziertes Pflanzenmaterial auch direkt zu Beginn der Pasteurisierung zusätzlich zu einem Pasteurgemisch aus 75 % Gülle und 25 % Speiseabfällen eingebracht. Nach einer bestimmten Verweilzeit in dem Pasteur und einer möglichen Nachlagerung in einem Faß, wurden Proben in Form von Blatt- und Sproßmaterial und zusätzlich noch Pasteursubstratproben zurückgewonnen. Ein erneut einsetzender Gärungsprozeß des in dem Faß aufbewahrten Pasteursubstrates konnte dabei innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden beobachtet werden.

Die Ergebnisse zu den Versuchsvarianten mit 400 g Blattmaterial (Versuch 1) und mit 3100 g Pflanzenmaterial (Versuch 2) sind in der Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt (Pasteurisierung bei 70 °C).

In den Blattproben des Versuches 1 konnte keine Inaktivierung von TMV nach einer Einbringung zu Beginn der Aufheizphase und einer anschließenden einstündigen Erhitzung bei 70 °C festgestellt werden. Dagegen wurde in den Substratproben, auch nach einer 7tägigen Nachlagerung im Faß, kein Virus nachgewiesen.

Auch bei dem zweiten Versuch waren die Blatt- und Sproßproben nach der Behandlung ohne Ausnahme infektiös. Der Nachweis von TMV in den Substratproben verlief dagegen unterschiedlich. Wurden in den Substratproben zunächst nur relativ geringe Werte von TMV im Biotest nachgewiesen, stieg die Anzahl der Läsionen, nach einer zusätzlichen Verweilzeit von 11 bzw. 14 Tagen im Faß, auf Werte von etwa 200 Läsionen an.

Tabelle 4:

Pasteurierungsanlage im Labormaßstab (70 °C): Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung) bei unterschiedlichen Verweilzeiten der Einlegeproben (direkte Einbringung von Pflanzenmaterial, Versuche 1 + 2).

Versuch	Verweilzeit	Art der Probe	Läsionen (STABW)
1	AP	Blatt Substrat	270* (131) 0 (0)
1	AP + 1 h	Blatt Substrat	139* (39) 0 (0)
1	AP + 1 h + 6 d	Substrat	0 (0)
1	AP + 1 h + 7 d	Substrat Substrat	0 (0) 0 (0)
2	AP + 1 h	Blatt Blatt Sproß Sproß Substrat	187 (58) 112 (27) 132 (48) 164 (64) 6 (2)
2	AP + 1 h + 1 d	Blatt Blatt Sproß Substrat Substrat	42 (13) 228 (49) 133 (54) 5 (3) 95 (45)
2	AP + 1 h + 4 d	Blatt Blatt Sproß Substrat Substrat	22* (14) 14* (8) 27* (10) 2* (2) 0* (0)
2	AP + 1 h + 6 d	Blatt Blatt Sproß Substrat Substrat	8* (14) 98* (83) 54* (42) 16* (13) 24* (21)
2	AP + 1 h + 11 d	Substrat Substrat Substrat	167 (80) 196 (85) 200 (77)
2	AP + 1 h + 14 d	Substrat Substrat Substrat	221 (83) 266 (96) 163 (55)

Verweilzeit: AP = Aufheizphase, 1 h = 1 h bei 70 °C, 1 d = 1 Tag zusätzliche Lagerung der Pasteurmatrix etc.

3.1.3 Kombination anaerobe Vergärung - Pasteurisierung

Nachdem weder mit einer anaeroben Vergärung noch mit einer Pasteurisierung eine Inaktivierung von TMV in den Einlegeproben erzielt werden konnte, wurde geprüft, ob die Kombination aus beiden Verfahren die Infektiosität des Virus herabsetzen kann (ausgewählte Ergebnisse dargestellt in Abb. 7).

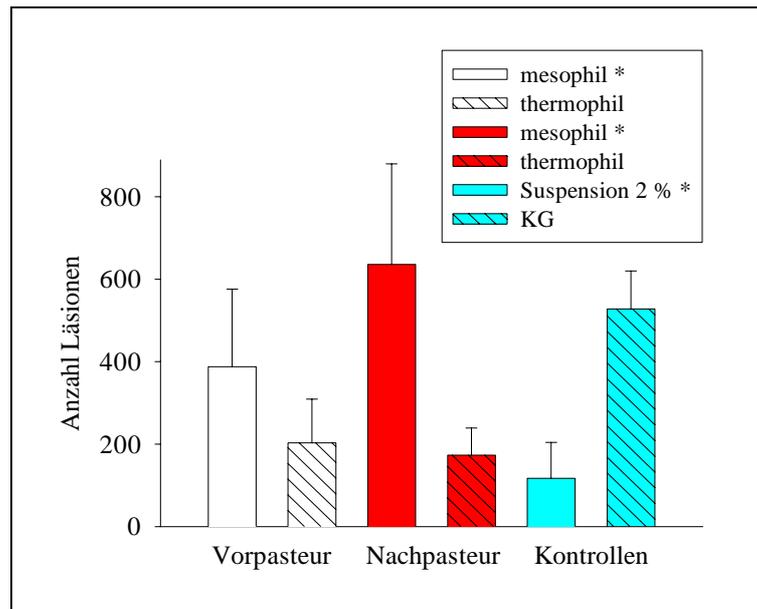


Abb. 7:

Kombination von anaerober Vergärung (21 d) mit Pasteurisierung (Vor- bzw. Nachbehandlung: 1 h, 70 °C): Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung). Jede Säule ist identisch mit einer untersuchten Probe (ausgewählte repräsentative Werte). KG = "Kontrolle Gülle".

Die Einlegeproben, welche sowohl bei einer mesophilen Prozeßführung (Substrat: Pasteursubstrat) als auch unter thermophilen Bedingungen (Substrat: 50 % Gülle, 50 % Bioabfälle) in die Anaerobanlage im Labormaßstab eingebracht wurden, waren zusätzlich einer Pasteurisierung (1 h, 70 °C) in Form einer Vor- oder einer Nacherhitzung ausgesetzt worden. Besprochen werden hier ausschließlich die Ergebnisse, bei denen die Einlegeproben über einen Verweilzeitraum von 21 Tagen in der Anaerobanlage im Labormaßstab verblieben.

Für die mesophile Betriebsführung der Anaerobanlage im Modellmaßstab konnten bei einer zusätzlichen Vorerhitzung (Pasteursubstrat: 75 % Gülle, 25 % Speiseabfälle) Werte von 388* (188, dargestellt als erster Plot in Abb. 7) und von 247* (144) Läsionen ermittelt werden. Bei Verwendung von TMV Suspensionen betragen die Mittelwerte dagegen nur 8* (12) und 2* (1) Läsionen.

Die Positivkontrolle aus einer 2 %igen Verdünnung der verwendeten Suspension ergab einen Durchschnittswert von 117* (87) Läsionen (dargestellt als erste Kontrolle in Abb. 7).

Ähnliche Werte wurden für die mesophile Betriebsführung der Anaerobanlage, verbunden mit einer Nacherhitzung (Pasteursubstrat: Output), ermittelt. Als Beispiele für die erzielte durchschnittliche Anzahl von Läsionen seien hier 636* (244, dargestellt als dritter Plot in

Abb. 7) und 747* (281) genannt. In zwei Einlegeproben mit TMV Suspensionen konnte nach einer Behandlung kein Virus mehr nachgewiesen werden.

Die auf 2 % verdünnte Suspension ergab als Positivkontrolle Werte von 156* (151) und von 40* (34) Läsionen.

Bei den Versuchsvarianten zur thermophilen Betriebsführung wurde die Pasteurisierung stets mit dem Outputsubstrat der Anaerobanlage vorgenommen. Bei der Vorpasteurisierung der Einlegeproben wurden zum Beispiel Werte von 90 (77) oder von 203 (106, dargestellt als zweiter Plot in Abb. 7) Läsionen ermittelt. Bei der alternativen Verwendung von 10 g TMV infiziertem Blattmaterial in Keimträgern aus Miederware betrug ein Wert 198 (157) Läsionen. Die Positivkontrolle "KG" erzielte einen Mittelwert von 463 (240) Läsionen (dargestellt als zweite Kontrolle in Abb. 7).

Die Ergebnisse zur Nacherhitzung der Einlegeproben fallen fast identisch aus. Es wurden Werte von 173 (66, dargestellt als vierter Plot in Abb. 7) oder von 163 (92) Läsionen ermittelt. Bei Verwendung von Proben mit 10 g Einlegematerial in Keimträgern aus Miederware betrug die Anzahl der Läsionen durchschnittlich 167 (45) und 191 (122). Die Positivkontrolle "KG" ergab für diese Untersuchungen einen Wert von 528 (92) Läsionen.

3.1.4 Thermische Inaktivierung

Zur Prüfung unter welchen thermischen Bedingungen es zur Inaktivierung von TMV kommen kann, wurden weitere Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturgradienten im Wasserbad und in der Pasteurisierungsanlage im Labormaßstab vorgenommen.

In der Abb. 8 wurden ausgewählte Ergebnisse für Versuchsvarianten mit Einlegeproben in Diffusionskeimträger nach RAPP (1995) und mit 10 g Proben in Keimträgern aus Miederware dargestellt.

Durch das Anlegen einer Temperatur von 55 °C wurde in Wasserbadversuchen zunächst eine thermophile Betriebsführung simuliert. Für eine Verweilzeit von 24 Stunden wurde ein Mittelwert von 210* (33) Läsionen für die Blattproben sowie von 219* (111) Läsionen für Einlegeproben mit einer TMV Suspension erzielt. Auch nach einer Verweilzeit von 48 h konnte keine Inaktivierung des Virus festgestellt werden. Die Mittelwerte für diesen Verweilzeitraum betragen analog zu den genannten Proben 320* (Schätzwert) und 192* (89) Läsionen.

Um den thermalen Inaktivierungspunkt des verwendeten TMV Stammes im Wasserbad zu bestimmen, wurde Probenmaterial über eine Verweilzeit von 10 Minuten bei Temperaturen von bis zu 90 °C eingebracht. Die Läsionenzahlen betragen für eine Behandlung bei 80 °C

253* (60), für 85 °C 270* (82) und für 90 °C 309* (64) für Proben mit jeweils 2 g Blattmaterial. Bei der Verwendung von TMV Suspensionen wurde bei 80 °C ein Mittelwert von 202* (110) und bei 90 °C ein Wert von 181* (100) ermittelt.

Die Positivkontrolle einer unverdünnten Suspension ergab einen Wert von 189* (82) Läsionen.

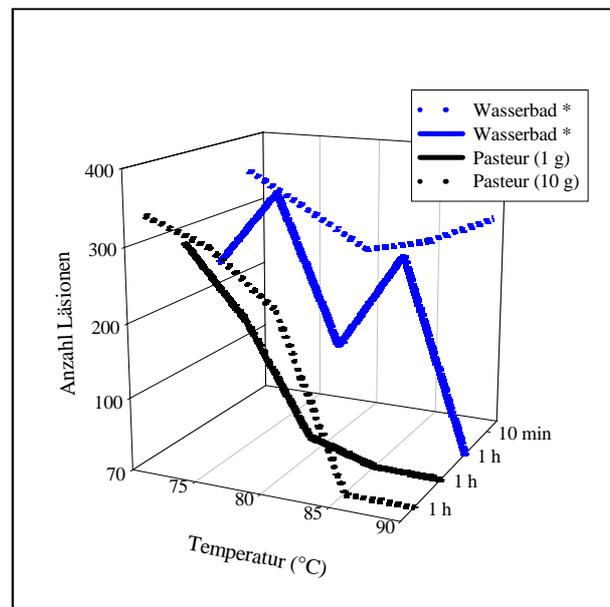


Abb. 8:

Wasserbad und Pasteurisierungsanlage: Behandlung von TMV Blattmaterial bei unterschiedlicher Temperatur und verschiedenen Verweilzeiten. Anzahl der Läsionen (teilweise idealisiert: Mittelwerte über verschiedene Proben gebildet).

Neben einer 10minütigen Einbringung wurden Proben auch über eine Verweilzeit von 60 Minuten höheren Temperaturen ausgesetzt. Die für diese Versuche erzielten Mittelwerte betragen für 75 °C 340* (23), für 80 °C 130* (Schätzwert) und für 85 °C 267* (Schätzwert) Läsionen. Bei Verwendung von TMV Suspensionen wurden dagegen für die gleichen Temperaturbereiche Werte von 21* (11), von 1* (1) und von 0* (0) Läsionen erzielt.

Bei Temperaturen von 90 °C wurden Proben zunächst für 30 Minuten ins Wasserbad eingebracht. Es konnte eine starke Reduktion der Infektiosität von TMV ermittelt werden. Der Mittelwert für die Anzahl der Läsionen lag bei 7* (4). Bei Verwendung einer TMV Suspension wurde eine vollständige Inaktivierung des Virus bereits nach 30 Minuten bei 90 °C erreicht. Die Behandlung der Proben bei einer Verweilzeit von 60 Minuten bei 90 °C erbrachte schließlich auch eine vollständige Inaktivierung der Einlegeproben mit Blattmaterial.

Die unverdünnte TMV Suspension ergab als Positivkontrolle einen Mittelwert von 703* (271) Läsionen. Verdünnungen dieser Suspension auf 10 % erzielten durchschnittlich 311* (138), auf 5 % 253* (136), auf 2 % 178* (124) und auf 1 % noch 62* (32) Läsionen.

Bei den Versuchen zur Pasteurisierung bei höheren Temperaturen wurden die Einlegeproben jeweils über eine Verweilzeit von 60 Minuten in die Anlage eingebracht. Das Pasteursubstrat bestand zu einem aus Outputsubstrat (Versuche zu 75 °, 85 °C, 90 °C) und zum anderen aus einem Gemisch aus 50 % Gülle und 50 % Bioabfall (80 °C, 85 °C).

Bei Temperaturen von 75 °C wurden Werte von 155 (43) und von 202 (67) Läsionen ermittelt.

Eine Positivkontrolle "KG" erbrachte für diesen Versuch einen Wert von 403 (239) Läsionen.

Bei einer Temperatureinwirkung von 80 °C reduzierte sich das Infektionspotential von TMV bereits auf Werte von 30 (11), 28 (16) oder 32 (10) Läsionen. Bei einer Probe konnte nur noch eine Läsion erzielt werden.

Die Positivkontrollen lagen für eine unverdünnte TMV Suspension bei 557 (212) und für eine 2 %ige Verdünnung dieser Suspension bei 109 (92) Läsionen.

Wurden die Proben bei einer Temperatur von 85 °C behandelt, konnte fast immer eine vollständige Reduktion des Infektionspotentials von TMV erreicht werden. Bei acht Proben, welche in einem Outputsubstrat pasteurisiert wurden, konnte kein Virus mehr im Biotest nachgewiesen werden.

Die Positivkontrolle "KG" ergab für diese Versuche Werte von 463 (240) und von 271 (111) Läsionen.

Bei einer Versuchsvariante, welche mit 50 % Gülle und 50 % Bioabfall als Pasteursubstrat durchgeführt wurde, war eine Probe vollständig inaktiviert worden. Bei zwei weiteren Proben konnten noch geringe Werte von 1 (1) und von 4 (3) Läsionen im Biotest erzielt werden.

Die Positivkontrollen entsprechen hier den Werten der Versuche bei 80 °C.

Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 90 °C erbrachte stets eine vollständige Inaktivierung des Virus.

Daß auch bei diesem Versuchsdurchgang infektiöses Blattmaterial verwendet wurde, bewies die Positivkontrolle "KG" mit einem Wert von 403 (239) Läsionen.

Bei Verwendung von größeren Mengen an Blattmaterial (10 g in Keimträgern aus Miederware) wurden für den Temperaturbereich von 80 °C mit Werten von 205 (112) und 228 (113) eine höhere Anzahl von Läsionen ermittelt, als bei den Versuchen mit den

Volumenkeimträgern. Die Keimträgern aus Miederware wurden für die Versuche bei 80 °C nicht mit Gülle aufgefüllt.

Bei der Pasteurisierung bei 85 °C mit einem Pasteursubstrat aus Outputmaterial konnte TMV in fünf Einlegeproben mit je 10 g Blattmaterial vollständig inaktiviert werden. Dabei waren vier der fünf verwendeten Keimträger aus Miederware mit Gülle aufgefüllt worden. Bei einer Versuchsvariante mit einem Pasteurgemisch aus 50 % Gülle und 50 % Bioabfällen konnte bei einer 5 g Einlegeprobe in einem Keimträger aus Miederware (nicht mit Gülle aufgefüllt) TMV nicht inaktiviert werden. Der Mittelwert für die Anzahl der Läsionen lag mit 1041 (29) relativ hoch.

Bei den Versuchen zur thermischen Inaktivierung von TMV bei 90 °C wurden die vier untersuchten Einlegeproben mit 10 g Blattmaterial vollständig inaktiviert. Bei dieser Versuchsvariante wurden 400 g TMV infiziertes Blattmaterial auch direkt in die Anlage gegeben und zusammen mit dem Outputsubstrat pasteurisiert. Bei zwei 1 g Blattproben, welche nach der Behandlung zurückgewonnen wurden, konnte TMV im Biotest nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Positivkontrollen entsprechen für diese Untersuchungen denen der Versuchsvarianten mit den Volumenkeimträgern.

3.1.5 Kontrollversuch

Bei einem Kontrollversuch wurde eine TMV Stammlösung mit einer Konzentration von 6 mg/ml gereinigtes Virus mittels Phosphatpuffer, Bidest und Outputsubstrat auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt und im Biotest untersucht (Abb. 9).

Die ermittelten Mittelwerte für die Anzahl der Läsionen betragen bei sofortiger Inokulation 308* (71), 357* (91) und 123* (32) für die jeweiligen Verdünnungen mit Puffer, Bidest und Output. Nach einer 24stündigen Aufbewahrung dieser Verdünnungen bei Zimmertemperatur wurden im Biotest durchschnittliche Werte von 389* (117), von 184* (49) und von 34 (3) Läsionen ermittelt. Eine Konzentration von 100 µg/ml gereinigtes Virus (Verdünnung mit Phosphatpuffer) erzielte durchschnittliche Läsionenzahlen von 248* (65) und von 134* (84) und eine ebenso als Kontrolle dienende unverdünnte TMV Suspension aus Pflanzenpreßsaft erbrachte einen Mittelwert von 276* (95) Läsionen.

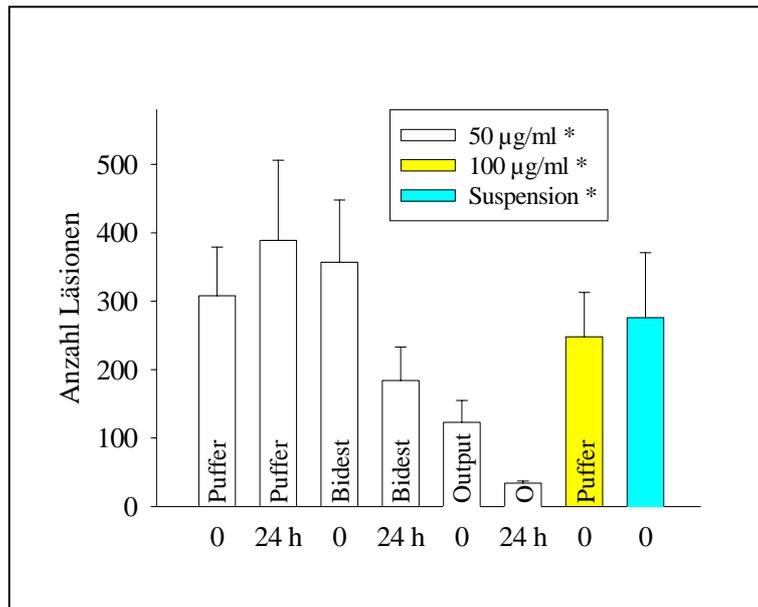


Abb. 9:

Kontrollversuch gereinigtes TMV: Anzahl der Läsionen (Mittelwert mit Standardabweichung) bei unterschiedlicher Art der Verdünnung (Puffer, Bidest, O = Output) sowie bei verschiedenen Inokulationszeitpunkten (0 = sofortige Inokulation, 24 h = Inokulation nach 24 Stunden).

3.2 *Plasmodiophora brassicae*

Die Ergebnisse zu den Hygienisierungsversuchen mit *P. brassicae* in den untersuchten Anlagen sind in der Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt.

Die Behandlung des Gallenmaterials in der Anaerobanlage im Labormaßstab erbrachte sowohl für eine mesophile Prozeßführung als auch unter thermophilen Bedingungen eine vollständige Inaktivierung des Pilzes nach einer Verweildauer der Einlegeproben von 21 Tagen. Unter thermophilen Bedingungen ist bereits eine Verweildauer von 24 Stunden, unabhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Gärsubstrates, zur vollständigen Inaktivierung des Pilzes ausreichend.

Der Mittelwert für den Befallsindex der Positivkontrollen lag bei 2,8 (STABW 0,22). Bei den Negativkontrollen konnten keine Infektionen festgestellt werden.

Tabelle 5: Ergebnisse zu den Hygienisierungsversuchen von *P. brassicae*.

Anlage	Substratkombination	Verweilzeit	N Proben	Index
Anaerobanlage (Labormaßstab) mesophil	75 % Gülle : 25 % SR	21 d	4	0
Anaerobanlage (Labormaßstab) thermophil	75 % Gülle : 25 % SR 50 % Gülle : 25 % SR : 25 % Bio 50 % Gülle : 50 % Bio	1 d 2 d 6 d 7 d 14 d 21 d	6 2 6 5 6 8	0 0 0 0 0 0
Praxisanlage II thermophil	Bioabfälle und biologische Gewerbeabfälle	7 d 20 d	9 (à 10 g) 9 (à 10 g)	0 0
Pasteur 70 °C	75 % Gülle : 25 % SR	1 h AP + 1 h	3 1	0 0
Wasserbad 55 °C		22 h 22 h 23 h 24 h	1 (7 g) 1 (10 g) 3 (à 14 g) 4 (à 14 g)	0 1 0,25 0,25

SR = Speiseabfälle, Bio = Bioabfälle, AP = Aufheizphase, Index = Befallsindex.

Die in der Anaerobanlage im Labormaßstab unter thermophilen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse konnten durch die Untersuchungen an der Praxisanlage II verifiziert werden. Bei allen Einlegeproben, welche nach 7 bzw. nach 21 Tagen Verweilzeit aus dem Fermenter 1 zurückgewonnen wurden, konnte im Biotest keine Infektiosität des Pilzes festgestellt werden. Der durchschnittliche Befallsindex der Kontrollen mit Gallenmaterial lag für diesen Versuch bei 2,8 (STABW 0,8). Die Kontrollen ohne Gallenmaterial waren dagegen alle negativ.

Auch eine Behandlung im Pasteur bei einer Verweilzeit von 60 Minuten und einer Temperatur von 70 °C führte zur vollständigen Inaktivierung von *P. brassicae*.

Der Mittelwert für den Befallsindex der Positivkontrollen lag für die Pasteurversuche bei 2,9 (STABW 0,1). Für die Negativkontrollen fand wiederum kein Nachweis des Pilzes im Biotest statt.

Eine Versuchsdurchführung im Wasserbad bei einer angelegten Temperatur von 55 °C bestätigte die in der Anaerobanlage im Labormaßstab unter thermophilen Bedingungen erzielten Ergebnisse. Eine Reduzierung des Infektionspotentials von *P. brassicae* wurde

bereits nach einer Verweilzeit von 22 Stunden erzielt. Der Befallsindex lag für eine Einlegetprobe (7 g Gallenmaterial) bei 0 und für eine weitere Einlegetprobe (10 g Gallenmaterial) bei 1,0 (STABW 1,7). Bei einer Verweilzeit von 23 bzw. von 24 Stunden im Wasserbad wurde für jeweils vier Einlegetproben ein durchschnittlicher Befallsindex von 0,25 (STABW 0,5) ermittelt.

Als Positivkontrollen wurde Gallenmaterial von jeweils 14 g im Biotest ausgebracht. Der Befallsindex lag für alle Positivkontrollen bei 3.

In Kontrollversuchen wurde das Infektionspotential von *P. brassicae* bei unterschiedlicher Qualität der verwendeten Gallen (frisch – gefroren, zerkleinert – unzerkleinert) sowie bei Verwendung unterschiedlicher Mengen geprüft (Abb. 10).

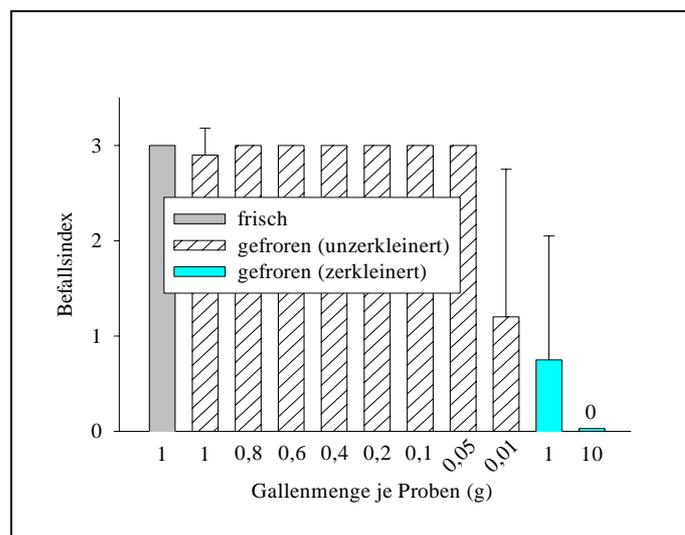


Abb. 10:

Infektionspotential von *P. brassicae* bei unterschiedlicher Qualität der Wurzelgallen und unterschiedlicher Inokulumdichte.

Sowohl frisches als auch unzerkleinertes gefrorenes Gallenmaterial zeigten im Biotest eine hohe Infektiosität. Die Verwendung von jeweils 1 g, 0,8 g, 0,4 g, 0,2 g und 0,05 g unzerkleineter gefrorener Gallen, erbrachte einen durchschnittlichen Befallsindex von 3, daß heißt alle Pflanzen wiesen im Biotest eine Pilzinfektion auf. Bei der Verwendung einer Gallenmenge von 0,01 g wurde ein Befallsindex von 1,2 (STABW 1,55) ermittelt. Niedriger lag der Befallsindex dagegen bei der Verwendung von zerkleinerten gefrorenen Wurzelgallen. Fünf Proben mit je 1 g dieser Qualität erbrachten im Biotest einen mittleren Befallsindex von 0,7 (STABW 1,3). Die Verwendung von zwei Proben zu je 10 g desselben Materials ergab gar keine Infektion.

3.3 Tomatensamen

Die Ergebnisse für die anaerobe Behandlung der Tomatensamen sind in der Abb. 11 für die untersuchten Anlagen zusammenfassend dargestellt.

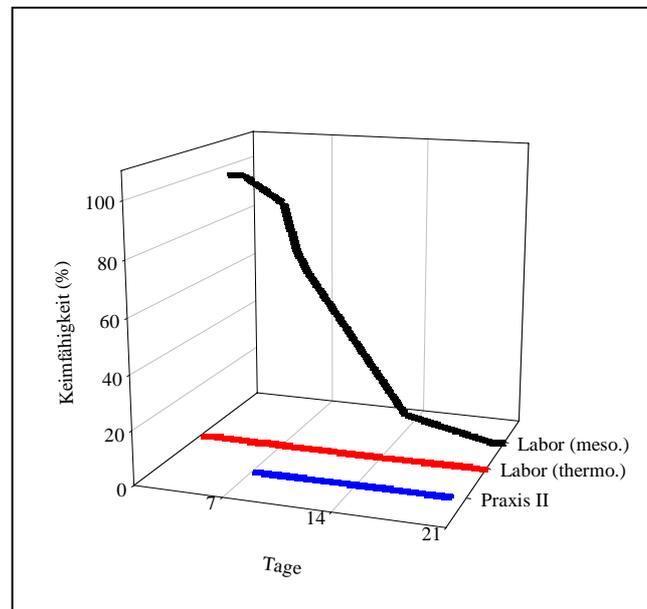


Abb. 11:

Keimungsraten von Tomatensamen nach unterschiedlichen Verweilzeiten der Einlegeproben in der Anaerobanlage im Labormaßstab (mesophil, thermophil) und in der Praxisanlage II (thermophil).

Einlegeproben mit Tomatensamen wurden wiederum zunächst unter mesophilen Bedingungen in die Anaerobanlage im Labormaßstab eingebracht. Es wurde überprüft, ob die mesophilen Bedingungen in dieser Vergärungsanlage ausreichen, um nicht pasteurisierte Proben mit Tomatensamen zu inaktivieren. Die Entnahme der Proben erfolgte nach 24 Stunden, nach 2, 5, 6 und 7 Tagen sowie nach einer Verweildauer von 14 und 21 Tagen in der Anaerobanlage. Eine Verweildauer von 24 Stunden in der Anaerobanlage im Labormaßstab unter mesophilen Bedingungen erbrachte noch keine Inaktivierung der Tomatensamen (Keimungsrate 96 %). Nach einer Verweilzeit von 7 Tagen lag die Keimungsrate bei 59 % und nach 14 Tagen keimten noch 7 % der Tomatensamen. Nach einer Verweildauer von 21 Tagen unter mesophilen Bedingungen fand schließlich keine Keimung der Samen mehr statt.

Als Mittelwert für die Kontrollen wurde eine Keimungsrate von 95 % (STABW 2,4) ermittelt.

Bei Einbringung der Einlegeproben in die Anaerobanlage im Modellmaßstab unter thermophilen Bedingungen fand eine vollständige Hemmung der Keimfähigkeit der Tomatensamen bereits nach einer Verweilzeit von 24 Stunden statt. Die Ergebnisse aus der Anaerobanlage im Modellmaßstab wurden durch die in der Praxisanlage II erzielten Resultate

bestätigt. Dort waren die Proben mit Tomatensamen, welche nach einer Verweilzeit von 7 Tagen aus der Anaerobanlage unter thermophilen Bedingungen entnommen wurden, vollständig inaktiviert.

Die durchschnittliche Keimungsrate der Positivkontrollen lag für diese Versuche bei 98 % (STABW 1,6).

Eine einstündige Pasteurisierung der Einlegeproben bei 70 °C erbrachte immer eine vollständige Inaktivierung der Tomatensamen. Diese Inaktivierung wurde bereits erreicht, wenn die Proben mit Tomatensamen lediglich während des Zeitraumes der Aufheizphase des Pasteursubstrates von Zimmertemperatur auf 70 °C (etwa 235 Minuten, siehe Abb. 4) eingebracht wurden.

Der Mittelwert der Keimungsraten für die Positivkontrollen der Tomatensamen betrug für die Pasteurversuche 97 % (STABW 4,9).

Zusätzlich wurde noch in zwei Versuchen die Inaktivierung der Tomatensamen bei einer Kombination der Behandlung aus Pasteurisierung (1 h, 70 °C) und Einbringung in die Anaerobanlage im Labormaßstab unter mesophilen Bedingungen geprüft. Nach Pasteurisierung und anschließender Verweilzeit von 20 bzw. 41 Tagen in der Anaerobanlage waren alle Tomatensamen vollständig inaktiviert worden.

Die Keimungsrate der Positivkontrollen lag für diese Versuche bei durchschnittlich 98 % (STABW 1,6).

In Wasserbadversuchen wurde geprüft, ob die ermittelte relativ geringe Thermoresistenz von Tomatensamen bei feuchter Hitze, verifiziert werden kann. Die Behandlung der Tomatensamen im Wasserbad bei 55 °C (Zeitreihen) zeigte eine beginnende Reduzierung der Anzahl gekeimter Samen nach einer Verweilzeit von 40 Minuten (Abb. 12).

Nach einer Behandlungszeit von 60 Minuten lag die durchschnittliche Keimungsrate der Tomatensamen noch bei 40 % (STABW 27,2). Nach weiteren 5 Minuten sank die Keimfähigkeit auf etwa 10 % und nach etwa 75 Minuten wurde der in der BIOABFV (1998) genannte Grenzwert von 2 % erreicht. Nach 90minütiger Verweilzeit im Wasserbad bei 55 °C wurden schließlich alle Tomatensamen vollständig inaktiviert.

Der Mittelwert der Keimungsrate für die Positivkontrolle betrug für diese Versuche 93 % (STABW 4,4).

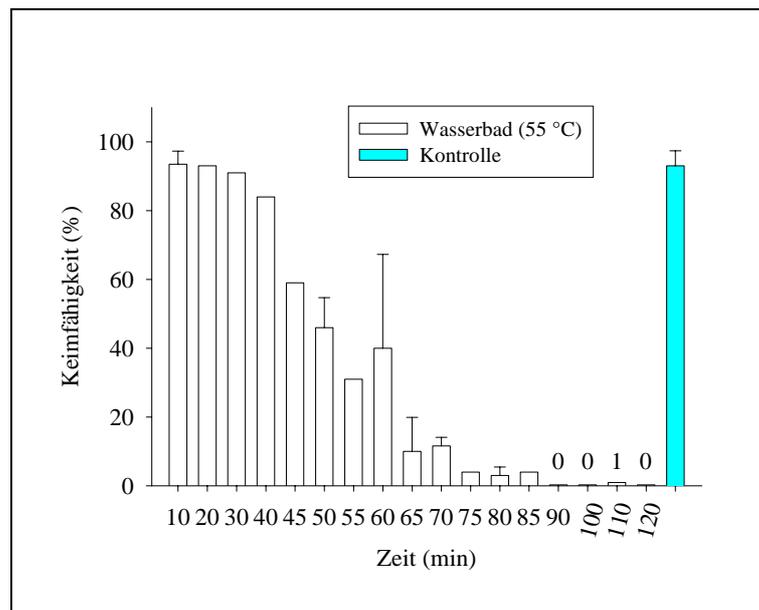


Abb. 12:

Keimungsraten von Tomatensamen nach unterschiedlichen Verweilzeiten der Einlegeproben im Wasserbad (55 °C).

Zur Bestimmung des thermalen Inaktivierungspunktes von Tomatensamen im Wasserbad wurde Probenmaterial über eine Verweildauer von 10 Minuten verschieden hohen Temperaturen ausgesetzt (Abb. 13). Bei Temperaturen von über 60 °C konnte eine zunehmende Inaktivierung der Samen festgestellt werden. Während nach einer Behandlung bei einer Temperatur von 62 °C noch eine Keimungsrate von 86 % ermittelt wurde, sank diese bei Erhöhung um weitere zwei Grad drastisch auf 24 % ab. Ab einer Temperatur von 65 °C wurde der in der BIOABFV (1998) genannte Grenzwert von 2 % erreicht (STABW 4,9). Eine vollständige Hemmung der Keimfähigkeit der Samen wurde bei einer Temperatureinwirkung von 67 °C nach einer Verweilzeit von 10 Minuten im Wasserbad erzielt.

Der Mittelwert für die Keimfähigkeit der ausgelegten Positivkontrollen lag für diese Versuche bei 95 % (STABW 4,3).

In weiteren Versuchen mit dem Wasserbad wurden die Temperaturbedingungen bei einer Pasteurisierung simuliert. Die Einlegeproben mit Tomatensamen wurden dabei über eine Verweilzeit von 60 Minuten Temperaturen von 70 °C und von 80 °C ausgesetzt. Alle Proben dieser Versuche wurden vollständig inaktiviert.

Die Positivkontrollen hatten eine durchschnittliche Keimungsrate von 96 %.

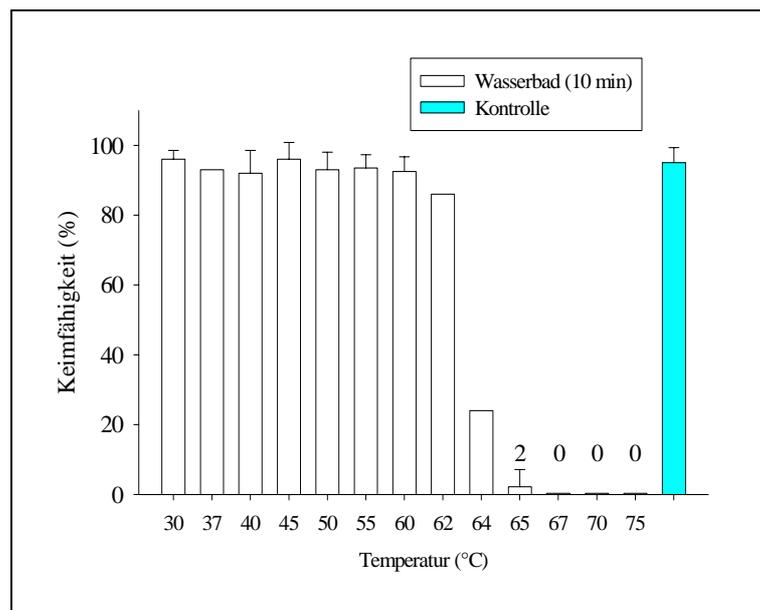


Abb. 13:

Keimungsraten von Tomatensamen bei unterschiedlich hohen Temperaturen nach Verweilzeiten von jeweils 10 Minuten der Einlegeproben im Wasserbad.

Neben den Untersuchungen zu Tomatensamen im Wasserbad liegen Ergebnisse solcher Versuche auch zu Samen verschiedener Unkrautarten vor. Das Verhalten von Unkrautsamen bei Simulation von mesophilen (37 °C) bzw. von thermophilen Bedingungen (55 °C) im Wasserbad ist für die Arten Acker-Hundskamille (*Anthemis arvensis*) und Floh-Knöterich (*Polygonum persicaria*) in der Abb. 14 und für die Arten Stumpfblättriger Ampfer (*Rumex obtusifolius*), Geruchlose Kamille (*Matricaria maritima*) und Flughafer (*Avena fatua*) in der Abb. 15 dargestellt (zwei Abbildungen für eine Versuchsvariante).

Für den mesophilen Temperaturbereich bei 37 °C konnte nach einer Verweilzeit von bis zu 28 Stunden keine oder nur eine geringe Abnahme der Keimfähigkeit für alle Arten festgestellt werden. Der Mittelwert für die Keimungsrate von Tomatensamen lag nach einer Verweilzeit von 28 Stunden bei 85 % (STABW 12,2). Die relativ geringen Keimungsraten von Unkrautarten wie *A. fatua* oder *P. persicaria*, sind im Zusammenhang mit den allgemein geringen Keimungsarten der Positivkontrollen dieser Arten zu betrachten (siehe Abb. 17).

Bei Simulation von thermophilen Bedingungen im Wasserbad kam es innerhalb einer Verweilzeit von 60 Minuten zu einer starken Inaktivierung der Keimfähigkeit der Mehrzahl der untersuchten Unkrautarten. Bei *P. persicaria*, *M. maritima* und *A. fatua* lag die Keimungsrate nach 60 Minuten jeweils bei 5 % und nach 120 Minuten waren die Samen dieser Arten vollständig inaktiviert. Die Samen der Art *A. arvensis* waren bereits nach einer

Verweilzeit von 60 Minuten nicht mehr keimfähig. Lediglich Samen von *R. obtusifolius* wiesen eine höhere Tenazität gegenüber feuchter Hitze auf. Nach einer Behandlungszeit von 60 Minuten keimten noch 65 % und nach 120 Minuten noch 50 % der Samen. Erst nach einer Verweilzeit von 180 Minuten wurden die Samen auch dieser Art vollständig inaktiviert.

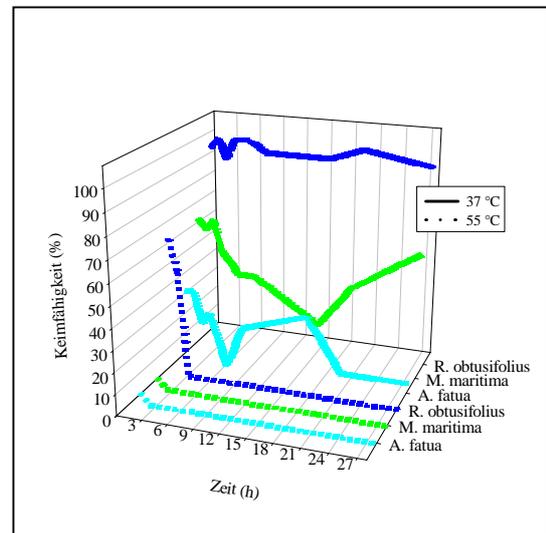
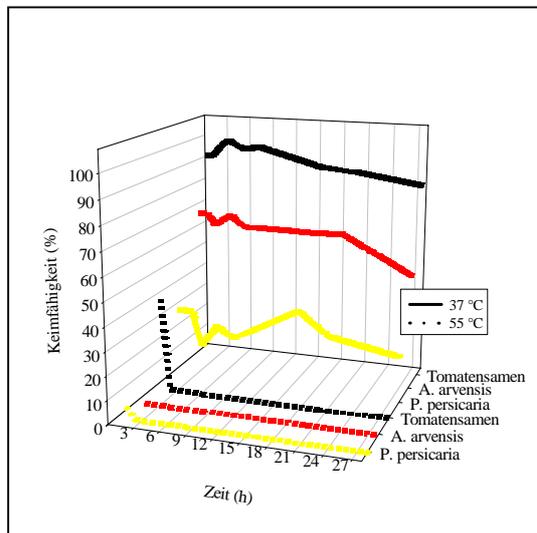


Abb. 14 und Abb. 15 (eine Versuchsvariante):

Keimungsraten von Tomatensamen und von Unkrautsamen nach unterschiedlichen Verweilzeiten der Einlegeproben im Wasserbad (37 °C, 55 °C).

Zur Bestimmung des thermalen Inaktivierungspunktes der untersuchten Unkrautsamen im Wasserbad wurden die Proben über eine Verweildauer von jeweils 10 Minuten Temperaturen von 30 °C bis 70 °C ausgesetzt (Abb. 16). Der thermische Inaktivierungspunkt der Tomatensamen lag auch hier bei etwa 65 °C (siehe auch Abb. 13). Ähnlich verhielten sich die Samen von *P. persicaria*, von denen nach einer Behandlung in diesem Temperaturbereich noch 5 % keimten. Bei *A. arvensis* und *M. maritima* wurden die Samen bereits nach einer Behandlung bei 60 °C vollständig inaktiviert. Eine höhere Thermoresistenz wiesen die Samen von *R. obtusifolius* und *A. fatua* auf. Nach einer Behandlung bei 65 °C keimten noch 80 % der Samen von *R. obtusifolius* und 50 % der Samen von *A. fatua*. Bei einer Behandlung bei 70 °C wurden die Samen von *R. obtusifolius* vollständig inaktiviert, der Mittelwert für die Keimungsrate von *A. fatua* betrug dagegen noch 15 % (STABW 14,1).

Eine kurzzeitige Behandlung der Samen verschiedener Unkräuter bei Temperaturen zwischen 40 °C und 50 °C, schien sich teilweise positiv auf die allgemeine Keimfähigkeit der Samen auszuwirken. So wiesen Samen der Unkräuter *A. arvensis*, *A. fatua* und *P. persicaria* nach einer Verweildauer von 10 Minuten bei 45 °C und Samen der Art *M. maritima* bei 50 °C im Vergleich zu den Positivkontrollen die höchsten Keimungsraten auf.

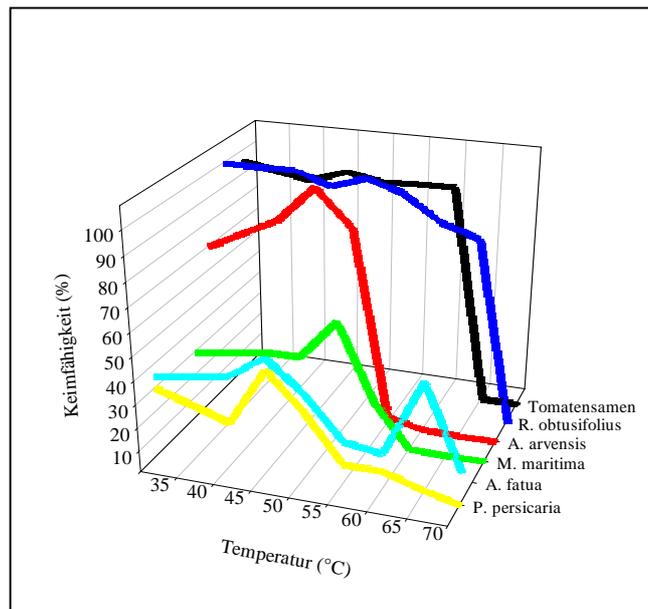


Abb. 16:
 Durchschnittliche Keimungsraten von Tomatensamen und von Unkrautsamen (MW bei 50 °C, 60 °C, 70 °C) bei unterschiedlich hohen Temperaturen nach einer Verweilzeit von jeweils 10 Minuten der Einlegetuben im Wasserbad.

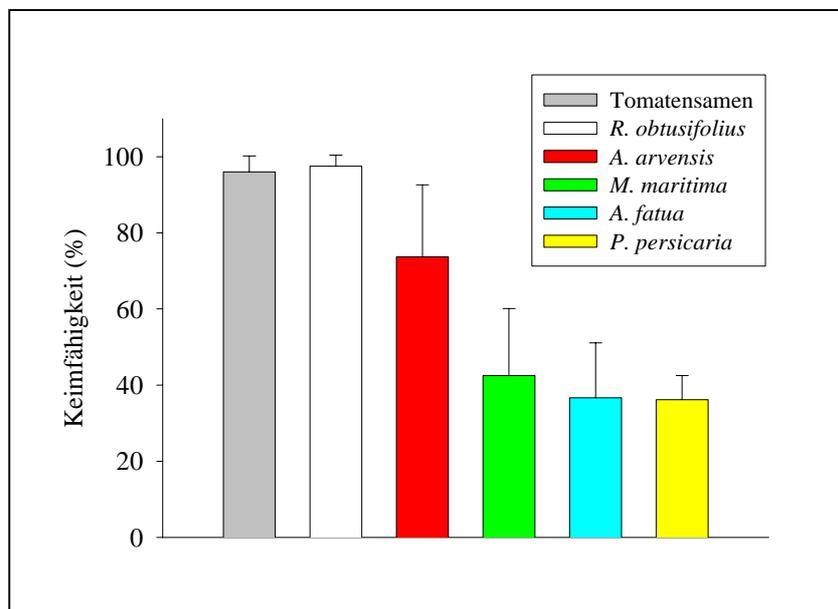


Abb. 17:
 Durchschnittliche Keimungsraten der Positivkontrollen von Tomatensamen und von Unkrautsamen.

Die ermittelten Keimungsraten der Positivkontrollen fielen für die untersuchten Arten relativ unterschiedlich aus (Abb. 17).

Ähnlich hohe Werte wie für die Tomatensamen mit 96 % (STABW 4,2) wurden nur noch für *R. obtusifolius* mit 97,5 % (STABW 2,9) erzielt. Relativ hohe Keimungsraten wiesen auch Samen der Art *A. arvensis* mit 74 % (STABW 18,9) auf. Weniger als die Hälfte der ausgelegten Samen keimten bei den Kontrollen für die Arten *M. maritima* (42,5 %, STABW 17,6), *A. fatua* (37 %, STABW 14,4) und *P. persicaria* (36 %, STABW 6,3).

3.4 Anaerobanlage im Labormaßstab (Meßparameter)

Tabelle 6: Mittelwerte einzelner Meßparameter der Anaerobanlage im Labormaßstab.

Betriebs-Nr.	Temperatur °C	pH-Wert	Redox-potential mV	Methan-gehalt Vol.-%	Biogasausbeute		Bemerkungen
					m ³ /d	l/l RV x d	
1	33,1	7,56	- 591	60,8	0,45	1,12	
2	33,0	7,51	- 589	[68,4]	0,42	1,05	
3	33,0	7,71	- 593	[81,8]	0,22	0,55	
4	32,9*	7,50*	- 531*	[73,1]*	0,22	0,54	
5	*	*	*	* [56-58]	-	-	Ausfall Gaszähluhr
6	*	*	*	*	0,40	1,00	28 d: Ausfall Redoxpotential-Meter
7	33,2	7,57	- 520	59,0	0,51	1,28	
8	33,4	7,64	- 463	58,7	0,45	1,13	
9	33,2	7,48	- 501	59,8	0,37	0,94	
10	33,5	7,73	-	61,1	0,69	1,73	16 d: Ausfall Redoxpotential-Meter
2/4/5/ 6/8/10	33,1	7,57	- 512	66,5	0,44**	1,10**	MW mesophil gesamt (25 % Speisereste)
3/7/9	33,2	7,52	- 515	61,7	0,39	0,99	MM mesophil gesamt (100 % Pasteur)
11	48,3	7,93	- 545	66,5	0,58	1,45	
12	55,1	7,54	- 517	62,5	0,54	1,34	
13	54,3	7,56	- 433	[75,6]	-	-	kein stabiler Reaktorbetrieb
14	54,6	7,65	- 526	63,0	0,50	1,25	
15	54,8	7,78	- 507	[69,0]	0,48	1,20	
16	-	-	-	-	-	-	Ausfall der Anlage
17	53,5	7,71	- 554	64,6	0,52	1,29	
18	53,8	7,82	- 613	60,3	0,54	1,34	5 d: Gaszähluhr unterbrochen
19	54,8	8,00	- 599	60,7	0,61	1,53	
18/19	54,3	7,92	- 605	60,6	0,57	1,44	MW thermophil gesamt (50 % Bioabfall)

* Mittelwerte aus den Nummern 4 - 6. ** ohne Betriebsnummer 5. RV = Raumvolumen.

In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse für die wichtigsten Meßparameter der Anaerobanlage im Labormaßstab zusammenfassend dargestellt. Die Betriebsnummern geben die Art der Betriebsführung, wie in Tabelle 1 angegeben, wieder. Der unter der Betriebsnummer 5 angegebene Methangehalt von 56 bis 58 Vol.-% resultiert aus einer speziellen Messung Anfang Oktober 1999 mit einem Gasanalysegerät (Siemens Ultramat 22). Der CO₂ Gehalt im Biogas wurde zu diesem Zeitpunkt mit 37,5 Vol.-% bestimmt. Die in Klammern angegebenen Werte für den Methangehalt sind fraglich. Vermutlich resultieren die dort vermerkten hohen Werte aus Störungen des Meßgerätes.

4. Diskussion

4.1 Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

Als besonders problematisch stellte sich bei den durchgeführten Untersuchungen die Eliminierung oder Inaktivierung von TMV in den Einlegeproben aus Blattmaterial dar.

Für den mesophilen Temperaturbereich konnten nur Untersuchungen an einer Anaerobanlage im Labormaßstab durchgeführt werden. Nach einer Verweilzeit der Einlegeproben von 21 Tagen wurde unter Verwendung jeweils zweier verschiedener Gärsubstrate keine Abnahme der Infektiosität von TMV festgestellt. Die im Nachweisverfahren an den Testpflanzen ausgezählte Anzahl von Läsionen lag jeweils im dreistelligen Bereich. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Untersuchungen von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) an einer mesophilen Anaerobanlage unter Praxisbedingungen. Allerdings wird von den Autoren lediglich ein Wert von 185 Läsionen (Kontrolle: 210) für eine einwöchige mesophile Vergärung genannt.

Auch bei einer thermophilen Prozeßführung konnte bei den hier vorgestellten Untersuchungen keine Inaktivierung des Virus festgestellt werden. Bei einer kurzzeitigen Einbringung der Proben über 24 Stunden wurden Mittelwerte von über 500 Läsionen für jede Einlegeprobe ermittelt. Die Ergebnisse wurden durch Versuche mit dem Wasserbad bestätigt, bei denen durch das Anlegen einer Temperatur von 55 °C thermophile Verhältnisse simuliert wurden. Nach Verweilzeiten von 24 und von 48 Stunden wurden ebenfalls Werte im dreistelligen Bereich ermittelt.

In die Anaerobanlage im Labormaßstab wurden während der thermophilen Prozeßführung Einlegeproben unter Verwendung von drei verschiedenen Gärsubstraten eingebracht. Bei einem Inputmaterial aus 75 % Gülle und 25 % Speiseresten lagen die Werte für Verweilzeiten von 14 bzw. 21 Tagen bei jeweils etwa 50 Läsionen. Bei den Substratkombinationen mit einem Volumenanteil des Bioabfalls von 25 % bzw. von 50 % lag die Anzahl der Läsionen auch nach einer 21tägigen Verweilzeit stets im dreistelligen Bereich.

Die an der halbtechnischen Anaerobanlage im Labormaßstab gewonnenen Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an zwei thermophilen Vergärungsanlagen unter Praxisbedingungen bestätigt. Für die Praxisanlage I wurde keine Abnahme der Infektiosität über die jeweiligen Verweilzeiträumen von 7, 14 und 21 Tagen gefunden. Die Anzahl der Läsionen ergab jeweils Werte um 70. Für die Praxisanlage II wurden dagegen Werte von etwa 200 bis 400 Läsionen erzielt und dies unabhängig von den verwendeten Einlegemengen (1 g oder 10 g).

Die relativ großen Unterschiede zwischen den Läsionenwerten der Praxisanlagen I und II weisen scheinbar auf eine stärkere Reduktion des Infektionspotentials von TMV in der Anlage I hin. Daß dies nicht der Fall ist, kann zweifach belegt werden. Zum einen zeigen die konstanten Werte für die jeweiligen Verweilzeiten von 7, 14 und 21 Tagen, daß es zu keiner Reduktion des Virus innerhalb der letzten 14 Tage in der Anlage I kam. Zum anderen müssen für jeden Versuch die im Biotest ermittelten Werte für die behandelten Einlegeproben im Vergleich zu den unbehandelten Positivkontrollen jeweils für sich betrachtet werden. So erzielte eine 2 %ige Suspension des verwendeten TMV infizierten Blattmaterials als Kontrolle der Versuche in der Praxisanlage II einen durchschnittlichen Wert von 184 Läsionen, für die Praxisanlage I betrug dieser Wert dagegen nur 62. Beide Kontrollen lagen damit jeweils im Bereich der für die entsprechenden Anlagen ermittelten Werte für die behandelten Proben.

Die an den drei untersuchten thermophilen Vergärungsanlagen erzielten Ergebnisse zu TMV stehen im Widerspruch zu den Resultaten von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999), welche für eine thermophile Anaerobanlage unter Praxisbedingungen eine deutliche Reduktion des Infektionspotentials des Virus fanden. Die ermittelte Anzahl von 6 Läsionen lag für eine 21tägige thermophile Vergärung noch unterhalb des in der BIOABFV (1998) genannten Grenzwertes von ≤ 8 Läsionen. Eine völlige Inaktivierung des Virus wurde dennoch nicht erreicht.

Bei einer aeroben Kompostierung von Bioabfällen wird TMV in der Regel unter thermophilen Bedingungen sicher inaktiviert. HERRMANN et al. (1994) erreichten eine Hygienisierung des Virus bei Temperaturen von 55 °C bis 65 °C bei entsprechenden Verweilzeiten von 12 bis 21 Tagen in der Rotte. Das Virus wurde ebenso bei einer Temperatur von 65 °C über mehrere Stunden bzw. bei 70 °C nach über 30 Minuten inaktiviert. Bei Testkompostierungen von SCHÜLER et al. (1996, in HOPPENHEIDT et al. 1997) wurde eine Restinfektiosität von < 3 % erreicht, wenn die Einlegeproben nach 35 Tagen bei Temperaturen von 55 °C und 60 °C der Rotte entnommen wurden.

Viren sind bei feuchter Wärme relativ "labil", daß heißt die für die Infektiosität maßgeblichen Proteine der meisten Viren werden bei 55 °C bis 70 °C inaktiviert (HOPPENHEIDT et al. 1997). Diese Aussage sollte dafür sprechen, daß TMV bei einer einstündigen Hitzebehandlung bei 70 °C inaktiviert werden kann. Die dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch, daß dies nicht der Fall ist. Bei Verwendung von vier verschiedenen Substratkombinationen wurde niemals eine Inaktivierung von TMV in den Einlegeproben mit Blattmaterial gefunden. Eine Einbringung von Einlegeproben zu Beginn der Aufheizphase eines Pasteurversuches bedeutet zusätzlich eine mindestens einstündige Verweilzeit im Pasteur bei Temperaturen von über 60 °C (siehe

Abb. 4). Doch auch die Berücksichtigung der Aufheizphase bei einzelnen Versuchsvarianten führte zu keiner Hemmung der Infektiosität des Virus.

Diese hohe Thermotoleranz des Virus konnte für eine Untersuchung in einer Pasteurisierungsstufe unter Praxisbedingungen auch von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) ermittelt werden. Eine einstündige Pasteurisierung bei 70 °C war auch in der von diesen Autoren untersuchten Anlage nicht ausreichend, um die Infektionsfähigkeit des Erregers zu eliminieren. Für die Anzahl der Läsionen wurde ein Wert von 131 ermittelt. Von SCHÜLER et al. (1996, in HOPPENHEIDT et al. 1997) liegen Untersuchungen vor, bei denen eine Wärmebehandlung TMV infizierter Tabakblätter über 21 Tagen bei Temperaturen von etwa 60 °C nicht ausreichte, um das Virus zu inaktivieren. Wurde das Virus Temperaturen von 70 °C ausgesetzt, so blieb eine schwächer ausgeprägte Virulenz auch nach 21tägiger Behandlung erhalten.

In den hier dargestellten Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß auch eine Kombination aus Vorerhitzung der Proben und anschließender Vergärung nicht ausreicht, um TMV zu inaktivieren. Dies gilt für sowohl für eine mesophile als auch für eine thermophile Nachvergärung über eine maximale Verweilzeit von 21 Tagen in der Anaerobanlage.

Nach einer Verweilzeit von 21 Tagen in einer thermophilen Anaerobanlage ist es vorstellbar, daß das eingebrachte Blattmaterial derartig destrukturiert ist, daß bei einer anschließenden Nacherhitzung der Angriffspunkt an das Virus verbessert wird. Doch auch die Versuche mit einer einstündigen Nachpasteurisierung bei 70 °C führten zu keiner Abnahme der Infektiosität des Virus. Die Anzahl der Läsionen lag wiederum jeweils im dreistelligen Bereich.

In weiteren Versuchen mit dem Wasserbad und der Pasteurisierungsanlage konnte die hohe Thermotoleranz des Virus bei feuchter Hitze verifiziert werden. Eine 10minütige Einwirkzeit einer Temperatur von 90 °C war nicht ausreichend, um das Virus im Wasserbad zu inaktivieren. Erst längere Verweilzeiten von Einlegeproben bei 90 °C führten zur Herabsetzung des Infektionspotentials. Nach einer 30minütigen Behandlung konnte zum Beispiel noch eine Anzahl von 7 Läsionen ermittelt werden.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den bei HERRMANN et al. (1994) publizierten Resultaten von BROADBENT et al. (1965), welche eine thermische Inaktivierung von TMV im feuchten Pflanzenmaterial nach einer Verweilzeit von 10 bis 20 Minuten bei 90 °C erreichten.

Die Ergebnisse für die Versuche mit dem Wasserbad und mit dem Pasteur differieren für eine einstündige Einwirkzeit bei den Temperaturwerten von 80 °C und von 85 °C. Bei den Wasserbadversuchen konnte bei beiden Temperaturbereichen noch keine Abnahme des

Infektionspotentials des Virus festgestellt werden. Die im Biotest ermittelte Anzahl der Läsionen bewegte sich jeweils im dreistelligen Bereich.

Dagegen konnten bei einer einstündigen Pasteurisierung bei einer Temperatur von 80 °C in einem Versuch nur Werte von jeweils 32, 30 und 28 Läsionen erzielt werden. Eine weitere Probe war fast vollständig inaktiviert worden. Wurden dagegen größere Blattmengen zu 10 g mit Hilfe von Keimträgern aus Miederware eingebracht, lagen die Werte mit etwa 200 Läsionen wieder im dreistelligen Bereich. Diese Beutel waren jedoch bei diesen Versuchen nicht mit Gülle aufgefüllt worden.

Bei der einstündigen Pasteurisierung bei 85 °C wurde das Virus in dreizehn Proben vollständig inaktiviert. Darunter auch in vier Proben mit 10 g Einlegematerial in Keimträger aus Miederware, wovon ein Beutel nicht mit Gülle aufgefüllt worden war. Zwei weitere Proben wurden fast vollständig inaktiviert. Die im Biotest erzielten Werte bewegten sich für diese Proben unterhalb des Richtwertes der BIOABFV (1998) von ≤ 8 Läsionen. Nur in einer Einlegeprobe mit 5 g Blattmaterial in einem Keimträgerbeutel aus Miederware konnte keine Inaktivierung des Virus festgestellt werden. Dieser Beutel war wiederum nicht mit Gärsubstrat aufgefüllt worden.

Bei einer einstündigen Behandlung bei einer Temperatur von 90 °C gleichen sich die Ergebnisse der Wasserbad- und Pasteurversuche wieder an. Alle Proben wurden vollständig inaktiviert.

Die Thermoresistenz von TMV ist im getrockneten Pflanzenmaterial höher. SCHMELZER & SCHMIDT (1977, in HERRMANN et al. 1994) inaktivierten TMV im getrockneten Pflanzenmaterial erst nach einer kurzzeitigen Temperaturbehandlung bei 150 °C. Ebenfalls bei 150 °C und einer Einwirkzeit von 10 Minuten erreichten BODE & KLINKOWSKI (1968, in HERRMANN et al. 1994) eine Inaktivierung des Virus.

Der Vergleich der Versuche mit dem Wasserbad und der Pasteurisierungsanlage verdeutlicht, daß die Temperatur nicht das einzige Kriterium für eine erfolgreiche Inaktivierung von TMV sein kann. Vielmehr scheint auch das umgebende Milieu, mit seinen speziellen biochemischen Eigenschaften, eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des Virus zu spielen. Deshalb stellt sich die Frage, warum in den Untersuchungen das Virus nicht unter den Bedingungen einer anaeroben Vergärung eliminiert werden konnte. Zur Beantwortung dieser Frage kann zum Beispiel eine Betrachtung der verwendeten Keimträgertechnik mit den entsprechenden Quantitäten und Qualitäten der Einlegeproben herangezogen werden.

Das Tabak-Mosaik-Virus findet in unzerstörten Blattstrukturen anscheinend genügend Schutz, um auch nach einer Behandlung bei hohen Temperaturen aktiv zu bleiben. Wird das

Virus dagegen durch Homogenisierung von infizierten Tabakblättern in Suspension gebracht, scheint es leichter angreifbar zu sein. Ein Kontrollversuch mit gereinigtem TMV lieferte Hinweise dafür, daß der Kontakt des ungeschützten Virus mit einem noch relativ aggressivem Substrat wie Output bereits zur Senkung des Infektionspotentials führen kann. Wurde eine Stammlösung mit einer Virus Konzentration von 6 mg/ml mit Puffer, Wasser (Bidest) und Outputsubstrat auf eine Konzentration von jeweils 50 µg/ml verdünnt und anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert, so sank die Anzahl der im Nachweisverfahren erzielten Werte für die genannten Proben von 389 über 184 auf 34 Läsionen.

Die Versuche zu Einlegeproben mit TMV Suspensionen fallen jedoch sehr unterschiedlich aus. Bei zwei Proben, welche 21 Tage in der Anaerobanlage unter mesophilen Bedingungen verblieben, wurde TMV fast vollständig inaktiviert. Jeweils nur eine Läsion konnte im Durchschnitt im Nachweisverfahren erzielt werden.

Bei einer einstündigen Pasteurisierung bei 70 °C lagen die ermittelten Werte weit auseinander. Neben stark reduzierten Werten von jeweils 2 Läsionen für eine 10 ml Probe im Dialyseschlauch und für eine 1 ml Probe wurden auch höhere Zahlen von 100, 30 und 50 Läsionen für 5 ml Proben sowie von 180 Läsionen für eine 1 ml Probe (jeweils in Volumenkeimträgern) ausgezählt. Eine solche Streuung der Werte wurde auch erreicht, wenn die Proben bereits zu Beginn der Aufheizphase in den Pasteur eingebracht wurden. Hier wurden zum Beispiel Werte von 2, von 14 und von 225 Läsionen für 1 ml Proben erzielt. Bei einem weiteren Versuch, bei welchem zwei Einlegeproben mit einer 1 ml Suspension zunächst einer einstündigen Vorerhitzung unterzogen und anschließend für 21 Tage in die thermophile Anaerobanlage verbracht wurden, konnten mit durchschnittlich 8 und 2 Läsionen wiederum nur geringe Werte erzielt werden.

Die großen Unterschiede in den Ergebnissen erschweren die Interpretation dieser Versuche. Bei einer längerfristigen Verweilzeit in der Anaerobanlage oder bei stärkerer mechanischer Beanspruchung der Keimträger in der Pasteurierungsanlage kann nicht mit Gewißheit davon ausgegangen werden, daß die Keimträger zum Versuchsende noch dicht waren. Die zusätzliche Vermischung der TMV Suspension mit Gülle als Grundsubstrat in den Keimträgern verhinderte außerdem die Erkennbarkeit, ob sich zum Abschluß des Versuches tatsächlich noch eine TMV Suspension in den Keimträgern befand.

Deshalb sollten die Wasserbadversuche mit TMV Suspensionen aussagekräftiger sein, da hier die Volumenkeimträger ausschließlich mit Pflanzenpreßsaft aufgefüllt wurden. Trotz aller Sorgfalt beim Abdichten der verwendeten Volumenkeimträger durch das Einlegen von Polycarbonatmembranen in die Filtrationseinheiten kam es jedoch immer wieder zu Undichtigkeiten, so daß mitunter Proben verworfen werden mußten. Die der Auswertung zur

Verfügung stehenden Werte geben trotzdem Hinweise darauf, daß TMV in den Proben mit Suspensionen hitzeempfindlicher war.

Während es bei einer 10minütigen Einbringung der Proben bei Temperaturen von 80 °C und 90 °C noch zu keiner Inaktivierung des Virus kam, war eine 30minütige Verweilzeit bei 90 °C ausreichend, um das Infektionspotential zu inaktivieren. Bereits bei einer einstündigen Einbringung bei einer Temperatur von 75 °C wurde ein Wert von 21 erzielt und ab Temperaturen von 80 °C wurde TMV in der Suspension vollständig inaktiviert.

BODE & KLINKOWSKI (1968, in HERRMANN et al. 1994) erzielten eine Inaktivierung des Virus in Pflanzenpreßsäften bei Temperaturen von 90 - 92 °C und einer Einwirkzeit von 10 Minuten.

Die Einbringung von Material in Form von TMV Suspensionen ist weniger praxisrelevant. Doch zeigen diese Versuche, daß eine mögliche Mazeration der Blattproben als Folge eines biochemischen Abbaus während der Vergärung, die Proben in eine Qualität versetzen könnten, bei welcher das Virus leichter angreifbar wird. Eine mögliche mechanische Zerstörung sowie die biochemische Zersetzung der Blattstrukturen könnte, neben einer entsprechenden hohen Temperatureinwirkung, ein Hauptkriterium für die Inaktivierung von TMV in Blattmaterial sein. Diese Bedingungen sollten zum Beispiel bei der Kompostierung gewöhnlich gegeben sein.

Eine vollständige Zersetzung des mittels Keimträgern eingebrachten Blattmaterials konnte bei den durchgeführten Untersuchungen in keiner Anlage festgestellt werden. Es wäre deshalb zu überprüfen, inwieweit es auch in Vergärungsanlagen zur mechanischen Destrukturierung, zum Beispiel durch die Wirkung des Rührwerkes, bei gleichzeitiger mikrobieller Zersetzung der TMV Einlegeproben kommen kann.

In diesem Zusammenhang muß besonders die angewandte Keimträgertechnik diskutiert werden. Die verwendeten Volumenkeimträgern nach RAPP (1995) bestehen aus einem geschlossenen Kunststoffzylinder. Ein Diffusionsaustausch kann nur über die offenen Enden der Keimträger realisiert werden, welche dort mit Filtrationseinheiten versehen sind. Dadurch könnte bereits eine zu starke Isolation zum Gärmilieu gegeben sein. Die Keimträger werden gewöhnlich über ein Metallrohr in die Gärbehälter eingelassen. Durch diese Rohre, auch wenn diese perforiert sind, kommt für die Proben wahrscheinlich ein zusätzlicher Abschirmungseffekt hinzu.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurde deshalb versucht, auch mit alternativen Keimträgern Probenmaterial einzubringen. Die Verwendung von Dialyseschlauchmaterial und Beuteln aus Leinen war nicht praktikabel, da diese nach längerer Verweilzeit in der

thermophilen Anaerobanlage abgebaut wurden. Dagegen erwiesen sich genähte Beutel aus Miederware (Segeltuchstoff) gegenüber dem aggressiven Milieu der Anaerobanlagen als unempfindlich.

Die Benutzung dieser Probenbeutel erbrachte allerdings, wie für die Pasteurisierung und für die Praxisanlage II bereits erwähnt, keine abweichenden Ergebnisse zur Inaktivierung von TMV. So wies eine Einlegeprobe einen Wert von 246 Läsionen auf, welche für 21 Tage in die thermophile Anaerobanlage im Labormaßstab eingebracht worden war. Auch die Kombination aus einstündiger Pasteurisierung bei 70 °C und 21tägiger Verweilzeit in der thermophilen Vergärungsanlage erbrachte keine Abnahme des Infektionspotentials vom TMV. So wurde im Rahmen einer Vorerhitzung ein Wert von 198 erzielt und bei einer Nacherhitzung konnten noch Werte von 191 und 167 Läsionen ausgezählt werden.

Die verwendeten Volumenkeimträger und die Keimträger aus Miederware haben sich für die Einbringung von Tomatensamen und von *P. brassicae* Gallenmaterial gut bewährt. Die Eignung für TMV infiziertes Blattmaterial scheint dagegen, aufgrund des unzureichenden Kontaktes mit dem Gärmilieu, fraglich. Bei den Einlegeproben mit je 10 g Blattmaterial konnte nach 21tägiger Verweilzeit im Gärbehälter keine Zersetzung des Einlegematerials festgestellt werden. Die Blätter wurden sozusagen im "grünen Zustand" wieder zurückgewonnen. Die Nutzung weiterer Keimträgertechniken muß deshalb geprüft werden.

Der Gebrauch von grobmaschigen Netzen birgt die Gefahr in sich, das Probenmaterial während der Vergärung zu verlieren. Die von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) benutzte Keimträgertechnik wird in der aufgeführten Publikation nicht genannt. Nach eigenen Beobachtungen werden von dieser Arbeitsgruppe Nylonbeutel (Strumpfhosen) zur Einbringung der Proben verwendet. Auch bei den Kompostversuchen von HERRMANN et al. (1994) wurden Nylonsäckchen (10 x 15 cm) eingesetzt, in welche jeweils 8 bis 9 g kleingeschnittenes Blattmaterial eingebracht wurde.

HOPPENHEIDT et al. (1997) verwendeten Prüfkörper aus bruchsicieren Edelstahl (2,5 x 13 cm) mit einem Volumen von 25 ml. Der verschließbare Metallzylinder weist eine gute Wärmeleitfähigkeit auf, so daß die Temperatur im Inneren des Prüfkörpers nach etwa 3 bis 4 Minuten an das umgebene Milieu angepaßt war.

Eine gute Alternative, welche hier leider nicht getestet wurde, könnte auch die Verwendung von sogenannten "Tee-Eiern" sein. Diese Keimträger wurden in den Versuchen von MENKE & GROSSMANN (1971) benutzt. Die eiförmigen Aluminiumbehälter (6 x 12 cm) ertragen eine hohe mechanische Belastung und gewährleisten durch die zahlreichen Perforationen (\varnothing 8 mm) eine gute Wechselwirkung mit dem umgebenden Milieu.

Eine ideale Form der Probeneinbringung wäre die direkte Verseuchung des Gärsubstrates mit den Testorganismen und eine anschließende Zurückgewinnung des Einlegematerials. Diese für Anaerobanlagen unter Praxisbedingungen nicht realisierbare Versuchsanordnung wurde im Kleinmaßstab an der Anaerobanlage im Labormaßstab und für die Pasteurierungsanlage getestet. Dabei wurde in beide Anlagen TMV infiziertes Pflanzenmaterial eingebracht und nach bestimmten Verweilzeiten wieder zurückgewonnen.

Die Versuche mit der Pasteurierungsanlage zeigten, daß es zu keiner Inaktivierung des Virus im eingebrachten Pflanzenmaterial nach einer einstündigen Pasteurisierung bei 70 °C kommt (siehe Tabelle 4). Dagegen konnte in Blattproben, welche einer einstündigen Erhitzung bei 90 °C ausgesetzt wurden, kein Virus mehr nachgewiesen werden.

Für die Pasteurisierung kann damit abschließend festgestellt werden, daß eine einstündige Erhitzung bei 70 °C nicht ausreichend ist, um TMV zu inaktivieren. Dieses Ergebnis konnte bei Versuchen mit verschiedenen Qualitäten des Einlegematerials (Blattproben, Suspension) und bei Verwendung variierender Keimträger (Volumenkeimträger, Keimträger aus Dialyseschläuchen und Miederware) sowie durch die Versuche mit direkt ins Pasteursubstrat eingebrachtem Pflanzenmaterial klar bewiesen werden und deckt sich mit dem publizierten Resultat von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999). Der kritische Temperaturbereich für eine Inaktivierung von TMV bei einer einstündigen Pasteurisierung dürfte noch oberhalb von 80 °C liegen.

Für die direkte Einbringung von TMV infiziertem Blattmaterial in die Anaerobanlage im Labormaßstab kommt vor allem der Versuch 2 (siehe Tabelle 3) zur Diskussion in Betracht. Es wurde versucht, das eingebrachte Blattmaterial durch Auswaschen der Outputmatrix durch ein Sieb zurückzugewinnen. Während des Einbringungszeitraumes (Tag "0" bis 8) wurden die Proben jeweils vor Einbringung des neuen Blattmaterials gewonnen, so daß eine Mindestverweilzeit von 24 Stunden in der Anlage garantiert war. Bei einer Probenziehung betrug die Mindestverweilzeit 3 Tage, da an einem im Untersuchungszeitraum liegenden Wochenende die Anlage nicht beschickt wurde. In diesem Zeitraum konnte bis zum 9. Tag immer eindeutig Proben des eingebrachten Blattmaterials zurückgewonnen werden. TMV wurde in diesen Proben nicht inaktiviert. Nach der Einstellung der täglichen Inputzugabe von 400 g Blattmaterial wurden ab dem 15. Versuchstag an fünf weiteren Terminen Outputproben genommen. Ab diesem Zeitpunkt konnte das eingebrachte Probenmaterial im Output jedoch nicht mehr eindeutig identifiziert werden. Es wurden deshalb "tabakblattähnliche" Proben genommen, wobei die isolierten Blätter auch vom eingebrachten Bioabfall stammen konnten. Die jeweilige Mindestverweilzeit dieser Blattproben betrug 6, 7, 8, 12 und 14 Tage. TMV konnte in keiner Probe dieser letzten fünf Termine nachgewiesen werden.

Dieser Versuch gibt einen Hinweis darauf, daß TMV infiziertes Blattmaterial bei einer Verweilzeit von mehr als 3 Tagen in einer thermophilen Anaerobanlage so zersetzt werden kann, daß eine Reisolierung des Einlegematerials nicht mehr möglich ist. Wird das Virus aus den Blattstrukturen herausgelöst, so wird die Infektiosität bei entsprechender Temperatur- und Substrateinwirkung vermutlich schnell herabgesetzt. Dafür spricht auch, daß in allen untersuchten Outputproben der sonstigen Versuche sowie in den untersuchten Substratsproben der Probenstutzen der Praxisanlage I TMV im Biotest niemals nachgewiesen werden konnte.

Nach HERRMANN et al. (1994) sind die Temperatur und ein ausreichender Wassergehalt die wichtigsten Mortalitätsfaktoren für phytopathogene Organismen und Tomatensamen während der Kompostierung. MENKE & GROSSMANN (1971) führen als Abtötungsursachen für Pflanzenviren während der aeroben Abfallbehandlung hohe Temperaturen, Feuchtigkeit, mechanische Kräfte und antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte der an der Rotte beteiligten Organismen sowie toxische Abbauprodukte an.

Die Hauptkriterien einer möglichen erfolgreichen Inaktivierung von TMV bei der anaeroben thermophilen Vergärung werden bestimmt durch die Höhe der Temperatur, die tatsächliche Verweildauer der Proben in der Anlage, die Stärke des Kontaktes zum Gärsubstrat und die damit verbundene tatsächliche Wirksamkeit der mikrobiellen Aktivität und der biochemischen Eigenschaften des anaeroben Milieus, dessen Qualität letztendlich phänologisch anhand des Grades der Zersetzung der eingebrachten Einlegeproben deutlich wird.

Ein wichtiger Parameter für die biochemischen Eigenschaften des anaeroben Milieus ist der pH-Wert. Das Virus reagiert empfindlich auf pH-Werte größer 8,0. Bei zunehmender Alkalität kommt es zur Abnahme der thermischen Stabilität des Virus (HERRMANN et al. 1994). Ein pH-Wert größer 8,0 wurde in der Anaerobanlage im Labormaßstab nicht gemessen. Die Werte bewegten sich im leicht alkalischen Bereich von etwa 7,5 bis 7,9. Ein solcher pH-Wert Bereich ist notwendig, um die Prozeßstabilität der ablaufenden anaeroben Vergärung zu gewährleisten. Eine mögliche Ursache für die erfolglose Inaktivierung des Virus in den Einlegeproben für die Versuche in der Praxisanlage II könnte also auch in den niedrigen pH-Werten gesucht werden. Die Proben wurden in den ersten Fermenter eingebracht, welcher aufgrund der dort verstärkt ablaufenden Versäuerungsreaktionen der Hydrolyse die niedrigsten pH-Werte mit 5,3 - 6,6 aufwies. Ob eine stärkere Reduktion des Infektionspotentials von TMV im Reaktor 3 erreicht worden wäre, in welchem ein pH-Wert von bis zu 8,3 gemessen wurde, muß allerdings Spekulation bleiben. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um möglicherweise eine Korrelation zwischen zunehmenden pH-Wert und abnehmender Infektiosität von TMV zu finden.

Nach den bisher durchgeführten Untersuchungen und unter Berücksichtigung der publizierten Ergebnisse in der Literatur muß bezweifelt werden, daß bei einer mesophilen Vergärung eine hinreichende Inaktivierung des Virus erreicht werden kann, auch wenn diese zusätzlich mit einer Vor- oder Nacherhitzung kombiniert wird.

Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen den untersuchten Anaerobanlagen oder bei den verschiedenen Versuchsvarianten an einer Anlage fällt auf, daß die erzielten Werte für die Anzahl der Läsionen relativ stark variieren können. Dies ist zum Beispiel bei den Ergebnissen zur thermophilen Vergärung im Labormaßstab bei Verwendung eines Gärsubstrates aus 75 % Gülle und 25 % Speiseabfällen im Vergleich zu den anderen Substratkombinationen der Fall. Auch die Unterschiede zwischen den Werten der Praxisanlage I und II wurden bereits erwähnt. Der Biotest ist abhängig von einer Vielzahl äußerer Faktoren. Für die teilweise hohe Varianz der im Biotest ermittelten Werte für die Anzahl der Läsionen sind mehrere Ursachen denkbar. So ist zum Beispiel von verschiedenen hohen Viruskonzentrationen im Blattmaterial auszugehen. Diese Unterschiede werden im Verlauf der Probenbehandlung und insbesondere bei der Probenaufbereitung noch verstärkt. So kann es zum Beispiel zu Unterschieden hinsichtlich der verwendeten Mengenteile des Proben- und Auffüllmaterials bei der Homogenisierung kommen.

Eine große Bedeutung kommt auch der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Testpflanzen gegenüber einer Inokulation mit TMV im Biotest zu. Es gibt Unterschiede innerhalb der Testpflanzen einer Anzucht und zwischen den einzelnen Blättern einer Pflanze. So konnte häufiger beobachtet werden, daß ein Blatt bei der Inokulation einer TMV Probe nur mit vereinzelten Läsionen reagiert, während ein anderes Blatt derselben Pflanze (zumeist ein jüngeres Blatt) eine Vielzahl von Läsionen ausbildet. Die Sensibilität der Pflanzen nimmt mit zunehmenden Alter ab, so daß es eines gewissen "gärtnerischen Geschicks" bedarf, den richtigen Zeitpunkt für die Inokulation zu bestimmen. Diese Erfahrungen mußten auch bei diesem Projekt erst gesammelt werden. Somit ist zu erklären, daß viele Werte, welche durch eine Inokulation der Proben über die gesamte Blattfläche erzielt wurden, sogar geringer ausfallen als die Werte mit der später angewendeten Halbblattechnik.

Die in der BIOABFV (1998) genannte Methodik, jede Probe in einem Mixer zu homogenisieren, kann zur Verschleppung des Virus innerhalb der Proben führen. In der Praxis wird bei dieser Form der Probenaufbereitung der Mixer mit Wasser ausgespült und dann für die nächste Probe verwendet. Diese Gefahr der Kontaminierung der Proben untereinander wurde bei den hier dargestellten Untersuchungen dadurch ausgeschlossen, indem für jede einzelne Probe ein sterilisierter Mörser zur Homogenisierung verwendet wurde.

Die Applikationsmenge der gewonnenen Extrakte für die Inokulation im Biotest wird in der BIOABFV (1998) nicht festgelegt. Um eine Konstante zu erhalten, wurden jeweils 20 µl der Probensubstanz je Blatt bzw. je Blatthälfte inokuliert.

In der BIOABFV (1998) wird auch nicht definiert, wie viele Testpflanzen für eine Probe im Nachweisverfahren verwendet werden sollen. Ein "amtliches" Ergebnis für eine Probe kann somit theoretisch durch die Addition der Läsionen zweier Blätter einer Pflanzen bestimmt werden. Bei den hier dargestellten Untersuchungen wurde jede Probe in der Regel an drei bis vier Pflanzen mit jeweils zwei bis drei Blättern inokuliert. Als Ergebnis wurde stets ein Mittelwert für die Anzahl der Läsionen angegeben. Für die TMV Prüfmethodik sollte dieses Verfahren zu Diskussion gestellt werden. Angedacht werden könnte, jede Probe an drei Testpflanzen mit je zwei bis drei Blättern zu inokulieren. Zur Auswertung berücksichtigt werden sollte dasjenige Blatt jeder Testpflanze mit der größten Anzahl an Läsionen. Über die Läsionenzahlen der drei so bestimmten Blätter eines Probensatzes könnte dann ein Mittelwert gebildet werden, welcher den in der BIOABFV (1998) genannten Richtwert von ≤ 8 Läsionen nicht überschreiten darf.

Die Aufbringung von Probenextrakt und Positivkontrolle (TMV Suspension) auf einem Blatt nach der Halbblattmethode von WALKEY (1991, in BIOABFV 1998) kann sich als problematisch erweisen. Immer wieder konnte beobachtet werden, daß es auch bei ausreichender Erfahrung mit der Inokulationstechnik zu einer Verschleppung des mechanisch leicht übertragbaren Virus aus der Kontrollhälfte in die Probenhälfte kam. Das Nachweisverfahren von TMV im Biotest ist hoch empfindlich. Bereits eine kurze Applikationszeit, die Blattflächen wurden gleich nach der Inokulation mit Wasser abgebraust, führt zu zahlreichen Läsionen an den Testpflanzen. Deshalb kann es nicht ausgeschlossen werden, daß das Virus während der Phase des Abwaschens der Blätter von der Kontrollhälfte in die Probenhälfte geschwemmt wird. Dort könnte es bereits nach kurzer Kontaktzeit die entsprechenden Abwehrreaktionen der Pflanze in Form von Lokalläsionen hervorrufen. Um jede Schwierigkeit bei der Interpretation von auftretenden Läsionen zu vermeiden, wurden die Kontrollen stets an Extrapflanzen inokuliert, welche jedoch zur selben Versuchsanzucht gehörten.

Die nekrotischen Lokalläsionen werden an den Testpflanzen bei positiven Befund innerhalb weniger Tage sichtbar. Häufig wurden die Symptome bereits nach zwei bis drei Tagen voll ausgebildet. Bei hoher Viruslast können sich die Läsionen mit der Zeit zu nekrotischen Flächen verstärken. Der in der BIOABFV (1998) genannte Zeitraum von zehn Tagen bis zum Beginn der Auszählung kann deshalb bereits zu lang sein, um klar erkennbare Läsionen auszählen zu können. Die Bonitur der Läsionen sollte deshalb zu dem Zeitpunkt erfolgen, ab

welchen diese deutlich zu erkennen sind, und sich auch an den Erfahrungswerten der Bearbeiter orientieren.

Die teilweise große Variabilität der Ergebnisse im Biotest kann es notwendig machen, die Überprüfung der Proben auf TMV im Nachweisverfahren zu wiederholen. Deshalb sollten Rückhalteproben der Extrakte aufbewahrt werden. Ausreichend dafür sind kleine Mengen, welche zum Beispiel bequem in Reaktionsgefäßen (Tubes) eingefroren werden können.

Zur Vereinfachung des Testverfahrens bzw. zur Reduzierung des Untersuchungsaufwandes ist eine Verringerung des Probenumfangs denkbar. Während bei der Kompostierung verschiedene Bereiche des Komposts geprüft werden können, zum Beispiel die Basis, der Kern oder die Randbereiche, ist solch eine umfangreiche Testung in Anaerobanlagen aufgrund der baulichen Gegebenheiten zumeist nicht möglich. Wenn in gewerblichen Anaerobanlagen zum Beispiel nur drei Stutzen zur Probenbeschickung zur Verfügung stehen, kann man darüber diskutieren, jeweils nur eine Probe mit einer Wiederholung zu verwenden. Die Verringerung des Prüfmaterials in den Proberohren würde vermutlich auch gleichzeitig zu einem stärkeren Kontakt der Proben mit dem Gärmedium führen, da eine bessere Durchmischung der Proben mit dem Gärsubstrat denkbar wird.

Eine Übertragung, der für die Kompostierung verwendeten Methodik zur Prüfung der Hygienisierung von phytopathogenen Keimen während der aeroben Bioabfallbehandlung, ist nicht ohne weiteres auf die anaerobe Abfallbehandlung in Vergärungsanlagen möglich. Besonders hinsichtlich der Verwendung des phytopathogenen Testorganismus Tabak-Mosaik-Virus (TMV) als viralen Leiterreger, welcher sich als aussagekräftiger Prüforganismus bei der Kompostierung bewährt hat, gibt es für Anaerobanlagen Bedenken. TMV wurde aufgrund seiner hohen Thermoresistenz als viraler Leitorganismus ausgewählt. Seine epidemiologische oder wirtschaftliche Bedeutung ist im Vergleich zu anderen Pflanzenviren vermutlich eher von geringerer Relevanz. Deshalb sollte hinsichtlich der Überprüfung der phytohygienischen Wirksamkeit von Anaerobanlagen auch die Verwendung anderer Viren als Prüforganismen diskutiert werden.

Ein alternativer viraler Prüforganismus könnte möglicherweise das von MENKE & GROSSMANN (1971) verwendete Tabak-Rattle-Virus (TRV) sein, für welches im Nachweisverfahren im Biotest, ähnlich wie für TMV, Lokalläsionen an Tabakpflanzen als Indikator für eventuell erhaltene Aktivität ausgezählt werden können. Die Inaktivierungstemperatur von TRV liegt mit 78 – 80 °C etwa 10 °C niedriger als für TMV (SCHMELZER 1957 und EIBNER 1959, in von MENKE & GROSSMANN 1971). Daß auch TRV eine relativ hohe Thermostabilität aufweist, zeigten die Untersuchungen der genannten Autoren. Für einen Zeitraum von 3 bis 6 Tagen bei Temperaturen von bis zu 68 °C wurde während einer Kompostierung der Proben keine vollständige Inaktivierung des Virus erreicht.

Neben viralen könnten auch bakterielle Phytopathogene in eine Überprüfung einbezogen werden. Ein phytopathologisch bedeutsamer Erreger ist zum Beispiel das Bakterium *Erwinia amylovora*, der hochpathogene Erreger des Feuerbrandes des Kernobstes. Untersuchungen von BRUNS et al. (1989) zeigten, daß *E. amylovora* bereits bei einer mesophilen Kompostierung erfolgreich abgetötet wird. Als Spektrum für eine thermischen Inaktivierung wird von den Autoren ein relativ weiter Temperaturbereich von 25 - 60 °C angegeben, welcher jedoch deutlich unter dem von TMV liegt.

4.2 *Plasmodiophora brassicae*

Die dargestellten Untersuchungen zu *P. brassicae* zeigen, daß die in der BIOABFV (1998) geforderten Bedingungen für eine mesophile Betriebsführung (mit Vor- oder Nachbehandlung bei 70 °C, 1 h) und für eine thermophile Prozeßführung (55 °C mindestens 24 h) ausreichend sind, um den Pilz vollständig zu inaktivieren.

Bei einer mesophilen Prozeßführung kann auf eine zusätzliche Erhitzung verzichtet werden, wenn eine tatsächliche Verweilzeit von 20 Tagen in der Anlage gewährleistet werden kann. Zu überprüfen ist, inwieweit bereits kürzere Verweilzeiten der Einlegeproben in Anaerobanlagen unter mesophilen Bedingungen zureichend sind, um die Proben vollständig zu hygienisieren. Versuche von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) zeigten, daß eine Verweilzeit von 7 Tagen in einer mesophilen Anaerobanlage unter Praxisbedingungen die Infektiosität von *P. brassicae* bereits stark einschränkt. Es wurde ein Befallsindex von 1,6 ermittelt. Dagegen konnten WIEMER & KERN (1996) bei 14tägiger Einbringung von Wurzelgallen in einem einstufigen Laborfermenter im mesophilen Temperaturbereich (35 °C) keine Abtötung von *P. brassicae* finden. Die "vergorenen Wurzeln" zeigten dasselbe Infektionspotential wie das Ausgangsmaterial.

In diesen abweichenden Ergebnissen zu Inaktivierungsuntersuchungen von *P. brassicae* im mesophilen Temperaturbereich spiegelt sich möglicherweise eine unterschiedliche Temperaturresistenz der jeweils verwendeten Pilzstämme wieder. Nach SCHÜLER (1996, in HOPPENHEIDT et al. 1997) kann die Wärmeverträglichkeit des Pilzes je nach Herkunft schwanken. BRUNS et al. (1989) geben für die Inaktivierung von *P. brassicae* Temperaturen von 50 °C bis 73 °C an. Bei einer Anaerobbehandlung der Einlegeproben unterhalb dieses Temperaturbereiches sollten für die Inaktivierung von *P. brassicae* neben der Temperatur weitere Inaktivierungsursachen eine entscheidende Rolle spielen. In erster Linie ist hier an das biochemische und mikrobielle Milieu während der Vergärung zu denken. Als Abtötungsfaktoren kommen zum Beispiel antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte der an

der Vergärung beteiligten Organismen und toxische Abbauprodukte in Betracht. Ein pH-Wert im alkalischen Bereich kann entscheidend zur Inaktivierung des Pilzes beitragen.

Die größere Anfälligkeit des Pilzes bei Temperaturen im thermophilen Bereich zeigt sich mehrfach in publizierten Untersuchungen. Bei WIEMER & KERN (1996) wurde *P. brassicae* bei der thermophilen Prozeßführung nach einer Verweilzeit von 7 bzw. von 14 Tagen vollständig inaktiviert bzw. das Infektionspotential auf 1 % des Ausgangswertes gesenkt. Die von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) publizierten Ergebnisse zu Versuchen mit *P. brassicae* zeigen eine vollständige Inaktivierung des Erregers unter thermophilen Bedingungen nach einer Verweilzeit von 21 Tagen.

Keine vollständige Inaktivierung wurde von MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) dagegen bei einer Pasteurisierung der Einlegeproben erreicht. Es wurde ein Befallsindex von 0,26 ermittelt, welcher allerdings deutlich unter dem in der BIOABFV (1998) genannten Grenzwert von $\leq 0,50$ liegt.

Die Verwendung von *P. brassicae* Gallenmaterial als aussagekräftiger Prüforganismus für Untersuchungen zur Hygienisierung von Abfällen sowohl bei aerober als auch bei anaerober Abfallbehandlung hat sich bewährt. Als pilzlicher Leiterreger der Phytohygiene zeichnet sich *P. brassicae* insbesondere durch eine Temperaturreistenz aus, die höher liegt als die anderer phytopathologisch relevanter Erreger. So bildet zum Beispiel *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel, ein Mycel, welches bei Temperaturen bis 45 °C widerstandsfähig bleibt, während die Zoosporen dieses Pilzes bereits bei 25 °C nicht mehr lebensfähig sind (GOLUEKE 1982, in BRUNS et al. 1989). Für einige *Sclerotinia* Arten existieren Untersuchungen zur thermischen Inaktivierung bei der Kompostierung. Eine markante Temperaturschwelle für die Abtötung der Sklerotien von *S. trifoliorum* sind 40 °C (DITTMER & WELTZIEN 1988, in DITTMER et al. 1990). Bei Temperaturen von 50 °C sollen Sklerotien von *S. sclerotiorum* nicht mehr lebensfähig sein bzw. ihre Keimfähigkeit verlieren (DITTMER et al. 1990, HERRMANN et al. 1994). Bei DITTMER et al. (1990) sind auch Angaben zur Thermoresistenz des Pilzes *Pseudocercospora herpotrichoides* zu finden. Das Wachstum des Pilzmycels und die Produktion von Konidien werden demnach bereits bei Temperaturen von 20 °C bis 35 °C eingestellt.

Weitere Versuche zur Anaerobanlage unter mesophilen Bedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, konnten allerdings nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die Ursache hierfür war die Verwendung von nur gering infektiösem Gallenmaterial, wie die Positivkontrollen im Biotest bewiesen. Bei einer Wuchszeit von bis zu neun Wochen der Testpflanzen im Biotest können die Ausfallzeiten für eine Datenerfassung nachvollzogen werden. Deshalb muß es eine Forderung sein, die Qualität der Einlegeproben hinsichtlich der

Infektiosität des Pilzes bereits vor einer direkten Prozeßprüfung einer Biogasanlage zu überprüfen.

Da *P. brassicae* Gallenmaterial auch bei einer hohen Verdünnung noch ein hohes Infektionspotential aufweist - so erkrankten bei einer Inokulumdichte von 0,01 g auf 500 ml Erde noch fast die Hälfte der Testpflanzen - wurde untersucht, warum das verwendete Gallenmaterial trotzdem nicht immer infektiös war. Die Kontrollversuche zeigten, daß bei Gallenmaterial, welches stark zerkleinert bei Temperaturen von etwa - 20 °C eingefroren wurde, die Infektiosität stark nachließ. Selbst bei Probenumfängen von 10 g dieser Qualität des Gallenmaterial lag der Befallsindex bei Null. Vermutlich ist auch ein mehrmaliges Auftauen und wieder Einfrieren der Gallen der Infektiosität des Pilzes abträglich. Die geernteten Wurzelgallen sollten deshalb unzerkleinert und portioniert eingefroren werden, um so das volle Infektionspotential von *P. brassicae* zu erhalten.

Die in der BIOABFV (1998) genannte Einlegemenge von 10 g Gallenmaterial pro Probe ist vom Umfang her noch geeignet, um diese mittels Keimträger verschiedener Beschaffenheit, in den Vergärungsprozeß einzubringen. Bei der Verwendung von kleineren Keimträgern sollte eine Reduzierung der Einlegeprobe um die Hälfte möglich sein, damit das Probenmaterial noch ausreichend mit Gärsubstrat vermischt werden kann. Nach der Rückgewinnung der Proben sollte das Gallenmaterial im Biotest auf mehrere Gefäße aufgeteilt werden, um somit Wiederholungen der Proben zu erhalten. Mögliche sekundäre Verunreinigungen der ausgelegten Proben können dadurch besser erkannt werden, zumal laut BIOABFV (1998) keine Rückhalteproben für Wiederholungen vorgesehen sind. Denkbar wäre zum Beispiel die Aufteilung einer 10 g Einlegeprobe auf fünf 500 ml Töpfe. Die Töpfe müssen untereinander so abgeschirmt werden, daß eventuell durch Gießwasser ausgeschwemmte Pilzsporen nicht zu einer Infektion in Nachbartöpfen führen können. Dies kann zum Beispiel durch das Aufsetzen der Töpfe auf umgedrehte Untersetzer leicht verhindert werden.

Die Bewertung der Wurzelgallenbildung befallener Pflanzen nach einer Boniturskala mit Befallsklassen von 0 bis 3 sollte überdacht werden. Diese Art der Bewertung von Schadsymptomen wird immer subjektiv vom einzelnen Betrachter abhängig sein, zumal eine genaue Definition der einzelnen Befallsklassen nicht explizit in der BIOABFV (1998) aufgeführt wird. Es ist davon auszugehen, daß bei einer Infektion der Testpflanze mit dem Pilz, die Ausprägung der Schadsymptome im Laufe der Wuchszeit zunimmt. Je länger der Zeitraum eines Biotests ist, desto größer wird auch der Einfluß verschiedener äußerer Faktoren auf das Testergebnis sein. So verläuft zum Beispiel das Pflanzenwachstum nicht zu jeder Jahreszeit gleichmäßig, auch wenn die Licht- und Temperaturverhältnisse, wie in der BIOABFV (1998) beschrieben, eingehalten werden. Daraus resultiert, daß die dort genannte Wuchszeit von fünf Wochen nicht immer eingehalten werden kann. Eine einfache und

objektive Bewertung der Testpflanzen wäre allein die Feststellung ob ein positiver oder negativer Befund vorliegt. In den hier dargestellten Ergebnissen wurde sich insoweit an dem Befallsindex der BIOABFV (1998) orientiert, als daß alle gesunden Pflanzen den Befallsindex 0 erhielten und die erkrankten Pflanzen mit 3 bewertet wurden. Letztere Einordnung kann letztendlich auch damit gerechtfertigt werden, daß bei den befallenen Testpflanzen die Symptome einer Gallenbildung nach Klasse 3 (starke Schwellung an Lateral- und Hauptwurzeln) in der Regel voll ausgebildet waren.

4.3 Tomatensamen

Eine vollständige Inaktivierung von Tomatensamen fand bei der Simulation von feuchter Hitze im Wasserbad bereits bei Temperaturen von knapp über 65 °C nach einer Verweilzeit von 10 Minuten statt. Der thermische Inaktivierungspunkt der verwendeten Samen bei feuchter Hitze lag somit zwischen 65 °C und 67 °C. Diese Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen bei HERRMANN et al. (1994), welche die Hitzeresistenz gequollener und trockener Tomatensamen in Laborversuchen ermittelten. Bei Temperaturen von 45 °C hatten die gequollenen Samen ihre Lebensfähigkeit nach 9 Tagen, bei 50 °C nach 3 Tagen und bei 60 °C bereits nach 24 Stunden verloren. Eine höhere Widerstandsfähigkeit zeigten dagegen die trockenen Tomatensamen, welche bei Temperaturen von 80 °C nach 15 Tagen, bei 90 °C nach 5 Tagen und bei 100 °C nach 24 Stunden ihre Lebensfähigkeit verloren hatten. Die höhere Empfindlichkeit gequollener gegenüber getrockneten Samen, ist auf die mit der Samenquellung verbundene erhöhte Stoffwechselaktivität der Zellen zurückzuführen.

Daß Tomatensamen bei Temperaturen von über 60 °C relativ schnell inaktiviert werden, bestätigen auch die Ergebnisse von CYRIS (1997, in HOPPENHEIDT et al. 1997). Dort wurde bei Temperaturen von 30 °C und 45 °C nach jeweils 40 Minuten keine Inaktivierung von Tomatensamen erzielt. Jedoch kam es bei einer Wärmebehandlung von 60 °C bzw. 70 °C bereits nach 10 Minuten zur vollständigen Inaktivierung der Samen.

Unter thermophilen Bedingungen genügt eine Verweildauer von 24 Stunden in einer Anaerobanlage, um die Keimfähigkeit der Samen vollständig zu hemmen. In den Wasserbadversuchen konnte gezeigt werden, daß bereits eine Verweilzeit von etwa 90 Minuten bei einer Temperatur von 55 °C ausreicht, um die Samen zu inaktivieren.

Eine Pasteurisierung oder eine Verweildauer von 21 Tagen in der Anaerobanlage unter mesophilen Bedingungen erbrachten eine vollständige Inaktivierung der Samen. Unter mesophilen Bedingungen nimmt die Keimungsrate innerhalb von 5 Tagen um etwa 10 % ab. Bei den Versuchen im Wasserbad wurde bei einer Temperatur von 37 °C eine mittlere

Keimungsrate von 85 % nach 28 Stunden Verweilzeit ermittelt. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Befund bei HERRMANN et al. (1994), welche in Laborversuchen im Brutschrank eine Abnahme der Keimrate gequollener Tomatensamen bei einer Temperatur von 35 °C nach mehr als 3 Tagen ermittelten. Nach 7tägiger Verweildauer in der Vergärungsanlage unter mesophilen Bedingungen konnte die Keimungsrate bereits auf 59 % reduziert werden. MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999) ermittelten ebenfalls für einen Zeitraum von 7 Tagen eine noch geringere Keimungsrate von 28,5 % für eine mesophile, anaerobe Behandlung.

Die unbehandelten Kontrollen von Tomatensamen bestätigten die allgemein hohe Keimungsrate der Tomatensorte St. Pierre. Die erzielten Keimungsraten von bis zu 99 % sind mit den in der Literatur zitierten Werten, zum Beispiel von 98 % bei MARCINISZYN & GOTTSCHALL (1999), vergleichbar und lagen im Durchschnitt immer über der in der BIOABFV (1998) geforderten Mindestkeimfähigkeit von 90 %. Eine hohe Keimungsrate der Samen im allgemeinen und geringe Schwankungen innerhalb des Keimungsverhaltens verschiedener Proben bei gleicher Behandlung sind wichtige Kriterien für die Begründung der Verwendung von Tomatensamen als Prüforganismen.

Bei den verwendeten fünf weiteren Unkrautarten zeigten nur die Kontrollen von *R. obtusifolius* genauso hohe und ausgeglichene Keimungsraten. Die in der Abb. 17 dargestellten Werte verdeutlichen anhand der hohen Standardabweichungen die großen Schwankungen in den Keimungsraten der restlichen untersuchten Unkrautarten.

Niedrige Keimungsraten und große Schwankungen zwischen den einzelnen Keimversuchen, erschweren die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse. Dies soll anhand der Art *A. fatua* verdeutlicht werden. Die Kontrollen von *A. fatua* keimten in sehr unterschiedlich hohen Raten. Die durchschnittliche Keimungsrate lag bei 37 % (STABW 14,4). In den Wasserbadversuchen wurden bei einer angelegten Temperatur von 37 °C nach Verweilzeiten von 60 und von 120 Minuten Keimungsraten von 35 % erzielt, welche also im Bereich der unbehandelten Kontrollen lagen. Nach 3 bis 4 Stunden Verweilzeit nahmen die Keimungsraten ab und lagen bei 20 % und bei 25 %. Nach einer Verweilzeit von 6 Stunden lag die Keimungsrate schließlich bei Null, eine vollständige Inaktivierung der Samen von *A. fatua* schien somit erreicht zu sein. Doch nach weiteren Verweilzeiten von 8 bzw. 16 Stunden wurden wieder Keimungsraten von über 20 % ermittelt. Obwohl Samen von *A. fatua* aufgrund ihrer hohen Thermoresistenz aussagekräftige Prüforganismen sein könnten, so keimten bei einer 10minütigen Behandlung bei 70 °C noch 15 % der Samen (STABW 14,1), wäre eine Verwendung dieser Art in einem Standardprüfverfahren wegen der Unregelmäßigkeiten im Keimungsverhalten nicht sinnvoll.

Aufgrund der geringen Keimungsrate eignet sich auch die Verwendung der Samen vom Gemeinen Windenknöterich (*Fallopia convolvulus*) nicht. Neben Tomatensamen untersuchten

HERRMANN et al. (1994) auch das Verhalten von gequollenen Samen von *F. convolvulus* in Laborversuchen, welcher im allgemeinen lediglich eine Keimfähigkeit von 7 % aufwies. Die ermittelten Ergebnisse sind fast identisch mit denen der Tomatensamen. Die Prüforganismen verloren ihre Lebensfähigkeit nach einer Verweilzeit von 9 Tagen bei 45 °C, nach 4 Tagen bei 50 °C und nach 24 Stunden bei 60 °C im Brutschrank.

Die in der BIOABFV (1998) geforderte analoge Übernahme des Prüfsystems zur Feststellung der phytohygienischen Unbedenklichkeit bei aerober Behandlung (Kompostierung) auf die anaerobe Behandlung (Vergärung) im Rahmen von direkten Prozeßprüfungsverfahren bzw. bei der Produktprüfung in der Phytohygiene, sollte für die Prüforganismen Tomatensamen gut zu realisieren sein. Tomatensamen haben sich als aussagekräftige Prüforganismen für die Kontrolle der Inaktivierungskapazität von Abfallbehandlungsanlagen hinsichtlich austriebsfähiger Diasporen bewährt. Die geringe Menge an Probeneinlegematerial von je 1 g und die gute Handhabbarkeit der Samen (z. B. relativ große Samen, leichte Rückgewinnung durch Auswaschung im Sieb), haben sich als besonders vorteilhaft erwiesen.

Die Prüfmethodik für Tomatensamen ist gut erprobt, wobei man über den Sinn der in der BioAbfV (1998) verlangten Rückhalteproben diskutieren könnte. Die Hälfte der Samen soll für etwaige Wiederholungen zur Bestimmung der Keimfähigkeit aufbewahrt werden. Auf diese Forderung kann möglicherweise verzichtet werden, da die zu untersuchenden Proben sowieso jeweils in drei Wiederholungen (4 x 50 Samen) ausgelegt werden. Für die Testorganismen TMV und *P. brassicae*, welche im Biotest unter Umständen viel komplizierter zu handhaben sind, werden solche Rückhalteproben nicht verlangt.

Neben Tomatensamen könnte sich auch die Verwendung von Samen der Art *R. obtusifolius* als Prüforganismen, stellvertretend für keimfähige Samen bzw. austriebsfähige Pflanzenteile, als sinnvoll erweisen. Bei Anwendung einer ähnlichen Prüfmethodik wie für Tomatensamen deuten erste Ergebnisse auf eine ebenso hohe und ausgeglichene Keimfähigkeit der Samen hin. Die Samen von *R. obtusifolius* wiesen in den Wasserbadversuchen eine etwas höhere Thermoresistenz gegenüber Tomatensamen auf. Bei einer Temperatur von 55 °C keimten nach einer Verweildauer von 120 Minuten noch 50 % der Samen einer Einlegeprobe von *R. obtusifolius* während die Tomatensamen zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig inaktiviert waren. Auch der thermische Inaktivierungspunkt liegt bei *R. obtusifolius* etwas höher. Während bei einer 10minütigen Temperatureinwirkung von 65 °C noch etwa 80 % der Samen dieser Art keimten, wurden bei den Proben mit Tomatensamen nur noch Keimungsraten von etwa 2 % (STABW 4,9) erzielt.

Bei Temperaturen von 70 °C wurden schließlich beide Prüforganismen vollständig inaktiviert. Zur Verifizierung der ermittelten Ergebnisse für die dargestellten Unkrautarten zur Inaktivierung im Wasserbad bei feuchter Hitze sind allerdings noch weitere Untersuchungen erforderlich, da die Versuche teilweise nur mit einer Wiederholung durchgeführt wurden.

4.4 Anaerobanlage im Labormaßstab

Die Anaerobanlage im Labormaßstab konnte innerhalb des Versuchszeitraumes nicht immer im stabilen Reaktorbetrieb gefahren werden. Besonders beim Betrieb der Anlage im thermophilen Bereich häuften sich die Störungen. Für einen Zeitraum von 21 Tagen war der Betrieb schließlich ganz unterbrochen oder zumindest stark eingeschränkt. Die Ursache für diese Störung dürfte in erster Linie die Verwendung von Abfällen mit einem relativ hohen Anteil an Trockensubstanz (Bioabfälle) gewesen sein. Der Keilriemen als Antriebsvermittler zwischen Motor und Rührwerk erwies sich als Schwachstelle an dieser Anlage. Hatte sich Grobsubstrat am Rührwerk festgesetzt oder verfangen, reichte der Antrieb mitunter nicht aus, um das Rührwerk in Gang zu setzen. Durch die Erhöhung der Rührfrequenz sollte dies vermieden werden. Die aus dem zeitweiligen Ausfall des Rührwerkes resultierende unzureichende Vermischung des Gärsubstrates hatte häufig die Zusetzung des Outputstutzens mit Sand oder anderen Grobstoffen zur Folge, so daß mitunter Gärsubstrat über den Inputstutzen austrat.

Tendenziell lief die anaerobe Fermentation im thermophilen Bereich dynamischer ab. Als Indikatoren für die Stärke einer anaeroben Vergärung können zum Beispiel die Höhe der Biogasproduktion oder der Wert des Redoxpotentials gewertet werden.

Die Durchschnittswerte der ermittelten Gasausbeute lagen bei der thermophilen Fermentation bei 1,2 bis 1,5 l/l RV pro Tag. Bei der mesophilen Gärung schwankte die Biogasausbeute stärker. Es wurden Werte von 0,5 bis 1,7 l/l RV pro Tag erreicht, wobei die Gasausbeute bei Verwendung von Pasteursubstrat durchschnittlich noch geringer war. Diese Werte sind gut vergleichbar mit den Angaben bei OECHSNER (1996), welcher Biogasausbeuten von 0,6 bis 1,6 l/l RV pro Tag für eine mesophile und 0,6 bis 2,5 l/l RV pro Tag für eine thermophile Prozeßführung erreichte. Die von OECHSNER (1996) festgestellten starken Unterschiede der Biogasausbeute bei Verwendung von unterschiedlichen Substraten, zum Beispiel 0,6 l/l RV pro Tag bei der Vergärung von 100 % Gülle und 2,5 l/l RV pro Tag bei der Kofermentation von 50 % Gülle mit 50 % Speiseresten, konnten bei den hier dargestellten Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Die ermittelte Methankonzentration im Biogas von durchschnittlich 60 % ist mit den Angaben aus der Literatur vergleichbar. So betrug der Methangehalt bei OECHSNER (1996) 56 bis 59 %.

Der in der Anaerobanlage gemessene pH-Wert lag immer im schwach alkalischen Bereich bei etwa 7,5 bis 8,0. Bei der mesophilen Prozeßführung lag der pH-Wert bei etwa 7,5 bis 7,6. Dieser relativ niedrige pH-Wert ist auf die Verwendung der Speiseabfälle zurückzuführen. Auch im thermophilen Bereich lag der pH-Wert während des Zeitraumes mit der Beschickung

mit Speiseabfällen in diesem Bereich, stieg aber während der Kofermentation von 25 % Speiseabfällen mit 25 % Bioabfällen auf Werte bis 7,8 an. Bei der Kofermentation von 50 % Gülle mit 50 % Bioabfall erhöhte sich der pH-Wert noch einmal auf Werte von 7,8 bis 8,0.

Die in der Anaerobanlage im Labormaßstab ermittelten pH-Werte sind mit den Werten der Praxisanlagen I und II vergleichbar. In dem Reaktor der Praxisanlage I hatte das Gärsubstrat einen durchschnittlichen pH-Wert von 7,7 und in der Praxisanlage II kam es zu einer Alkalisierung vom Reaktor 1 (pH-Wert 5,3 - 6,6) bis zum Reaktor 3 (pH-Wert 7,7 - 8,3). Ein pH-Wert von 7,5 lag auch bei der halbtechnischen Anaerobanlage bei OECHSNER (1996) an, als die höchsten Biogasausbeuten erzielt wurden.

Als quantitatives Maß für die Elektronenaffinität, das heißt für die freie Energie einer Reaktion und damit als Maß für die Oxidations- und Reduktionsfähigkeit des Systems wurde das Redoxpotential mittels eines Voltmeters bestimmt. Das Redoxpotential war stets negativ und wurde bei der mesophilen Prozeßführung durchschnittlich mit -515 mV gemessen. Dies bedeutet, daß das Redoxsystem einen großen Elektronendruck bzw. eine geringe Elektronenaffinität hatte. Das Reduktionsvermögen des untersuchten Systems war im thermophilen Bereich bei der Vergärung von 50 % Bioabfall noch größer. Der durchschnittliche Wert für das Redoxpotential betrug -605 mV.

Das Redoxpotential kennzeichnet neben den Exoenzymen und dem Säuregehalt das allgemeine Milieu der anaeroben Gärung, welches als solches hemmend oder abtötend auf die Pathogene wirkt. Dagegen soll die Anaerobie, also das Fehlen des Sauerstoffes, nur von untergeordneter Bedeutung für die Hygienisierung sein (WIEMER & KERN 1996). Die Hygienisierungswirkung einer Biogasanlage wird insgesamt von den physikalisch-chemischen Bedingungen, von der tatsächlichen Verweilzeit des Substrates in der Anlage sowie von der Betriebstemperatur bestimmt.

Die Anaerobanlage im Labormaßstab kann als ein repräsentatives Modell für Praxisanlagen im Großmaßstab gewertet werden. Dafür sprechen der Anlagenaufbau (Einkammersystem, integriertes Rührwerk, externe Beheizung), die Art der Betriebsführung bei den relevanten Temperaturbereichen (mesophil, thermophil), die Zusammensetzung der verwendeten Substrate (Gülle, Speiseabfälle, Bioabfälle) und die Verweilzeit des Substrates in der Anlage. Auch die ermittelten Meßparameter in den einzelnen Anlagen und nicht zuletzt die erzielten Ergebnisse zur Inaktivierung der Prüforganismen belegen diese Annahme.

Einschränkend muß festgestellt werden, daß für den Bereich der Phytohygiene nur an zwei Praxisanlagen für die anaerobe Abfallbehandlung Untersuchungen stattfinden konnten. Ein Grund dafür ist in den baulichen Gegebenheiten solcher gewerblicher Großanlagen zu sehen, welche es technisch nicht immer zulassen, die entsprechenden Keimträger mit den

Prüforganismen direkt in den Gärreaktor einzubringen. Deshalb sind die in den Hinweisen zum Vollzug der Bioabfallverordnung (BioAbfV 2000) für Anaerobanlagen geforderten bautechnischen Gegebenheiten, wie zum Beispiel Zugangsöffnungen zum Reaktor, unbedingte Voraussetzung für eine erfolgreiche Untersuchung im Rahmen einer direkten Prozeßprüfung.

5 Zusammenfassung

Zur Überprüfung der thermischen Inaktivierung der phytopathogenen Leiterreger bzw. Indikatororganismen Tabak-Mosaik-Virus (TMV), *Plasmodiophora brassicae* (Erreger der Kohlhérnie) und Tomatensamen der Sorte St. Pierre unter anaeroben Bedingungen wurden Versuche im Schema einer "direkten Prozeßprüfung" in einer Anaerobanlage unter halbtechnischen Bedingungen durchgeführt. Weiterhin wurde die Inaktivierung von Tomatensamen und *P. brassicae* an einer sowie von TMV an zwei gewerblichen Großanlagen überprüft. Zur Verifizierung der in den Anaerobanlagen gewonnenen Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen in einer Pasteurisierungsanlage und unter Verwendung eines Wasserbades vorgenommen. Die Bestimmung des thermischen Inaktivierungspunktes bei feuchter Hitze fand zusätzlich für Samen der Unkrautarten Acker-Hundskamille (*Anthemis arvensis*), Floh-Knöterich (*Polygonum persicaria*), Flughafer (*Avena fatua*), Geruchlose Kamille (*Matricaria maritima*) und Stumpfblättriger Ampfer (*Rumex obtusifolius*) in Wasserbadversuchen statt.

5.1 Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

Als besonders problematisch stellte sich erwartungsgemäß die Inaktivierung von TMV in Einlegeproben aus Blattmaterial dar. Nach einer Verweilzeit der Einlegeproben von 21 Tagen bei Verwendung von drei verschiedenen Gärsubstraten wurde sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Bedingungen keine Abnahme der Infektiosität von TMV festgestellt. Die an der halbtechnischen Anaerobanlage im Labormaßstab gewonnenen Ergebnisse konnten durch die Untersuchungen an zwei thermophilen Vergärungsanlagen unter Praxisbedingungen bestätigt werden.

Für die Pasteurisierung konnte festgestellt werden, daß eine einstündige Erhitzung bei 70 °C nicht ausreichend war, um TMV zu inaktivieren. Dieses Ergebnis konnte bei Versuchen mit verschiedenen Qualitäten des Einlegematerials (Blattproben, Suspensionen) und bei Verwendung variierender Keimträger (Volumenkeimträger, Keimträger aus Dialysematerial und Miederware) sowie durch die Versuche bei direkter Einbringung von infiziertem Pflanzenmaterial in das Pasteursubstrat bewiesen werden. Der kritische Temperaturbereich für eine Inaktivierung von TMV bei einer einstündigen Pasteurisierung liegt noch oberhalb von 80 °C.

Es konnte auch gezeigt werden, daß die Kombination aus einer Vorpasteurisierung der Proben und anschließender Vergärung nicht ausreicht, um TMV zu inaktivieren. Dies gilt sowohl für

eine mesophile als auch für eine thermophile Nachvergärung über die maximale Verweilzeit von 21 Tagen in der Anaerobanlage.

Nach den hier dargestellten Untersuchungen und unter Berücksichtigung der publizierten Ergebnisse in der Literatur muß bezweifelt werden, daß bei einer mesophilen Vergärung eine hinreichende Inaktivierung des Virus erreicht werden kann, auch wenn diese zusätzlich mit einer Vor- oder Nacherhitzung kombiniert wird. Für die thermophile Vergärung wurde dieselbe Tendenz einer unzureichenden Inaktivierung des Virus ermittelt. Die Frage, welche Bedingungen bei einer thermophilen, anaeroben Vergärung zu einer erfolgreichen Eliminierung von TMV notwendig sind, kann erst nach weiteren Untersuchungen abschließend beantwortet werden.

Zu der in der BIOABFV (1998) genannten Methodik zu TMV sind einzelne Punkte diskutierbar. So sollte eine Verschleppung des Virus innerhalb der Proben bei der Probenaufbereitung vermieden werden, indem für jede einzelne Probe ein sterilisierter Mörser zur Homogenisierung verwendet wird. Die Applikationsmenge der gewonnenen Extrakte für die Inokulation im Biotest wird in der BIOABFV (1998) nicht festgelegt. Um bei diesem Arbeitsschritt eine Konstante zu erhalten, könnten zum Beispiel jeweils 20 µl der Probensuspension je Blatt bzw. je Blatthälfte inokuliert werden. Jede Probe sollte an etwa drei Testpflanzen mit je zwei bis drei Blättern inokuliert werden. Zur Auswertung berücksichtigt werden sollte dasjenige Blatt jeder Testpflanze mit der größten Anzahl an Läsionen. Über die Läsionenzahlen der drei so bestimmten Blätter eines Probensatzes könnte dann ein Mittelwert gebildet werden, welcher den in der BIOABFV (1998) genannten Richtwert von ≤ 8 Läsionen nicht überschreiten darf.

Die Aufbringung von Probenextrakt und Positivkontrolle (TMV Suspension) auf einem Blatt nach der Halbblattmethode von WALKEY (1991, in BIOABFV 1998) kann sich infolge einer möglichen Verschleppung aus der Kontrollhälfte in die Probenhälfte des mechanisch leicht übertragbaren Virus als problematisch erweisen. Um jede Schwierigkeit bei der Interpretation von auftretenden Läsionen zu vermeiden, sollten die Kontrollen stets an Extrapflanzen inokuliert werden, welche jedoch zur selben Versuchsanzucht gehören müssen.

Die nekrotischen Lokalläsionen werden an den Testpflanzen bei positiven Befund mitunter bereits nach zwei Tagen sichtbar. Der in der BIOABFV (1998) genannte Zeitraum von zehn Tagen bis zum Beginn der Auszählung kann infolge einer flächigen Nekrosebildung auf dem Blatt bereits zu lang sein, um klar erkennbare Läsionen auszählen zu können. Die Bonitur der Läsionen sollte deshalb zu dem Zeitpunkt erfolgen, ab welchem diese deutlich zu erkennen sind, und sich auch an den Erfahrungswerten der Bearbeiter orientieren.

Die teilweise große Variabilität der Ergebnisse im Biotest kann es notwendig machen, die Überprüfung der Proben auf TMV im Nachweisverfahren zu wiederholen. Deshalb sollten Rückhalteproben der Extrakte aufbewahrt werden. Ausreichend dafür sind kleine Mengen, welche zum Beispiel bequem in Reaktionsgefäßen (Tubes) eingefroren werden können.

Zur Vereinfachung des Testverfahrens bzw. zur Reduzierung des Untersuchungsaufwandes ist eine Verringerung des Probenumfangs denkbar. Wenn in gewerblichen Anaerobanlagen zum Beispiel nur drei Stutzen zur Probenbeschickung zur Verfügung stehen, sollte es möglich sein, jeweils nur eine Probe mit einer Wiederholung zu verwenden.

Eine Übertragung, der für die Kompostierung verwendeten Methodik zur Prüfung der Hygienisierung von phytopathogenen Keimen während der aeroben Bioabfallbehandlung, ist nicht ohne weiteres auf die anaerobe Abfallbehandlung in Vergärungsanlagen möglich. Besonders hinsichtlich der Verwendung des phytopathogenen Testorganismus Tabak-Mosaik-Virus (TMV) als viralen Leiterreger, welcher sich als aussagekräftiger Prüforganismus bei der Kompostierung bewährt hat, gibt es für Anaerobanlagen Bedenken. TMV wurde aufgrund seiner hohen Thermoresistenz als viraler Indikatororganismus ausgewählt. Seine epidemiologische oder wirtschaftliche Bedeutung ist im Vergleich zu anderen Pflanzenviren eher von geringerer Relevanz. Deshalb sollte hinsichtlich der Überprüfung der phytohygienischen Wirksamkeit von Anaerobanlagen auch die Verwendung anderer Viren als Prüforganismen diskutiert werden.

5.2 *Plasmodiophora brassicae*

Die dargestellten Untersuchungen zu *P. brassicae* zeigen, daß die in der BIOABFV (1998) geforderten Bedingungen für eine mesophile Betriebsführung (mit Vor- oder Nachbehandlung bei 70 °C, 1 h) und für eine thermophile Prozeßführung (55 °C mindestens 24 h) ausreichend sind, um den Pilz vollständig zu inaktivieren. Bei einer mesophilen Prozeßführung kann auf eine zusätzliche Erhitzung verzichtet werden, wenn eine tatsächliche Verweilzeit von 20 Tagen in der Anlage gewährleistet werden kann.

Die Verwendung von *P. brassicae* Gallenmaterial als aussagekräftiger Prüforganismus für Untersuchungen zur Hygienisierung von Abfällen sowohl bei aerober als auch bei anaerober Abfallbehandlung hat sich bewährt. Als pilzlicher Leiterreger der Phytohygiene zeichnet sich *P. brassicae* insbesondere durch eine Temperaturreistenz aus, die höher liegt als die anderer phytopathologisch relevanter Erreger.

Hinsichtlich der in der in BIOABFV (1998) aufgeführten Methodik zu *P. brassicae* sollte eine ergänzende Forderung sein, das Infektionspotential der Einlegeproben des Pilzes bereits vor einer direkten Prozeßprüfung einer Biogasanlage zu überprüfen. Dies ist notwendig, um sicherzustellen, daß infektiöses Gallenmaterial verwendet wird, da zum Beispiel ein mehrmaliges Auftauen und wieder Einfrieren der Gallen der Infektiosität des Pilzes abträglich ist. Die geernteten Wurzelgallen sollten deshalb unzerkleinert und portioniert eingefroren werden, um so das volle Infektionspotential von *P. brassicae* zu erhalten.

Nach der Rückgewinnung der Proben sollte das Gallenmaterial im Biotest auf mehrere Gefäße aufgeteilt werden (z.B. 10 g Einlegeprobe auf fünf 500 ml Töpfe), um somit Wiederholungen der Proben zu erhalten. Die Töpfe müssen dabei untereinander so abgeschirmt werden, daß eventuell durch Gießwasser ausgeschwemmte Pilzsporen nicht zu einer Infektion in Nachbartöpfen führen können.

Die Bewertung der Wurzelgallenbildung befallener Pflanzen nach einer Boniturskala mit Befallsklassen von 0 bis 3 sollte überdacht werden. Eine objektive Bewertung der Testpflanzen wäre allein die Feststellung ob ein positiver oder negativer Befund vorliegt.

5.3 Tomatensamen

Der thermische Inaktivierungspunkt der verwendeten Samen bei feuchter Hitze lag zwischen 65 °C und 67 °C. Unter thermophilen Bedingungen genügt eine Verweildauer von 24 Stunden in einer Anaerobanlage, um die Keimfähigkeit der Samen vollständig zu hemmen. In den Wasserbadversuchen konnte gezeigt werden, daß bereits eine Verweilzeit von etwa 90 Minuten bei einer Temperatur von 55 °C ausreicht, um die Samen zu inaktivieren. Auch eine Pasteurisierung oder eine Verweildauer von 21 Tagen in der Anaerobanlage unter mesophilen Bedingungen erbrachten eine vollständige Inaktivierung der Samen.

Die Prüfmethodik für Tomatensamen ist gut erprobt, wobei man über den Sinn der in der BioAbfV (1998) verlangten Rückhalteproben von der Hälfte der Samen diskutieren könnte. Auf diese Forderung kann möglicherweise verzichtet werden, da die zu untersuchenden Proben sowieso jeweils in drei Wiederholungen (4 x 50 Samen) ausgelegt werden.

Neben Tomatensamen könnte sich auch die Verwendung von Samen der Art *R. obtusifolius* als Prüforganismen, welche in den Wasserbadversuchen eine etwas höhere Thermoresistenz gegenüber Tomatensamen aufwiesen, als sinnvoll erweisen. Bei Anwendung einer ähnlichen Prüfmethodik wie für Tomatensamen deuten erste Ergebnisse außerdem auf eine ebenso hohe und ausgeglichene Keimfähigkeit der Samen hin.

6 Literatur

- BIOABFV (1998): Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung – BioAbfV) vom 21. September 1998. In: Bundesgesetzblatt, Teil I, G 5702, Nr. 65, Bonn
- BIOABFV (2000): Hinweise zum Vollzug der Bioabfallverordnung vom 24. August 2000. Bund-Länder-Arbeitsgruppe (BMU)
- BRUNS, C.; GOTTSCHALL, R.; SCHÜLER, C.; VOGTMANN, H. (1989): Phytohygiene. In: Tagungsband "1. Witzenhäuser Abfalltage", Bd. 1: 245-252
- DITTMER, U.; BUDDE, K.; STINDT, A.; WELTZIEN, H. C. (1990): Der Einfluß der Kompostierung von Kompostsubstraten und wässrigen Kompostextrakten auf verschiedene Pflanzenkrankheitserreger. In: Gesunde Pflanzen, 42. Jahrg., Heft 7: 219-235
- HERRMANN, I.; MEISSNER, S.; BÄCHLE, E.; RUPP, E.; MENKE, G.; GROSSMANN, F. (1994): Einfluß des Rotteprozesses von Bioabfall auf das Überleben von phytopathogenen Organismen und von Tomatensamen. In: Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **101** (1): 48-65
- HOPPENHEIDT, K.; CYRIS, T.; MÜCKE, W. (1997): Hygienekontrollen bei Verfahren und Produkten der biologischen Abfallbehandlung. In: LfU-Fachtagung: Hygienefragen in der Abfallwirtschaft, Wackersdorf: 139-155
- KERN, M. (1999): Übersicht über ökonomische Rahmenbedingungen bei der Kompostierung und der Anaerobbehandlung. In: Biologische Abfallbehandlung: erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 7. Hohenheimer Seminar, Stuttgart-Hohenheim, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Giessen, Bd. 1: 95-111

- MARCINISZYN, E.; GOTTSCHALL R. (1999): Phytohygienische Bewertung von Anaerob- und Kompostierungsverfahren. In: Biologische Abfallbehandlung: erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 7. Hohenheimer Seminar, Stuttgart-Hohenheim, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Giessen, Bd. 1: 125-133
- MENKE, G.; GROSSMANN, F. (1971): Einfluß der Schnellkompostierung von Müll auf Erreger von Pflanzenkrankheiten. In: Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Bd. 78 (2): 75-84
- OECHSNER, H. (1996): Kofermentation von Flüssigmist und Speiseabfällen. In: Landtechnik, 51. Jahrgang, Nr. 4
- PHILIPP, W. (1999): Seuchenhygienische Bewertung von Kompostierungsverfahren. In: Biologische Abfallbehandlung: erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 7. Hohenheimer Seminar, Stuttgart-Hohenheim, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Giessen, Bd. 1: 134-149
- RAPP, A. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Biogemeinschaftsanlagen. Dissertation, Universität Hohenheim
- TRÄNKNER, A. (1991): Phytosanitäre Wirkungen von Kompost. In: Lebendige Erde, Heft 1: 14-20
- WEILAND, P. (1999): Übersicht über angewendete Anaerobverfahren zur biologischen Abfallbehandlung. In: Biologische Abfallbehandlung: erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, 7. Hohenheimer Seminar, Stuttgart-Hohenheim, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Giessen, Bd. 1: 83-94
- WIEMER, K.; KERN, M. (1996): Biologische Abfallbehandlung III, Kompostierung, Anaerobtechnik, Mechanisch-biologische Abfallbehandlung, Klärschlammverwertung, Abfallwirtschaft, Neues aus Forschung und Praxis, M. I. C. Baeza-Verlag, Witzenhausen

7 Anlagen

LORENZ, H.; CHAMSAI, J.; HELLWALD, K.-H.; BUCHENAUER, H. (2000): Untersuchungen zur Phytohygiene bei der anaeroben Vergärung am Beispiel ausgewählter Prüforganismen. In: 52. Deutsche Pflanzenschutztagung: in Freising-Weihenstephan, 9.-12. Oktober 2000. Hrsg. von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig, Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Verlag Parey, Berlin, Heft **376**: 541-542

Beitrag 676:

Untersuchungen zur Phytohygiene bei der anaeroben Vergärung am Beispiel ausgewählter Prüforganismen

Studies on phytohygienic aspects of anaerobic fermentation by using selected test organisms

Biologische Abfälle, welche einer Wiederverwertung zugeführt werden sollen, können unterschiedliche phytopathogene Erreger enthalten. Deshalb muss eine Hygienisierung während der biotechnologischen Aufbereitung der Abfälle (Kompostierung oder Vergärung) gewährleistet sein, um phytohygienisch unbedenkliche Produkte (Komposte bzw. Gärrückstände) zu erhalten. Ziel dieses Projektes ist es, spezifische Untersuchungsmethoden zur Prüfung der Hygienisierung von Anaerobanlagen zu entwickeln. Neben der Vergärung von Bioabfällen werden auch die anaerobe Behandlung von Gülle und die Kofermentation (Gülle/Speisereste/Bioabfälle) untersucht.

Gepprüft wird die Inaktivierung der in der Bioabfallverordnung (BioAbfV 01.10.98) genannten Prüforganismen Tabakmosaikvirus (Einlegeproben: Blattmaterial), der Erreger der Kohlhernie *Plasmodiophora brassicae* (Einlegeprobe: Gallenmaterial von Kohlpflanzen) und Tomatensamen der Sorte *Lycopersicon lycopersicon* St. Pierre im Labormaßstab mit Hilfe einer Pasteurierungsanlage (50 l Volumen) und einer halbtechnischen Anaerobanlage (400 l Volumen). Darüber hinaus werden Untersuchungen in Praxisanlagen durchgeführt. Die Proben werden mittels Diffusionskeimträgern aus Polycarbonat (15 ml Volumen) und alternativer Keimträger in die Anlagen eingebracht. Die Prüfung des Infektionspotentials der eingebrachten Proben erfolgt nach der Behandlung mittels Biotests.

Teil 2 A:

**Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikatororganismen in
anaeroben Kofermentationsanlagen**

von

Tierärztin Andrea Knie

Dr. W. Philipp

Dr. W. Martens

Prof. Dr. R. Böhm

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorbemerkung.....	1
1.2	Problemstellung.....	1
1.3	Zielsetzung	2
1.4	Literatur	2
2	Material und Methoden	9
2.1	Beschreibung der beprobten Anlagen	9
2.1.1	Vorbemerkung.....	9
2.1.2	Modellanlagen	9
2.1.2.1	Anaerobe Vergärungsanlage (AV).....	9
2.1.2.2	Pasteurisierungseinheit (PE).....	12
2.1.3	Praxisanlagen.....	13
2.1.3.1	Kofermentationsanlage „H“ in Hessen.....	13
2.1.3.2	Kofermentationsanlage „B“ in Bayern.....	15
2.1.4	Versuchsvarianten	17
2.1.4.1	Versuchsvarianten in den Modellanlagen	17
2.1.4.2	Versuchsvarianten in den Praxisanlagen	18
2.2	Verwendete Testorganismen	18
2.3	Mikrobiologische Untersuchungsmethoden.....	19
2.3.1	Bakteriologische Methoden.....	19
2.3.1.1	Vorbemerkung.....	19
2.3.1.2	Herstellung einer Verdünnungsreihe.....	19
2.3.1.3	Das MPN-Verfahren.....	20
2.3.1.4	Herstellung der Keimsuspensionen	20
2.3.1.5	Untersuchung auf Salmonellen.....	21
2.3.1.6	Untersuchung auf <i>Escherichia coli</i>	22
2.3.1.7	Untersuchung auf Fäkalstreptokokken.....	23
2.3.1.8	Untersuchung auf <i>Clostridium perfringens</i>	23
2.3.1.9	Untersuchung auf <i>Campylobacter jejuni</i>	26
2.3.2	Virologische Methoden	27
2.3.2.1	Vorbemerkung.....	27
2.3.2.2	Zellkulturen	27
2.3.2.3	Virusvermehrung.....	28
2.3.2.4	Virusnachweis	29
2.3.3	Keimträgermethoden	31

2.3.3.1	Vorbemerkung.....	31
2.3.3.2	Volumenprüfkörper	31
2.3.3.3	Sandwichkeimträger.....	32
2.4	Bestimmung der D-Werte.....	33
3	Ergebnisse.....	36
3.1	D-Werte der verwendeten Testorganismen im Wasserbad	36
3.2	Modellanlagen	39
3.2.1	Bakteriologischer Status im Substrat.....	39
3.2.2	Prüfkörperversuche im mesophilen Temperaturbereich	48
3.2.2.1	Versuche mit Bakterien	50
3.2.2.2	Versuche mit bovinem Parvovirus	54
3.2.3	Prüfkörperversuche in der Pasteurisierung.....	57
3.2.3.1	Versuche mit Bakterien	57
3.2.3.2	Versuche mit bovinem Parvovirus	59
3.2.4	Prüfkörperversuche im thermophilen Temperaturbereich.....	60
3.2.4.1	Versuche mit Bakterien	63
3.2.4.2	Versuche mit bovinem Parvovirus	72
3.2.4.3	D-Werte der verwendeten Testorganismen in der Modellanlage.....	73
3.2.5	Versuche mit Keimsuspensionen im mesophilen Temperaturbereich	79
3.2.6	Versuche mit Keimsuspensionen in der Pasteurisierung.....	79
3.2.6.1	Pasteurisierung unter Berücksichtigung der Aufheizphase.....	80
3.2.6.2	Pasteurisierung ohne Berücksichtigung der Aufheizphase	81
3.2.6.3	<i>Clostridium perfringens</i> in der Pasteurisierung.....	83
3.3	Praxisanlagen.....	84
3.3.1	Kofermentationsanlage „H“ in Hessen.....	84
3.3.1.1	Bakteriologischer Status im Substrat.....	84
3.3.1.2	Prüfkörperversuche mit Bakterien.....	86
3.3.1.3	Keimträgerversuche mit bovinem Parvovirus	89
3.3.2	Kofermentationsanlage „B“ in Bayern	89
3.3.2.1	Bakteriologischer Status im Substrat.....	90
3.3.2.2	Prüfkörperversuche mit Bakterien.....	93
3.3.2.3	Keimträgerversuche mit bovinem Parvovirus	96
4	Diskussion	97
4.1	Vorbemerkungen	97
4.2	Beurteilung der Input/Output-Prüfungen	98
4.3	Beurteilung der Prüfkörperversuche im mesophilen Temperaturbereich	100
4.4	Beurteilung der Prüfkörperversuche im thermophilen Temperaturbereich.....	102

4.5	Beurteilung der verwendeten Prüfkörper/Keimträger	103
4.6	Beurteilung der Versuche mit <i>Clostridium perfringens</i>	104
4.7	Beurteilung der Versuche mit <i>Campylobacter jejuni</i>	104
4.8	Beurteilung der Prozeßparameter	105
4.9	Beurteilung der Praxisversuche	106
4.10	Beurteilung der verwendeten Indikatororganismen	108
4.11	Schlußfolgerungen	109
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	116
7	Anhang	124
7.1	Puffer und Lösungen	124
7.2	Abkürzungen	126

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Diese Untersuchung wurde im Auftrag des Forschungszentrums Karlsruhe, vertreten durch die Baden-Württemberg-Projektträgerschaft „Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung“ (BWPLUS) durchgeführt. Auftragnehmer war die Universität Hohenheim, die ihrerseits die beiden Institute „Umwelt-und Tierhygiene“ sowie „Phytomedizin“ in das Forschungsvorhaben einband. Die Untersuchungen fanden in der Zeit vom 01.03.1999 bis 31.03.2001 statt.

1.2 Problemstellung

Biologische Abfälle, die unbehandelt der Wiederverwertung zugeführt werden, enthalten unterschiedliche human-, tier- und phytopathogene Erreger, die durch die biotechnologische Aufbereitung eliminiert bzw. inaktiviert werden müssen.

Zum Verhalten in Anaerobanlagen und zu den Inaktivierungsmechanismen von Erregern mit seuchen- und phytohygienischer Bedeutung ist bisher keine grundlegende Datenbasis vorhanden. Anaerobe Kofermentationsanlagen gewinnen aber zunehmend an Bedeutung, da nicht nur landwirtschaftliche Abfälle, wie Gras und Silage verarbeitet und energetisch genutzt werden können, sondern vor allem auch industrielle Abfälle, wie Brennereschlempe, Altfett und Fettabscheiderinhalt.

Daher werden in parallelen seuchen- und phytohygienischen Untersuchungen zunächst in einer halbtechnischen Anaerobanlage mit ca. 400 l Faulrauminhalt sowie in einer Laborpasteurierungsanlage mit ca. 50 l Inhalt vergleichende Untersuchungen zum Überlebensverhalten der Keime *Streptococcus faecium*, *E. coli*, *Salmonella senftenberg*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* sowie *Plasmodiophora brassicae* und Tabak-Mosaik- sowie zusätzlich Parvovirus in Tenazitätsversuchen, mit Hilfe der weiterentwickelten „Keimträgertechnik“ durchgeführt.

Die in der Modellanlage erarbeiteten Ergebnisse werden anschließend an Praxisanlagen verifiziert.

Die Modellanlagen (Pasteur und Anaerobanlage) werden, je nach Versuchsanordnung, mit Gülle, Speise- und/oder Bioabfällen in unterschiedlichen Verhältnissen beschickt.

1.3 Zielsetzung

Es sollen vergleichende Daten zum Verhalten und den Inaktivierungsmechanismen von ausgewählten Erregern mit seuchen- und phytopathogener Bedeutung in Anaerobanlagen gewonnen werden. Diese Daten werden hauptsächlich mit einer speziellen „Keimträgertechnik“ erarbeitet. Die zu untersuchenden Erreger werden sowohl in die Pasteurisierungseinheit als auch den Laborfermenter eingebracht um darin deren Überlebensfähigkeit bei verschiedenen Substratkombinationen sowie variierenden Temperaturhöhen und veränderten Zeiteinwirkungen bestimmen zu können.

Als naheliegendes Ziel des Projektes ergibt sich, die bisher fehlenden Daten zu erarbeiten und die notwendigen praktischen Erfahrungen zu sammeln. Dabei müssen abgesicherte Daten zur Festlegung der notwendigen Betriebsbedingungen für Anaerobanlagen (z. B. Temperaturhöhe und Dauer der Einwirkung; Pasteurisierung vor bzw. nach der anaeroben Faulung; alleinige thermophile Vergärung (z. B. bei 53-55 °C) mit denen ein aus seuchen- und phytohygienischer Sicht einwandfreies und unbedenkliches Endprodukt garantiert werden kann, erhoben werden.

Ferner muß vor diesem Hintergrund und nach den festgestellten Ergebnissen auch die Frage geklärt werden, ob die gleichen Prüfkeime, wie sie für die Überwachung von Kompostierungsanlagen benutzt werden, für Anaerobanlagen, unter Berücksichtigung ihrer epidemiologischen Relevanz, ebenfalls sinnvoll und geeignet sind.

1.4 Literatur

Mit dem Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (KrW-/AbfG), das am 07. Oktober 1996 in Kraft trat, wurden die Weichen für eine Abfallbehandlung im Sinne einer Kreislaufwirtschaft gestellt (PHILIPP & BÖHM, 1997), so besagt der §1 des Gesetzes, es sei Zweck, die **Kreislaufwirtschaft** zur Schonung der natürlichen Ressourcen zu fördern und die umweltverträgliche Beseitigung von Abfällen zu sichern (ANONYM, 1994). In erster Linie sind Abfälle zu vermeiden. Nicht vermeidbare biogene Abfälle sollen stofflich und energetisch verwertet werden. Nicht vermeidbare oder verwertbare Abfälle sind umweltgerecht zu beseitigen (SCHNEPEL, 1997).

In diesem Zusammenhang gewinnen **anaerobe Vergärungsverfahren** zunehmend an Bedeutung, da sie sowohl zur Verwertung (stofflich und energetisch), als auch zur Beseitigung biogener Abfälle gleichermaßen eingesetzt werden können (WEILAND, 1997).

Eine Besonderheit dieser anaeroben Gärverfahren stellt die **Kofermentation** dar. Hierunter ist die gemeinsame Verwertung von Gülle, Jauche oder auch speziell vorbehandeltem Festmist,

zusammen mit landwirtschaftlichen (Ernterückstände, verdorbene Silage, Energiepflanze), kommunalen (Speiseabfälle, Rasenschnitt, Bioabfall, Schlachthofabfälle), gewerblichen oder agroindustriellen Abfällen unter Gewinnung von Biogas zu verstehen (STRAUCH, 1997).

Die stete Erwärmung der Erdatmosphäre stellt eines der größten Probleme unserer Zeit dar, für das der steigende Anteil an Kohlendioxid verantwortlich gemacht wird. Es wird deshalb, vor allem an die Industriestaaten, die Forderung gestellt, die CO₂-Produktion zu senken. Der Betrieb einer technischen Anlage zur aeroben Rotte von Bioabfall verursacht eine zusätzliche CO₂-Emission. Dagegen entsteht bei der anaeroben Vergärung von Bioabfällen Biogas, das energetisch genutzt werden kann und so zu einer Verringerung der künstlichen CO₂-Last beiträgt (KÜBLER, 1994).

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 & KUHN, 1998).

Es bleibt aber zu bedenken, daß viele dieser Reststoffe **Krankheitserreger** enthalten können, die vor oder im Verlauf der Kofermentation oder im Anschluß daran inaktiviert werden müssen. Nach der, 1991 erlassenen und 1997 zuletzt geänderten, Düngemittelverordnung (DüMV) dürfen Düngemittel nur in den Verkehr gebracht werden, wenn sie im Hinblick auf die Verursachung von Krankheiten bei Mensch oder Tier durch Übertragung von Krankheitserregern und Schäden an Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen oder Böden durch Verbreitung von Schadorganismen unbedenklich sind (ANONYM, 1997). Es gilt festzustellen, ob die im Anhang 2 der Bioabfallverordnung (BioAbfV) (ANONYM, 1998) definierten Bedingungen zur **seuchenhygienischen Unbedenklichkeit** von Komposten und Gärrückständen aus Anaerobanlagen ausreichend sind.

Danach muß die Abfallmatrix so behandelt werden, daß eine Mindesttemperatur von 55 °C über einen zusammenhängenden Zeitraum von 24 h, sowie eine hydraulische Verweilzeit im Reaktor von mindestens 20 d erreicht wird. Bei niedrigeren Betriebstemperaturen oder kürzerer Einwirkungszeit muß entweder eine thermische Vorbehandlung der Inputmaterialien (70 °C; 1 h) oder eine entsprechende Nachbehandlung der Produkte (Erhitzung auf 70 °C; 1 h) bzw. eine aerobe Nachrotte der separierten Gärrückstände (Kompostierung) durchgeführt werden (ANONYM, 1998).

Die Art und Herkunft der Rest- und Abfallstoffe bestimmen die **Hygienerisiken** für die Anaerobbehandlung. Es muß deshalb weiter gefordert werden, daß zur Vorbeugung der ständigen Seuchengefahr in großen Anaerobanlagen zur Verwertung privater und gewerblicher Bioabfälle die Grundbedingungen des Tierkörperbeseitigungsrechtes, des Tierseuchengesetzes sowie der Schweinehaltungs-Hygieneverordnung einzuhalten sind (PHILIPP et al., 2000).

Auch an die **Prozeßhygiene** werden durch die BioAbfV, Anhang 2 Anforderungen gestellt: die direkte Prozeßprüfung (kann im Rahmen der „Kleinanlagenregelung“ entfallen), die Produktprüfung und die indirekte Prozeßprüfung. Zur direkten Prozeßprüfung werden Prüfkeime (*Salmonella senftenberg* W775) in speziellen Prüfkörpern dem Verfahren ausgesetzt, um dessen Wirksamkeit aus hygienischer Sicht zu überprüfen. Ergänzend werden Materialproben auf native Salmonellen untersucht. Bei der indirekten Prozeßprüfung werden kontinuierliche Temperaturmessungen vorgenommen. Im Rahmen einer Fremdüberwachung sollen Produktprüfungen ein einwandfreies Endprodukt gewährleisten.

Erst wenn alle Prüfungsanforderungen erfüllt sind, wird ein Produkt durch die BioAbfV, Anhang 2, Abs. 2.2 (ANONYM, 1998) als hygienisch unbedenklich eingestuft.

Da es keinen universellen Prüfkeim bzw. **Indikatororganismus** gibt, werden im Rahmen dieser Arbeit über den von der BioAbfV geforderten Testorganismus „*S. senftenberg*“ hinaus noch eine Reihe weitere Organismen im anaeroben Vergärungsverfahren eingesetzt und ihre Tenazität beschrieben.

Indikatororganismen sind Keime oder Keimgruppen, auf deren Nachweis sich die hygienisch-mikrobiologische Untersuchung beschränkt. Sie zeigen den hygienischen Status eines Produktes an, wobei eine Infektionsgefahr nicht zwangsläufig bestehen muß. Indikatororganismen sollten nativ im zu untersuchenden Material vorkommen und sich möglichst schnell und einfach sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisen lassen (SOLDIERER, 1991).

Das Überlebensverhalten von Erregern in der Umwelt (Wasser, Boden, Luft) wird durch unterschiedliche Faktoren gegenseitig beeinflusst.

BÖHM (1995) nennt in diesem Zusammenhang drei Faktoren:

- physikalische Faktoren (z.B. Strömung, Sedimentation)
- biologische Faktoren (z.B. Absterbekinetik, Vermehrung, Antagonismus)
- saisonale Faktoren (z.B. Temperatur, Feuchte, Nährstoffangebot)

In Gülle und biogenen Abfällen sind viele verschiedene Mikroorganismen enthalten, die hier optimale Lebensbedingungen finden. Entsprechend der Sauerstoffversorgung können sich obligate Aerobier, obligate Anaerobier oder fakultative Anaerobier im Flüssigmist vermehren

und zum Substratabbau beitragen (SCHLEGEL, 1985). Human- und/oder tierpathogene Keime sind jedoch eher selten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden **Keime** ausgewählt, die für die menschliche und tierische Gesundheit bedenklich erscheinen oder sich unter den in der Gülle vorherrschenden Bedingungen als resistent erweisen. Es handelt sich dabei im Einzelnen um *Salmonella senftenberg*, *Escherichia coli* und *Streptococcus faecium* als Vertreter der aeroben Bakteriengruppe, um *Clostridium perfringens* als anaerober Sporenbildner, *Campylobacter jejuni* als mikroaerophiler Keim und letztendlich um das Bovine Parvovirus.

Salmonellen sind weltweit verbreitet und spielen vor allem in Ländern mit intensiver Tierhaltung eine wichtige Rolle. Salmonellosen treten häufig als latente Infektionen, aber auch klinisch als Enteritiden, als Septikämie, Abort und Organerkrankungen in Erscheinung.

Es handelt sich um plumpe, gramnegative, sporenlose, mit einer Ausnahme bewegliche Stäbchenbakterien, die auch außerhalb des tierischen (und menschlichen) Organismus lange lebensfähig sind. Sie sind gegen Kälte resistent.

Zu einer Infektion kommt es durch Ausscheidungen Kranker, oder klinisch gesunder Ausscheider, durch verunreinigtes Oberflächenwasser oder salmonellenhaltige Lebens- bzw. Futtermittel. Als Voraussetzung für die pathogene Wirkung wird heute die Fähigkeit zur Anhaftung der Erreger an die Dünndarmschleimhaut angesehen (ROLLE & MAYR, 1993).

SOLDIERER et al. (1991) führten Untersuchungen mit 13 verschiedenen Salmonellenstämmen aus 9 verschiedenen Serovaren auf Hitzeresistenz in Gülle durch. Dabei stellten sie fest, daß *Salmonella senftenberg* wesentlich resistenter gegen Hitze ist, als die 12 Vergleichsstämme. *Salmonella senftenberg* erweist sich deshalb als gut geeignetes Untersuchungsobjekt, da bei seiner Inaktivierung davon ausgegangen werden kann, daß alle anderen Stämme durch die Hitzebehandlung bereits abgetötet wurden. Darüber hinaus gilt dieser Stamm als nicht infektiös und damit als unbedenklich für die Umwelt.

Der wichtigste Vertreter in der Familie der Enterobacteriaceae ist die Spezies *Escherichia coli*, ein normaler Bewohner des Dickdarms des Menschen und der meisten warmblütigen Tiere. Vor allem bei Jungtieren werden aber auch enterotoxische oder enterotoxämische Enteropathien oder Septikämien verursacht. Meist handelt es sich dabei um infektiöse Faktorenkrankheiten.

E.coli ist ein plumpe, gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchen, das gut auf gewöhnlichen Nährböden wächst (ROLLE & MAYR, 1993). Der exakte Nachweis von *E. coli*

ist nach FARMER UND BRENNER (1977) mit großem Aufwand verbunden, man begnügt sich deshalb häufig mit dem Nachweis coliformer Bakterien¹.

Enterobacteriaceae sind in ihrer Widerstandsfähigkeit gegen Hitze mit den Salmonellen vergleichbar, sie können deshalb als Nachweis für eine ausreichende Hitzebehandlung von Lebensmitteln (BUSSE, 1985) und Klärschlamm (BREER et al., 1979) dienen. Der Nachweis der Keime in Trinkwasser oder Nahrungsmitteln wird als Indikator für fäkale Verunreinigung gewertet und gilt daher als Maßstab für die Hygiene.

Nach GEWECKE und KÜNZEL (1989) besitzen *E. coli* und Salmonellen humanhygienisch als Indikatorkeime bei der Bioabfallkompostierung die größte Relevanz.

Fäkalstreptokokken sind regelmäßige Bewohner der Hohlräume (Mundhöhle, Atemwege, Darm) des menschlichen und tierischen Körpers, rufen aber auch Krankheiten bei diesen hervor (ROLLE & MAYR, 1993).

Der taxonomisch nicht definierte Begriff der Fäkalstreptokokken stammt nach ALTHAUS et al. (1982) aus dem Sanitärbereich und umfaßt alle mit den Faeces von Mensch und Tier ausgeschiedenen Streptokokken. Beschrieben werden damit grampositive, unbewegliche und nicht-sporenbildende Kugelbakterien.

Den Fäkalstreptokokken (synonym: Enterokokken, D-Streptokokken) kommt eine besondere Bedeutung als Indikatoren zu. WESTPHAL und CHRISTENSEN (1983) stufen sie als widerstandsfähiger gegenüber mesophilen Temperaturen und hohen pH-Werten ein als coliforme Keime, Salmonellen, Pseudomonaden und Viren.

Nach SOLDIERER (1991) sollten Fäkalstreptokokken nur im Beisein von *E. coli* als Fäkalindikatoren verwendet werden.

Clostridien gelten als ubiquitäre Keime, deren hauptsächlichlicher Lebensraum der Erdboden ist. Verschiedene Clostridienarten besiedeln auch regelmäßig den Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier.

¹ In dieser Arbeit wurde zunächst, wie vereinbart, mit dem enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) gearbeitet, der in letzter Zeit in den entwickelten Ländern zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Eine Infektion geht mit wässrig-blutigen Durchfällen bis zu lebensbedrohlichen extraintestinalen Komplikationen einher. Andererseits gehört EHEC zur physiologischen Darmflora der Rinder.

Da jedoch sowohl durch die Zusammenarbeit mit dem Institut für Phytomedizin, als auch in Praxisversuchen Dritte in die Untersuchungen involviert waren und die Laborsicherheit nicht gewährleistet werden konnte, wurde im Sinne der Biostoffverordnung (BioStoffV) vom 18.10.1999, §10,2: „Biologische Arbeitsstoffe, die eine Gesundheitsgefahr für Beschäftigte darstellen, sind, ..., durch biologische Arbeitsstoffe zu ersetzen, die für die Beschäftigten weniger gefährlich sind.“ (ANONYM, 1999), auf *E. coli* bzw. „Coliforme“ ausgewichen.

Besonders bei Herbivoren und Omnivoren sind sie immer im Kot nachweisbar (ROLLE & MAYR, 1993). EL SUKHON (1974) fand *Clostridium perfringens* (Cl. perf.) bei erkrankten Schweinen in Mengen bis zu 10^9 Keime/g Kot. AMTSBERG et al. (1977) untersuchten Kotproben von 168 lebenden und den Darminhalt von 64 zur Sektion eingesandten Kälbern quantitativ bakteriologisch auf das Vorkommen von Cl. perf. Bei den Kotproben lag in 21,4 % ein Keimgehalt von über 10^3 je Gramm vor. Bei den zur Sektion eingesandten Kälbern wurde Cl. perf. aus dem Darm und den Organen in 75 % der Fälle isoliert. Es ist deshalb auch im Material von Biogasanlagen mit einem erheblichen Gehalt an Clostridien zu rechnen.

Clostridien sind in der Regel große, grampositive, bewegliche, streng anaerob wachsende und sporenbildende Stäbchenbakterien (ROLLE & MAYR, 1993).

Auffallend ist, daß Cl. perf.-Stämme, die schlechte Sporenbildner sind, hitzeresistentere Sporen ausbilden, als die Stämme, die gute Sporenbildner sind (NISHIDA et al., 1969; REY et al., 1975).

Pathogene Clostridien bilden eine Reihe von Toxinen. Infektionen durch Clostridien treten als seuchenartige Clostridiosen (z.B. Rauschbrand), Enterotoxämien oder Wundclostridiosen auf (ROLLE & MAYR, 1993).

Trotz des ubiquitären Vorkommens blieben Clostridien bislang als Prüfkeime unbeachtet. BÖHNEL und LUBE (2000) kritisieren, die BioAbfV berücksichtige als Indikatororganismus zum Nachweis der Hygienisierung von Bioabfall lediglich *S. Senftenberg*. Auch europaweit gäbe es keine adäquate Vorschrift für anaerobe Bakterien.

In den vorliegenden Untersuchungen soll die Tenazität von *Clostridium perfringens* in anaeroben Vergärungsverfahren überprüft werden.

Campylobacter können sowohl vom Menschen und anderen Säugetieren, aber auch von vielen Vogelarten isoliert werden. Besonders Vögel sind als natürliches Reservoir dieser Bakterien zu betrachten. Campylobacter können deshalb nahezu ubiquitär in der Umwelt, besonders im Wasser, angetroffen werden (ROLLE & MAYR, 1993).

Sie zählen heute zu den bedeutendsten Erregern bakterieller Durchfallerkrankungen und sind hinsichtlich der Auftretenshäufigkeit und ökonomischen Bedeutung den Salmonellen gleichzusetzen (SKIRROW, 1993). Einige Campylobacterspezies sind auch als Ursache sporadischer oder seuchenhafter Aborte bekannt.

Zu Infektionen kommt es vor allem durch kontaminiertes Geflügel- aber auch Schweinefleisch, durch Milch und Trinkwasser (WHO, 1986).

Campylobacter sind kommaförmig, mit einer bis mehreren korkenzieherartig erscheinenden Windungen. Es sind gramnegative, mit Hilfe von Geißeln aktiv bewegliche Stäbchenbakterien, in älteren Kulturen auch mit kokkoiden Strukturen, die mikroaerophile Wachstumsbedingungen benötigen (ROLLE & MAYR, 1993).

In bisherigen Untersuchungen konnten für *Campylobacter* Überlebenszeiten bis zu 41 d, vor allem bei niedrigeren Temperaturen (um 4 °C) nachgewiesen werden (PALUSZAK, 2000; STELZER, 1991). Jedoch finden sich in der Literatur bisher kaum Angaben über das Verhalten dieser Bakterien in biogenen Abfällen und unter anaeroben Behandlungsverfahren.

In Gülle und evtl. mit verarbeiteten Speiseabfällen können, neben der Vielzahl an Bakterien auch verschiedene pathogene **Viren**, einschließlich der Erreger von anzeigepflichtigen Tierseuchen, wie Schweinepest, Aujeszkyscher Krankheit und Maul- und Klauenseuche potentiell vorkommen (STRAUCH, 1990; STRAUCH und BALLARINI, 1994). Deshalb interessierte innerhalb dieses Projektes, ob und wie rasch solche Viren durch die anaerobe Vergärung unter Praxisbedingungen inaktiviert werden.

Parvoviren sind weltweit verbreitet und kommen auch beim Menschen vor. Es handelt sich um unbehüllte Viren der Familie der Parvoviridae mit einsträngiger DNA. Ein hoher Prozentsatz aller konventionell gehaltener Tiere der einzelnen Spezies weisen Antikörper gegen das jeweilige Parvovirus auf, Infektionen verlaufen meist klinisch inapparent, für Neugeborene jedoch häufig hochpathogen und oft letal (ROLLE & MAYR, 1993).

Parvoviren besitzen eine außerordentlich hohe Stabilität gegen thermische und chemische Einflüsse. Schon ABINANTI und WARFIELD (1961) vermuteten, daß sie die stabilsten aller bei Wirbeltieren vorkommenden Viren sind. MAHNEL (1979) konnte durch Versuche mit verschiedenen viruziden Wirkstoffen das Bovine Parvovirus (BPV) in Bezug auf Thermostabilität, Empfindlichkeit gegen anodische Oxidation, Strahlenstabilität und Widerstandsfähigkeit gegenüber viruziden Substanzen als das Stabilste bezeichnen.

Für die vorliegende Arbeit wurde das thermostabile Bovine Parvovirus ausgewählt.

Eigene Untersuchungen

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung der beprobten Anlagen

2.1.1 Vorbemerkung

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen richtete sich auf Versuche an den beiden institutseigenen, halbtechnischen Modellanlagen. Diese beiden Anlagen -anaerobe Vergärungsanlage und Pasteurisierungseinheit- werden im „Stall-Labor“ auf dem Gelände der Universität Hohenheim betrieben.

Um diese Versuchsergebnisse in der Praxis zu verifizieren wurden moderne Anlagen mit relativ hohem Durchsatz, in zwei verschiedenen Bundesländern -Hessen und Bayern- ausgesucht und beprobt.

2.1.2 Modellanlagen

2.1.2.1 Anaerobe Vergärungsanlage (AV)

Der für die Untersuchungen verwendete einstufige Biogasreaktor wurde von der Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen der Universität Hohenheim konstruiert und gebaut (siehe Abbildung 1).

Dabei handelt es sich um einen liegenden Reaktor im halbtechnischen Maßstab mit einer Länge von 160 cm, einer Höhe von 60 cm und einem Faulraumvolumen von ca. 400 l.

Zur Isolation befindet sich zwischen dem Reaktor und dem äußeren Holzmantel eine Wärmedämmschicht. Am vorderen Ende befindet sich ein Einfüll-, am hinteren Ende ein Auslaufstutzen, für das frische, bzw. vergorene Substrat. Am hinteren Ende gewährt eine Plexiglas-Sichtscheibe 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-/Umwälzthermostat² über einen Zulaufschlauch den inneren Reaktorzylinder erreicht. Auf

² Lauda Dr. R. Wobser GmbH&Co KG, D-97912 Lauda Königshofen, Art. 7396701

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.

Über eine Zeitschaltuhr³ wird ein Motor⁴ betrieben, der mit einem Keilriemen das Rührwerk der Anlage betreibt.

An seiner Oberseite ist der Reaktor mit vier Röhren (Durchmesser jeweils ca. 6 cm) versehen, über die das Einbringen der Prüfkörper (siehe Kapitel 2.2.3: Keimträgermethoden), ermöglicht wird. Durch großzügige Bohrungen am unteren Ende dieser Röhren wird ein optimaler Kontakt der Keimträger (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.

Das Gesamtvolumen des Reaktors setzt sich aus einer flüssigen Phase, ca. 400 l, sowie der darüber stehenden Gasblase, ca. 50 l, zusammen. Die Anlage wurde mindestens fünfmal wöchentlich mit einer Gesamtsubstratmenge von je 20 l beschickt. Aus diesen Größen läßt sich die hydraulische Verweilzeit ($HRT = \text{Hydraulic Retention Time}$) berechnen, die als mittlere Aufenthaltszeit des Substrats im Gärbehälter definiert ist. Sie ergibt sich aus dem Fermentervolumen V_F (m^3) und der täglich zugegebenen Menge an frischem Substrat V_S (m^3/Tag) durch die Gleichung $HRT = V_F/V_S$ (Tage). Es ergibt sich daraus eine hydraulische Verweilzeit von durchschnittlich 25 d.

Das Rührwerk wurde zunächst alle 30 min für 60 s in Bewegung gesetzt. Bei Versuchsanordnungen mit Bioabfall dann alle 15 min für 59 s, um einer Verklumpung des Materials durch höhere Trockensubstanzwerte des Bioabfalls entgegenzuwirken.

Während die VA betrieben wurde, wurden verschiedene physikalische Parameter prozeßbegleitend gemessen und dokumentiert. Ihre Schwankungsbreite und mögliche Einflußgröße auf die Inaktivierung von Mikroorganismen sollte so festgehalten werden.

Es wurden neben der Temperatur und dem Redoxpotential auch der pH-Wert des Faulsubstrates und das täglich produzierte Gasvolumen erfaßt. Die Dokumentation erfolgte einmal täglich.

Die Temperatur wurde mit einem elektronischen Thermometer⁵ gemessen, in dem die Temperatursonde⁶ in den verschiedenen Keimträgerstutzen der Anlage positioniert wurde.

³ Schaltcomputer SC 58, Müller

⁴ SEW Eurodrive, Typ 143 e DT 80 N 4, Nr. 3201678301.0002.97

⁵ Mikroprozessor pH Meter, pH 535 Multical®, Fa., WTW, D-823362 Weilheim

⁶ TFK 530, Fa. WTW, D-82362 Weilheim

Die Sonde des Redoxmeßgerätes⁷ wurde oberhalb des Einfüllstutzens fest montiert, da an dieser Stelle auf Grund des Sauerstoffeintrags bei der Befüllung der Anlage die größten Schwankungen erwartet wurden.⁸

Während der zweijährigen Laufzeit der Versuche mußte diese Sonde einmal erneuert werden.

Die Sonde⁹ des pH-Meßgerätes¹⁰ wurde analog zur Temperatursonde in den Stutzen plaziert. Wegen der Eigenschaften des Fermentersubstrates war ein regelmäßiges Eichen, sowie gelegentliches Austauschen der Sonde unumgänglich.

Die produzierte Gasmenge wurde mit Hilfe eines Gaszählers¹¹ laufend erfaßt und einmal täglich dokumentiert.

Darüber hinaus stand ein Gerät zur Messung des Methangasgehaltes¹² im Biogas zur Verfügung. Es wurde dafür eine direkte Verbindung zum Gasstutzen hergestellt und somit das Gas durch das Meßgerät geleitet. An Hand von Eichkurven konnten die ermittelten Meßwerte in Methangehalte umgerechnet werden.

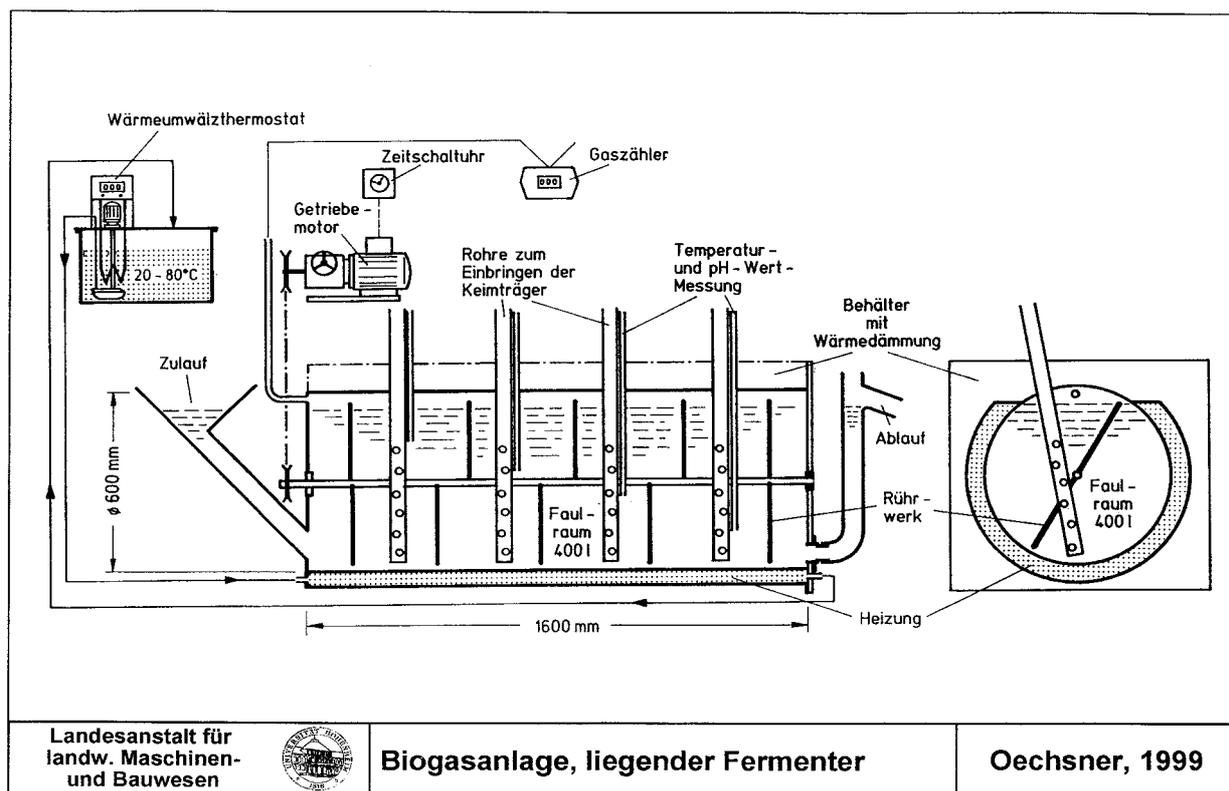


Abb. 1: : Schema der Biogasanlage, liegender Fermenter

⁷ pH 91, Fa. WTW, D-82362 Weilheim

⁸ SenTix Redoxmeßkette ORP, Fa. WTW, D-82362 Weilheim

⁹ Typ E 50-1, 5, Fa. WTW, D-82362 Weilheim

¹⁰ Microprozessor pH-Meter, pH 539, Fa. WTW, D-82362 Weilheim

¹¹ GM 86e 024GMT GmbH, D-64521 Groß-Gerau,

¹² Gasmitter®-Modul, Fa. Sensor Devices GmbH, D-44139 Dortmund

2.1.2.2 Pasteurisierungseinheit (PE)

Auch die Pasteurisierungseinheit wurde von der Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen der Universität Hohenheim konstruiert und gebaut (siehe Abbildung 2).

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. Der Pasteur kann an seiner 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-/Umwälzthermostat¹³ 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 Zeitschaltuhr¹⁴ wird der Motor¹⁵ 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 (siehe Kapitel 2.2.3: Keimträgermethoden) bestückte, Lanzen in der Anlage fixiert werden können.

Für jeden Versuch wird der Pasteur 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 Temperaturfühler¹⁶, der durch eine Aufbohrung im Deckel der Anlage eingeführt werden kann, regelmäßig bis kontinuierlich die Temperatur im Substratinneren kontrolliert werden.

¹³ecoline 003, Lauda Dr. R. Wobser GmbH&Co KG, D-97912 Lauda Königshofen, Art

¹⁴ Eberle, SBA-1

¹⁵ Type SK 12-7154, Nr. 9912430.00, Maedler GmbH, D-70573 Stuttgart

¹⁶ GTH 215, Greisinger Electronic

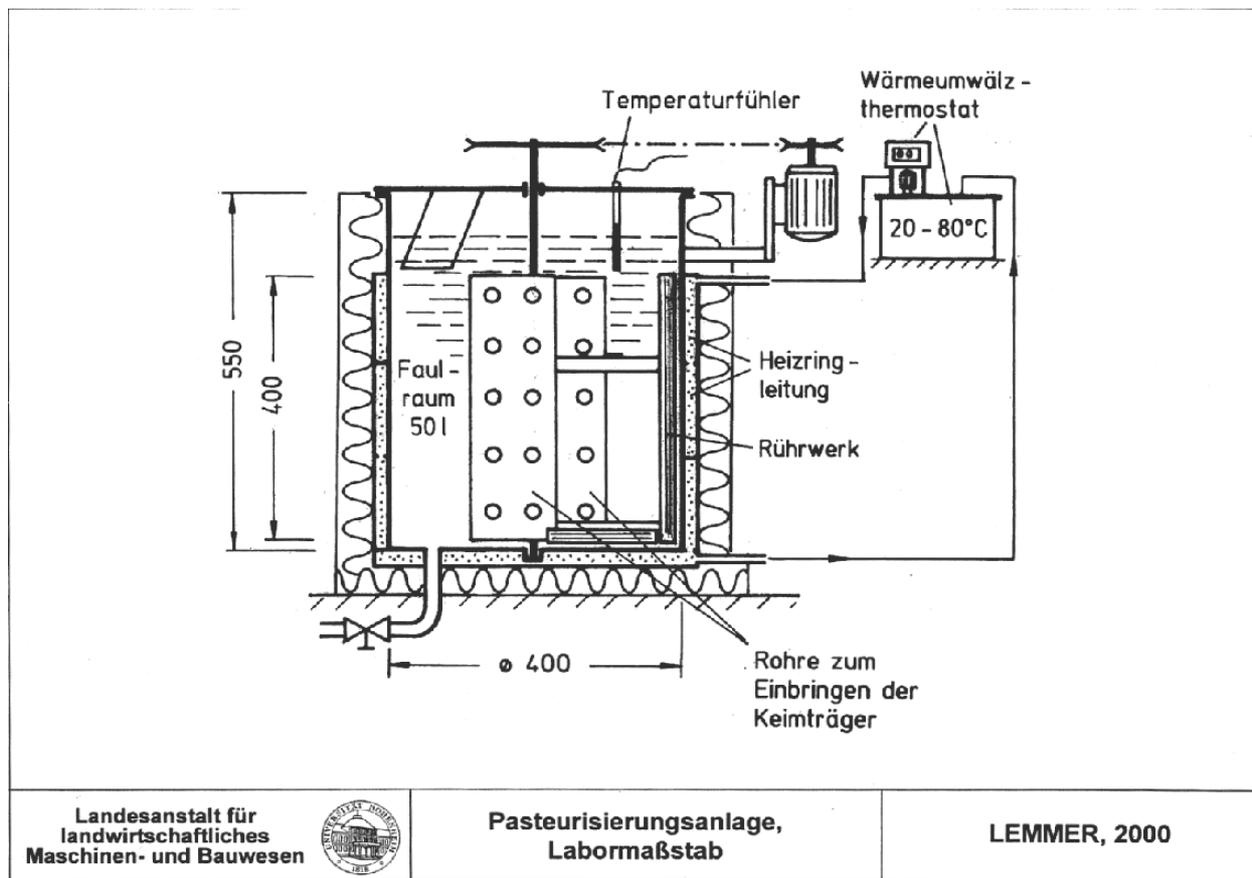


Abb. 2: Schema der Pasteurisierungseinheit (Modellanlage)

Die Substrate zur Beschickung der Modellanlagen setzten sich zusammen aus: Rindergülle, die vom universitätseigenen Versuchsbetrieb bezogen wurde, Speise- oder Großküchenabfälle, die in der Mensa der Universität anfielen und Bioabfälle, die aus der braunen bzw. grünen Tonne aus Privathaushalten stammten und über ein Kompostwerk bezogen wurden.

Zur ersten Befüllung und „Animpfung“ des Anaerobreaktors wurden 400 l Anaerobgülle eines Milchviehbetriebes verwendet.

2.1.3 Praxisanlagen

2.1.3.1 Kofermentationsanlage „H“ in Hessen

Die kombinierte Vergärungs- und Kompostierungsanlage „H“ in Hessen (s. Abbildung 3) arbeitet nach dem Prinzip der thermophilen Trockenvergärung.

Die drei liegenden Fermenter der Vergärungsanlage besitzen ein Volumen von je 820 m³. Das Trockenvergärungsverfahren arbeitet mit einem Trockensubstanz-Gehalt von ca. 15-40 %. Die Fermentertemperatur liegt im thermophilen Bereich bei ca. 55-57 °C.

Durch den gesteuerten Material Ein-und Austrag sowie die eingebauten Rührwerke wird ein kontrollierter Pfropfenstrom erzeugt, der eine mittlere Aufenthaltszeit des Substrates im Fermenter von mindestens 21 d gewährleistet.

Die Fermenter sind untereinander baugleich und können unabhängig voneinander betrieben werden. Dies gilt insbesondere für Beschickung und Entnahme des Materials.

Die Beschickung erfolgt mit Bioabfällen und organischen Gewerbeabfällen, letztere mit einem Anteil von etwa 21 %. Täglich werden ca. 37 m³ Bio- und biogene Gewerbeabfälle zugeführt und die adäquate Menge an Gärsubstrat entnommen, welches nach der Entwässerung der Nachrotte zugeführt wird.

Das geforderte Temperaturniveau kann durch eine Boden- und Wandheizung, die im ersten Drittel eines jeden Fermenters installiert ist, eingestellt werden.

Während des Untersuchungsprogrammes werden die Temperaturen im Fermenter vom Anlagenbetreiber aufgezeichnet.

Für das Untersuchungsprogramm wird ein Fermenter ausgewählt und unter Normalbedingungen (übliche Temperaturen und Beschickungssubstrate) gefahren.

Über die Längsseite des Fermenters sind drei Probenahmestutzen (Durchmesser je 8 cm) in Höhe der Rührwerke angeordnet. Durch diese Stutzen kann jeweils eine Lanze, beladen mit den jeweiligen Probenpaketen, in den Fermenter eingeschoben werden. Die stählernen Lanzen sind stark perforiert, damit ein Kontakt der Probenbehältnisse mit dem Gärgut jederzeit gewährleistet bleibt.

Die erste Beprobung dieser Anlage fand im Mai und Juni 1999 im Rahmen der Inbetriebnahmeprüfung, entsprechend den Vorgaben der BioAbfV (ANONYM, 1998), statt. Ein Jahr später wurde die damals angeordnete Wiederholungsprüfung zur Feststellung der Prozeßsicherheit durchgeführt.

Ziel der Untersuchungen sollte u.a. sein, aus den erhaltenen Ergebnissen eine aus seuchenhygienischer Sicht eindeutige Aussage zur Sicherheit im Hinblick auf die Seuchenerreger machen zu können, die eine Ausnahmegenehmigung für die Verwertung gewerblicher Bioabfälle nach §8, Abs 2 TierKBG (ANONYM, 1975) genehmigt.

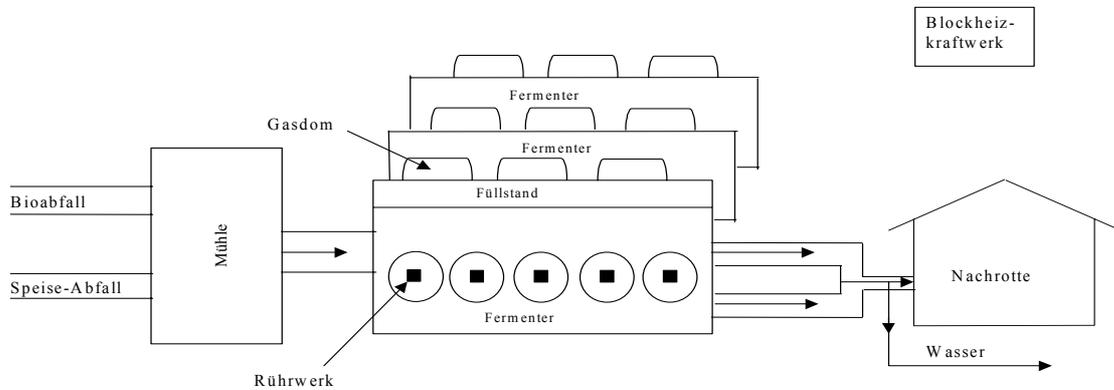


Abb. 3: Skizze der Biogasanlage „H“ in Hessen

2.1.3.2 Kofermentationsanlage „B“ in Bayern

In der einstufigen, thermophilen Naßvergärungsanlage „B“ in Süddeutschland (s. Abbildung 4) wird Bioabfall in wäßrige Lösung gebracht, von Störstoffen befreit weiterverarbeitet und vergoren, bis er nach ca. 20 d soweit abgebaut ist, daß er nach der Entwässerung, mit Grüngut vermischt und nachgerottet, zu Kompost geworden ist.

Die drei liegenden Fermenter der Biogasanlage haben ein Volumen von insgesamt 3500 m³.

Während der Verweilzeit von 20 d werden 45 % der im Gärsubstrat enthaltenen organischen Substanz zu Biogas umgesetzt, welches im anlageneigenen Blockheizkraftwerk zu Strom und Wärme umgewandelt wird.

Die Anlage ist ausgerichtet, etwa 11500 t organische Abfälle pro Jahr zu verwerten. Der Materialeintrag geschieht über zwei getrennte Schienen. Zum einen wird Bioabfall in einer geschlossenen Halle abgeladen und von dort per Radlader direkt in die Aufbereitungsstufe der Anlage eingespeist. Hier werden auch Schwerstoffe abgeschieden und der Abfall mit Prozeßwasser vermischt. Als Ergebnis gelangt eine dickflüssige, von Störstoffen gereinigte Pulpe in die eigentliche Biogasanlage.

Zum anderen werden Speisereste in einer separaten Halle verarbeitet. Abgekippt in einen Edelstahl-Tiefbunker gelangen sie über eine Zerkleinerungsmühle in die Hygienisierungsanlage.

Dort wird der Speisebrei für mindestens eine Stunde auf 70 °C erhitzt, der Temperaturverlauf wird vollautomatisch dokumentiert.

Die so pasteurisierten Abfälle werden jetzt mit der Bioabfallpulpe vermischt und dem weiteren Verfahren zugeführt.

Nach der Entwässerung wird der entstandene Rohkompost über eine konventionelle Rotte zu hochwertigem Kompost verarbeitet (KÄBMEYER, 1999).

Die Versuche zur Verifizierung der Laborergebnisse wurden im Frühsommer 2000 durchgeführt. Zur Einbringung und Fixierung der Probenpakete wurde eine quaderförmige Lanze aus Edelstahl mit einer Kantenlänge von 10 cm und einer Höhe von 120 cm konstruiert. Diese Lanze war am oberen Ende mit einem verschraubbaren Deckel versehen und in ihrer gesamten Länge gut perforiert, um einen optimalen Kontakt zwischen Gärgut und Probenbehältern zu gewährleisten.

Mittig in Fermenter zwei konnte diese Lanze durch eine dicht verschließbare Öffnung im Substrat des Fermenters versenkt werden.

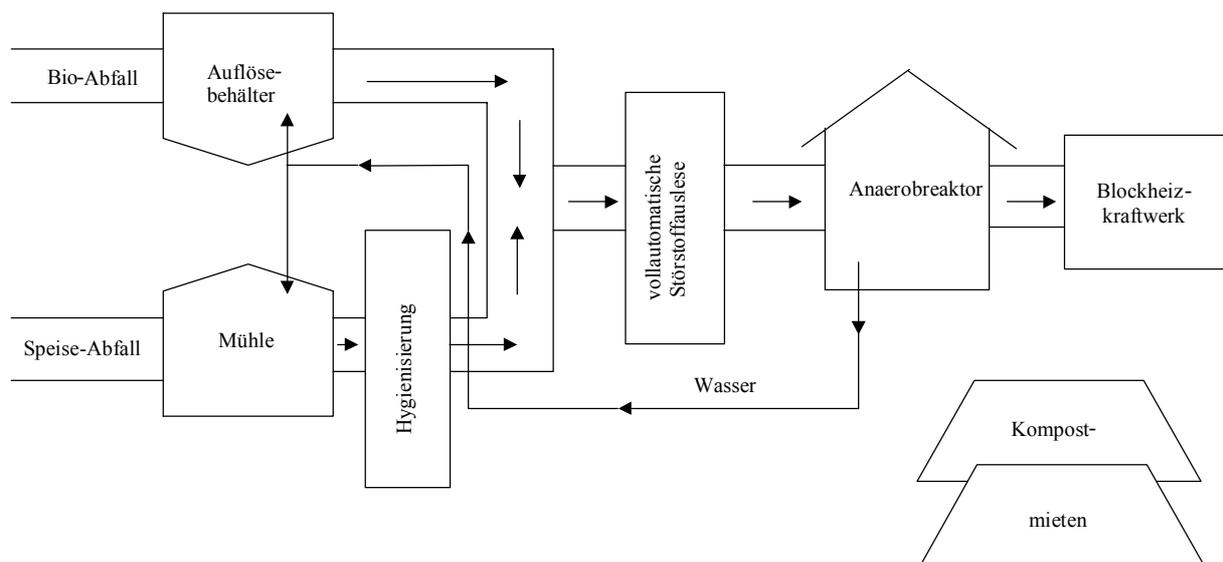


Abb. 4: Schema der Biogasanlage "B" in Bayern

2.1.4 Versuchsvarianten

2.1.4.1 Versuchsvarianten in den Modellanlagen

Die unterschiedlichen Versuchsanordnungen an den Modellanlagen sind aus Abbildung 5 ersichtlich.

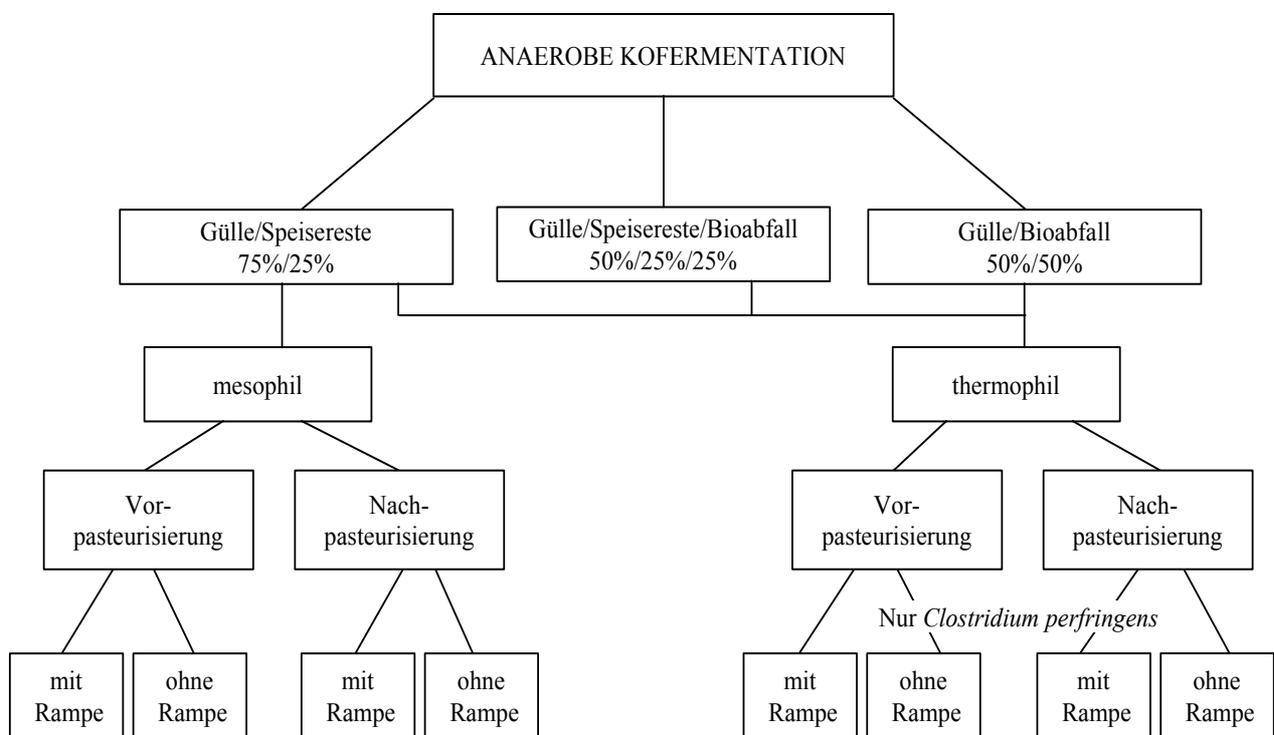


Abb. 5: Darstellung der Versuchsvarianten aller Untersuchungen (Modellanlagen)

Zunächst wurden Untersuchungen im mesophilen Temperaturbereich der anaeroben Vergärungsanlage durchgeführt. Das Wasserbad der Anlage wurde dazu mit 33-34 °C betrieben, auf diese Weise konnte eine nahezu konstante Temperatur von 33 °C im Inneren des Substrates gehalten werden. Während dieser mesophilen Phase wurde der Reaktor mit Rindergülle und Großküchenabfällen im Verhältnis 3:1 beschickt.

Die Varianten dieser Versuchsanordnung lagen darin, daß sowohl die Vor- als auch die Nachpasteurisierung (eine Stunde bei 70 °C) des Substrates untersucht wurde. Bei den einzelnen Pasteurisierungsvorgängen wiederum wurden Tenazitätsversuche mit und ohne Einbeziehung der Aufheizphase durchgeführt.

Bei den folgenden Untersuchungen im thermophilen Bereich wurde das Augenmerk verstärkt auf die Substratzusammensetzungen zur Beschickung der Anlage gelegt. So wurde zunächst die Kombination Rindergülle:Speiseabfälle im Verhältnis 3:1 beibehalten. Im folgenden Versuchsdurchgang wurden Rindergülle:Speiseabfälle:Bioabfall 2:1:1 verwendet. Im letzten Durchgang wurde mit Rindergülle und Bioabfällen im Verhältnis 1:1 beschickt.

Das Wasserbad wurde die ganze Zeit mit 54,5-55 °C betrieben, damit konnte die Temperatur im Substratinneren bei 53 bis max. 55 °C gehalten werden.

Um die Ergebnisse der Tenazitätsversuche mit *Clostridium perfringens* abzurunden, wurden zuletzt Pasteurisierungsversuche bei Temperaturen von 90 °C und einer Haltezeit von einer Stunde durchgeführt.

2.1.4.2 Versuchsvarianten in den Praxisanlagen

Bei Versuchen in Praxisanlagen wurden aus verfahrens- und arbeitstechnischen Gründen auch die Wünsche der Betreiber berücksichtigt. Tenazitätsversuche mit Prüforganismen fanden im Rahmen des technisch Machbaren statt. So konnten oft nicht alle ausgewählten Organismen in vollem Umfang eingebracht und untersucht werden (siehe Kapitel 3.3 „Praxisanlagen“).

2.2 Verwendete Testorganismen

Wie bereits im Kapitel 1.4 „Literatur“ dargestellt, wurden für die Untersuchungen die fünf Bakteriengruppen Salmonellen, *Escherichia coli*, Fäkalstreptokokken, *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni* sowie ein Vertreter aus der Familie der Parvoviren herangezogen. Alle ausgewählten Keimarten sind seuchenhygienisch von großer Relevanz und gelten darüber hinaus als besonders resistent gegenüber wechselnden Umweltbedingungen.

Im Einzelnen wurden verwendet:

Salmonella senftenberg (H₂S positiv), DSM¹⁷ 10062, SIT¹⁸ 100

Salmonella senftenberg (H₂S negativ), DSM 10062, SIT 112

Escherichia coli, DSM 498, SIT 63

¹⁷ Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen

¹⁸ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim

Streptococcus faecium, DSM 2146, SIT13
Clostridium perfringens Typ A, DSM 756, SIT 93
Campylobacter jejuni, DSM 4688, SIT 98
Bovines Parvovirus (BPV, Stamm Haden)¹⁹

2.3 Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

2.3.1 Bakteriologische Methoden

2.3.1.1 Vorbemerkung

Zu Beginn eines jeden Versuches mit Prüfkörpern (s. Kap. 2.2.3.2) wurde Fermentersubstrat durch eine Keimsuspension (s. Kap. 2.2.1.4) mit den zu untersuchenden Mikroorganismen angereichert, in die Prüfkörper verbracht und so dem Pasteurierungs-oder Faulprozeß der Anlagen zugeführt.

Um aber auch Aussagen über die Zusammensetzung der nativen Keimflora im Substrat machen zu können, wurde dieses jeweils vor der Beimpfung auf seinen Gehalt an Salmonellen, *E. coli*, Fäkalstreptokokken, *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni* untersucht.

Solche Untersuchungen wurden auch regelmäßig mit In- und Outputprodukten der Anlage durchgeführt.

2.3.1.2 Herstellung einer Verdünnungsreihe

Für quantitative Untersuchungen wird bei allen Keimarten die gleiche Technik der Verdünnung angewandt.

Es werden 20 g des zu untersuchenden Substrates in 180 ml einer 0,9 %igen Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl)²⁰ eingewogen und über Nacht auf einer Schüttelvorrichtung²¹ im Kühlraum bei 4 °C geschwenkt. Aus dieser Vorverdünnung (10^{-1}) erfolgt der Ansatz einer dekadischen Verdünnungsreihe, d.h. es wird 1 ml der Lösung entnommen, in 9 ml 0,9 %ige NaCl verbracht und auf einem Reagenzglasschüttler aufgeschüttelt. Dieser Vorgang wird wiederholt, in dem jeweils nach dem Aufschütteln 1 ml davon in 9 ml sterile NaCl-Lösung pipettiert und wieder

¹⁹ Stammsammlung des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene (460) der Universität Hohenheim

²⁰ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.06400.9025

²¹ Lab. Shaker, Adolf-Kühner AG Basel, Switzerland

geschüttelt wird. Diese Reihe kann bis zu der Verdünnungsstufe fortgeführt werden, die der zu erwartenden Keimzahl entspricht.

2.3.1.3 Das MPN-Verfahren

Im Anschluß wird aus jeder der oben beschriebenen Verdünnungsstufen je 1 ml in drei parallele Röhrrchen mit den jeweiligen Bakterien entsprechender Nährbouillon überimpft. Diese Röhrrchen werden verschlossen und entsprechend der Bakterienart aerob bei 37 °C, anaerob bei 39 °C oder mikroaerophil bei 42 °C bebrütet. Es folgt die Überimpfung auf (Selektiv-) Agar.

Eine Agarplatte wird dazu gewöhnlich in drei Drittel aufgeteilt. Mit einer ausgeglühten und abgekühlten Drahtöse wird nacheinander in jedes der Parallelröhrrchen eingetaucht und auf je eines der Agarplatten-Drittel aufgetragen. Wieder wird entsprechend bebrütet (aerob, anaerob, mikroaerophil). Je nach Reaktion wird jedes Drittel der Agarplatten anschließend als positiv oder negativ gekennzeichnet und der dadurch ermittelte dreistellige MPN-Code zur Auswertung anhand der korrigierten MPN-Tabelle nach DE MAN (1983) herangezogen.

Die MPN- (Most-Probable-Number) Methode ist ein Verfahren zur direkten Zählung der Lebendkeimzahl. Es handelt sich um ein statistisch abgesichertes Schätzverfahren, das besonders auch zur Bestimmung niedrigerer Keimzahlen Anwendung findet.

2.3.1.4 Herstellung der Keimsuspensionen

Keimsuspensionen werden benötigt um Substrat mit einer großen Anzahl der gewünschten Bakterienspezies anzuimpfen. Es handelt sich um ein flüssiges Medium in dem Bakterien angereichert sind.

Als Medien oder Nährbouillon wird für Salmonellen, Fäkalstreptokokken und *E. coli* Standard I Nährbouillon²², für Clostridien Fluid-Thioglycolat-Bouillon und für Campylobacter Preston-Bouillon (ohne Antibiotika) verwendet (Bezeichnung der Medien s. Kap. 2.2.1.5 bis 2.2.1.9).

Die den ausgewählten Keimen entsprechende Nährbouillon wird mit einer Kolonie beimpft, die mit einer ausgeglühten und abgekühlten Rundöse von der auf Agar befindlichen Stammkultur abgenommen wird. Anschließend wird 1-2 d aerob, bei 37 °C (Salmonellen, *E. coli*, Fäkalstreptokokken), anaerob bei 39 °C (Clostridien) oder mikroaerophil bei 42 °C (Campylobacter) bebrütet.

Der Keimgehalt der so hergestellten Suspension wird bestimmt und liegt in der Regel bei 10⁷ bis 10⁹ KBE/ml.

²² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07881.0500

2.3.1.5 Untersuchung auf Salmonellen

Verwendete Medien:

- gepuffertes Peptonwasser²³
- Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon²⁴
- Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar²⁵
- Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS)-Agar²⁶

Qualitative Bestimmung

Zur Voranreicherung werden 50 g Substrat in 450 ml gepuffertes Peptonwasser eingewogen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt²⁷. 0,1 ml davon werden in 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon überführt und geschüttelt. Es werden 6 Parallelen angelegt, von denen drei bei 37 °C, drei bei 43 °C jeweils 24 h bebrütet werden. Damit soll dem Wachstumsoptimum der verschiedenen Salmonellenarten entsprochen werden.

Zur Reisolierung der Testsalmonellen aus den Prüfkörpern wurden diese zunächst aufgeschraubt und der gesamte Inhalt für den qualitativen Salmonellennachweis in Peptonwasser verbracht. Pro Prüfkörper standen dafür nur etwa 10 ml (g) Anaerobmaterial zur Verfügung, die in 90 ml Peptonlösung gebracht wurden.

Die Isolierung der Salmonellen geschieht auf Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD) und auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (BPLS)-Agar. Die unterschiedlich bebrüteten Bouillons werden jeweils auf eine XLD- und eine BPLS-Agarplatte ausgestrichen und anschließend 24 h bei 37 °C inkubiert.

Ergibt sich daraus ein Salmonellenverdacht (blaßrosa Kolonien auf BPLS, schwarze Kolonien auf XLD), wird eine verdächtige Kolonie im Drei-Ösen-Ausstrich auf Standard-I-Agar²⁸ verbracht, um so eine Reinkultur zu erhalten. Wieder wird 24 h bei 37 °C inkubiert.

Der Befund kann am nächsten Tag verifiziert werden, indem die Antigenstruktur des Salmonellen-Serovars durch Objektträgeragglutination²⁹ bestimmt wird. Zur exakten

²³ Oxoid, GB-Hampshire, Art. Nr. CM 509

²⁴ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 1858-17

²⁵ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 0788-17

²⁶ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 1880-17

²⁷ Pilot-Shaker, Adolf-Kühner AG Basel, Switzerland

²⁸ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.07881.5000

Speziesbestimmung werden die Proben an das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV Berlin) gesandt.

Quantitative Bestimmung

Die quantitative Salmonellenbestimmung erfolgt nach dem MPN-Verfahren (s. Kap. 2.2.1.3). Aus den ausgewählten Verdünnungsstufen (s. Kap.2.2.1.2) wird dreimal 1 ml in je 9 ml Peptonwasser angereichert. Nach einer 24-stündigen Bebrütung bei 37 °C wird aus dieser Voranreicherung je 0,1 ml in drei parallelen Ansätzen in Röhrchen mit je 10 ml Rappaport-Vassiliadis-Selektivbouillon überimpft. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C können die Salmonellen anschließend auf XLD-bzw. BPLS-Agar nachgewiesen werden (s. oben).

2.3.1.6 Untersuchung auf *Escherichia coli*

Verwendete Medien:

- MacConkey (MC)-Bouillon³⁰
- DEV-Endo-Agar³¹

Der Nachweis erfolgt quantitativ mit Hilfe des MPN-Verfahrens (s. Kap. 2.2.1.3). Zur Anreicherung wird aus jeder Verdünnungsreihe (s. Kap. 2.2.2.2) je 1 ml in drei parallele Röhrchen MacConkey-Bouillon überimpft und bei 37 °C 24 h bebrütet.

Zur Isolierung der *E. coli* wird anschließend aus jeder Stufe eine Öse DEV-Endo-Agar ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C werden grünmetallisch glänzende Kolonien als positiv bewertet.

²⁹ DADE Behring Vertriebs GmbH & Co, D-65835 Liederbach, Art. Nr. ORMT 191 c30 (Polyvalent I) und ORMU 191 C30 (Polyvalent II); SIFIN, D-13088 Berlin, Antisalmonella O19; BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, 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)

³⁰ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 0020-17

³¹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.10684.0500

2.3.1.7 Untersuchung auf Fäkalstreptokokken

Verwendete Medien:

- Azid-Dextrose (AD)-Bouillon³²
- Kanamycin-Äsculin-Agar (KAA)³³

Auch die Bestimmung der Fäkalstreptokokken erfolgt in Anlehnung an die MPN-Technik (s. Kap. 2.2.1.3).

Ausgangspunkt ist wieder die Herstellung einer Verdünnungsreihe (s. Kap. 2.2.1.2).

Zur Anreicherung wird jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe in drei parallele Röhrchen Azid-Dextrose-Bouillon (9 ml) überimpft und 48 h bei 37 °C inkubiert.

Alle drei Reagenzröhrchen einer Verdünnungsstufe, bei denen mindestens eines einen getrübbten Inhalt aufweist, werden auf einer Kanamycin-Äsculin-Agarplatte, die in drei gleich große Flächen aufgeteilt wurde, mit einer ausgeglühten und abgekühlten Drahtöse ausgestrichen. Die Platten werden 48 h bei 37 °C bebrütet. Fäkalstreptokokken bilden auf KAA-Agar mit Eisen(III)-Ionen einen dunkelgrünen bis schwarzen Komplex, der einen dunklen Hof um FKS-positive Kolonien bildete. Flächen mit schwarzen Kolonien wurden als positiv bezeichnet und wie oben beschrieben ausgewertet.

2.3.1.8 Untersuchung auf *Clostridium perfringens*

Verwendete Medien:

- Fluid-Thioglycollat (FTG)-Bouillon³⁴
- Tryptose-Sulfit-Cycloserin (TSC)-Agar³⁵
- Blut-Glucose(„Zeissler“-)-Agar³⁶

³² Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.01590.0500

³³ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.05222.0500

³⁴ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art. Nr. 211260

³⁵ Merck Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.11972.0500

³⁶ Merck Eurolab GmbH, D-64721 Darmstadt, Art. Nr. 1.10455.5000; Glucose 1.04074.1000; Nalgene: Sterlie Sheep Blood Defibrinated, Art. Nr. 5434

Zusätzliche Gerätschaften:

- Anaerobierkammer³⁷
- Gas-Pak-Töpfe³⁸
- AnaeroCult A³⁹
- O₂-Indikatorstreifen⁴⁰
- API 20 A⁴¹

Kulturverfahren: Die Anzucht der Clostridien, sowie die Bebrütung der festen und flüssigen Nährmedien im Rahmen der Versuche findet in der Anaerobierkammer statt. Dieses geschlossene System besteht aus einer Edelstahl-Gerätebasis und einer aufblasbaren Vinyl-Plastikhaube, die gasdicht versiegelt ist. Die Kammer wird mit einem Gasgemisch aus 88 % Stickstoff, 7 % Wasserstoff und 5 % Kohlendioxid gefüllt. Eindringender Sauerstoff wird durch einen Katalysator mit Wasserstoff zu Wasser umgebildet. Eine separat begasbare Schleuse ermöglicht den Materialtransport ohne Unterbrechung der Anaerobiose. Sie ist durch zwei Plexiglastüren hermetisch abschließbar und wird bei jedem Probentransport ins Kammerinnere zunächst zweimal mit Stickstoff (99,996 vol %) gespült, ehe beim letzten Mal das Prüfgas eingelassen wird. Erst jetzt kann die Tür ins Innere geöffnet werden. Zur Kontrolle der Anaerobiose wird ein O₂-Indikatorstreifen mit jeder neuen Probencharge in die Kammer verbracht. Dieses Testblättchen enthält einen Farbstoff (Methylenblau), der im aeroben Milieu in seiner oxidierten Form vorliegt, anaerobes Milieu bewirkt eine chemische Reaktion des Farbstoffes, die das Testblättchen weiß erscheinen läßt. Diese Reaktion ist reversibel.

Außerdem stehen als Ergänzung GasPak®-Anaerobiertöpfe zur Verfügung, bei denen auf chemischem Wege (AnaeroCult A) ein H₂/CO₂-Gasgemisch erzeugt wird. Auch hier können die O₂-Indikatorstreifen mit eingebracht werden um so die anaeroben Bedingungen im Topf zu kontrollieren.

Da Clostridien streng anaerob wachsen, wurde darauf verzichtet, eine Vorverdünnung über Nacht auf den Schüttler zu verbringen. Aus dem Probenmaterial wurden deshalb 20 g in 180 ml NaCl-Lösung eingewogen, geschüttelt und direkt im Verhältnis 1:10 bis zur gewünschten Stufe weiter verdünnt.

³⁷ COY Laboratory Products INC, Model: 12519 REC

³⁸ BBL GasPak® System

³⁹ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.13829

⁴⁰ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art. Nr.270504 (4370504)

⁴¹ bio Mérieux sa; F-69280 Marcy l'Étoile, Art. Nr. 06430 B 20 800

Die ausgewählten Stufen werden drei parallele Röhren mit je 9 ml Fluid-Thioglycollat-Medium überimpft und 24 h bei 39 °C streng anaerob in der Anaerobierkammer bebrütet. Zur Kontrolle des Durchdringungsgrades des Mediums mit Sauerstoff enthält die Lösung den Indikatorfarbstoff Resazurin.

Anschließend wird mit einer ausgeglühten und abgekühlten Drahtöse aus diesen Röhren Tryptose-Sulfit-Cycloserin- oder Blut-Glucose-Agar beimpft und nach 24-48-stündiger Bebrütung unter anaeroben Bedingungen nach dem MPN-Verfahren (s. Kap. 2.2.1.3) ausgewertet.

Clostridium perfringens besitzt die Fähigkeit zur Schwarzfärbung unter Anwesenheit von Sulfit und Eisen. Kolonien, die auf TSC-Agar einen deutlichen Schwärzungseffekt aufweisen, werden deshalb positiv bewertet. Dieser Effekt wurde zuerst von WILSON und BLAIR (1924) beschrieben. Sehr gute Erfolge erzielten BRODSKY und CIEBIN (1979) mit frisch autoklaviertem, dehydriertem Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar bei der Kultivierung von *Clostridium perfringens*. Allerdings wirkt Sulfit in bestimmten Konzentrationen hemmend auf das Clostridien-Wachstum, so daß mit verringerten Anwachsrate um bis zu zwei Zehnerpotenzen zu rechnen ist. Trotzdem ist der TSC-Nährboden ohne Eigelbzusatz im Rahmen der DIN- und ISO-Normen (DIN EN 26 461, ISO 6461-2) als Selektivmedium zur Keimzahlbestimmung von *Clostridium perfringens* ausgewählt worden (EISGRUBER, 1986). Deshalb wurde TSC-Agar verwendet, der für jede Probenaufarbeitung frisch hergestellt und dem nach dem Autoklavieren als Antibiotikum D-Cycloserin⁴² in einer Dosierung von 0,5 g/l zugesetzt wurde.

Alternativ kann auch ein Grundnährboden, dem 10 % Glucose und 5 % Schafblut (Blut-Glucose-Agar) zugesetzt wurden, zur Identifizierung von *Clostridium perfringens* herangezogen werden. Dieser Agar wurde bereits 1969 von DÖLL und SCHMIDT zu diesem Zwecke empfohlen.

Auf diesem Agar sind neben koloniemorphologischen Merkmalen außerdem das Hämolyseverhalten, sowie der typische Geruch und die Grünfärbung der Kolonien nach Luftsauerstoffzutritt zu beurteilen (EISGRUBER, 1986). Bei der Hämolyse handelt es sich um eine zweistufige (Doppelzonen) Hämolyse, die gekennzeichnet ist durch eine vollständige Betahämolyse, an die sich ein Bereich der unvollständigen Hämolyse anschließt.

Zur Überprüfung der Identität der Perfringens-Stämme wird stichprobenartig das API 20A-System verwendet. Dieser Test umfaßt folgende Reaktionen: Indoltest, Ureasetest,

⁴² Calbiochem®, Art. Nr. 239831

Kohlenhydratabbau bei 16 Kohlenhydraten, Gelatinenachweis (Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung), Hydrolyse von Äsculin und Katalasereaktion.

2.3.1.9 Untersuchung auf *Campylobacter jejuni*

Verwendete Medien:

- Preston-Bouillon⁴³
- Campylobacter-Selektiv-Agar⁴⁴
- Blutagar⁴⁵

Zusätzliche Gerätschaften:

- GasPak®-Töpfe⁴⁶
- AnaeroCult C⁴⁷
- API CAMPY⁴⁸

Die Kultivierung unter mikroaerophilen Bedingungen, d. h. mit einem Sauerstoffanteil von ca. 5 vol % und einem Kohlendioxidanteil von 10 vol %, die auf chemischem Wege erzeugt werden, erfolgt in Gas-Pak-Anaerobiertöpfen.

Da *Campylobacter* streng mikroaerophil wachsen, wurde darauf verzichtet eine Vorverdünnung über Nacht auf den Schüttler zu verbringen. Aus dem Probenmaterial wurden deshalb 20 g in 180 ml NaCl-Lösung eingewogen, geschüttelt und direkt im Verhältnis 1:10 bis zur gewünschten Stufe weiter verdünnt.

Aus den gewählten Verdünnungsstufen wird jeweils 1 ml in drei Parallelansätze mit je 9 ml Preston-Bouillon überimpft und mikroaerophil bei 42 °C für 48 h bebrütet.

Aus jedem Ansatz dieser Voranreicherung werden einige Tropfen (ca. 0,1 ml) auf einen Cellulose Nitrate Filter (Porengröße Ø 0,45 µm)⁴⁹, der auf einer Platte Campylobacter-Selektiv-

⁴³ Nährbouillon Nr. 2, OXOID Unipath GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. CM 67; Preston Campylobacter Selective Supplement, OXOID Unipath GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. SR 117 E; Campylobacter Growth Supplement, OXOID Unipath GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. SR 084 E; Laked Horse Blood, OXOID Unipath GmbH, D-46483 Wesel, Art. Nr. 9918324 C

⁴⁴ MERCK Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.02248; Campylobacter Selective Supplement, MERCK Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 2249

⁴⁵ Merck Eurolab GmbH, D-64721 Darmstadt, Art. Nr. 1.10455.5000;

⁴⁶ BBL GasPak® System

⁴⁷ Merck Eurolab GmbH, D-64721 Darmstadt, Art. Nr. 1.16275

⁴⁸ bio Mérieux sa, F-69280 Marcy l'Étoile, Art. Nr. 07038 B 20 800

Agar direkt aufliegt, aufgebracht. Platten samt Filter werden ein bis zwei Stunden mikroaerophil bei 42 °C bebrütet. Anschließend werden die Filter mit einer ausgeglühten und abgekühlten Pinzette vom Agar entfernt und die Platten wieder für 48 h mikroaerophil inkubiert (STELZER, 1991). Kolonien, die unter dem Filter wachsen gelten als Campylobacter-verdächtig. Der Durchmesser der Campylobacter-Kolonien ist sehr unterschiedlich, nach zwei Tagen kann er bis zu einem Zentimeter betragen.

Verdächtige Kulturen werden zur Herstellung einer Reinkultur auf Blutagar überimpft und 48 h bei 42 °C bebrütet. Sind Kolonien gewachsen, die keine Hämolyse zeigen, können diese mit dem API CAMPY-System verifiziert werden und/oder ihre Beweglichkeit mit dem Mikroskop mit dem Hellfeld-Durchlicht-Verfahren betrachtet werden (PALUSZAK, 2000).

Eine quantitative Auswertung erfolgt nach dem MPN-Verfahren (s. Kap. 2.2.1.3); wenigstens eine Kolonie unter einem Filter gilt als positiv.

Campylobacter sind sehr anspruchsvoll, die Nährmedien müssen deshalb stets frisch hergestellt werden (SCHULZE, 1996).

2.3.2 Virologische Methoden

2.3.2.1 Vorbemerkung

Aufgrund der vielfältigen Einflüsse des Substrates auf das Virus und der starken Adsorptionskräfte war es nicht möglich, Viren frei aus dem Substrat zu isolieren.

Um die Inaktivierungsverläufe von Viren während des Prozesses der anaeroben Vergärung und Pasteurisierung untersuchen zu können, wurden aus porenhaltigen Membranen Keimträger (s. Kap. 2.2.3.3) gefertigt. So konnten niedermolekulare Substanzen des anaeroben Prozesses in die Keimträger diffundieren, das Virus jedoch nicht in die Umgebung gelangen. Auf diese Weise waren die eingeschlossenen Viren möglichen inaktivierenden oder stabilisierenden Einflüssen des anaeroben Prozesses ausgesetzt (z.B. pH-Wert, NH₃, Temperatur etc.).

2.3.2.2 Zellkulturen

Verwendete Medien:

- Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)⁵⁰
- fötales Kälberserum (FKS 126L)⁵¹

⁴⁹ SARTORIUS AG, D-37070 Goettingen, Art. Nr. 13806-47-ACN

⁵⁰ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. T 043-50

- nichtessentielle Aminosäuren (NEA)⁵²
- Versen-Trypsin-Lösung (0,125%, 37 °C; s. Kap. 7.2)

Die Zellkulturen waren bis zu ihrer Verwendung bei –80 °C in 1,8 ml gefrierfähigen Röhrchen gelagert. Die Zelldichte im Konservierungsmedium beträgt 2-4x10⁶ Zellen/ml Medium. Das Auftauen erfolgt möglichst rasch bei 37 °C im Wasserbad. Kurz vor dem Ende der Auftauphase wird der gesamte Inhalt des Röhrchens in eine 50 ml-Zentrifugenampulle mit 30 ml Dulbeccos modifiziertem Eagle`s Medium (DMEM, das mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) versetzt war, gegeben. Nach dem vollständigen Schmelzen der Suspension wird bei 175G/25 °C für 7 min zentrifugiert. Anschließend wird das Medium weitestgehend mit einer Pipette abgezogen und das Zellpellet in 5 ml DMEM mit 10 % FKS vorsichtig resuspendiert.

Diese Zellsuspension wird in kleine Zellkulturflaschen verbracht und im Brutschrank (37 °C, 4,5 %CO₂) bis zur Entstehung eines konfluenten Zellrasens bebrütet. Die Zellen werden für die spätere Verwendung zur Virusvermehrung und -titration in mittlere Zellkulturflaschen (200 ml) umgesetzt. Dazu wird das flüssige Medium aus der Flasche entfernt und der Zellrasen mit 2 ml Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %,37 °C) gespült. Dann wird erneut 1 ml Versen-Trypsin-Lösung (0,125 %,37 °C) auf die Zellen gegeben und im Brutschrank 5-20 min inkubiert, um die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes zu lösen.

Die abgelösten Zellen werden in 15 ml des entsprechenden Mediums (s. Kap. 2.2.2.2) vorsichtig suspendiert und in mittlere Zellkulturflaschen überführt. Die weitere Verwendung der Zellen findet erst statt, wenn eine Konfluenz des Zellrasens erreicht ist.

2.3.2.3 Virusvermehrung

Verwendete Medien:

- DMEM (37 °C)
- FKS
- PBS (37 °C; s. Kap. 7.2)

Bovines Parvovirus (Stamm HADEN) wird auf primären bovinen embryonalen Lungenzellkulturen (BEL-Zellen) vermehrt. Als Anzuchtmedium dient DMEM, versetzt mit 10 % FKS.

Die Zellen werden zunächst in Gewebekulturschalen mit oben beschriebenem Medium bis zur Konfluenz vermehrt. Nach dem Abziehen des Mediums mit einer Pipette wird der Zellrasen

⁵¹ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. SO-115

⁵² Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. K 029

zweimal mit je 5 ml einer auf 37 °C angewärmten phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend werden jeweils 1 ml Virussuspension und 4 ml DMEM auf die Zellen gegeben, die Schalen geschwenkt und eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 4,5 %CO²) bebrütet. Um ein Austrocknen des Zellrasens während dieser Zeit der Adsorption von Virus an die Zellen zu verhindern, werden die Schalen immer wieder vorsichtig geschwenkt.

Im Anschluß wird die Suspension wieder abgesaugt, der Zellrasen noch einmal mit PBS (37 °C) gespült und dann mit 25 ml eines Erhaltungsmediums (DMEM+2 %FKS) überschichtet.

Der Zellrasen wird nun weiter im Brutschrank bei 37 °C bebrütet und täglich kontrolliert.

Nach etwa 36-48 h sind mindestens 2/3 des Zellrasens von einem cytopathischen Effekt (cpE) betroffen. Dann kann das Virus geerntet werden, indem das Medium mit den zerstörten Zellen einem dreimaligen Gefrier (-80 °C)-Tau (25 °C)-Zyklus unterzogen wird.

Abschließend wird die Suspension zur Separierung und Entfernung der Zellreste in 50 ml-Zentrifugenröhrchen 20 min bei 1800 G/4 °C zentrifugiert. Der Überstand stellt die Ausgangssuspension des Virus dar und wird bis zur weiteren Verwendung portionsweise in 15 ml Zentrifugenröhrchen bei -80 °C tiefgefroren. Auf diese Weise wird die Infektiosität des Virus nicht beeinträchtigt.

2.3.2.4 Virusnachweis

Verwendete Medien:

- DMEM
- FKS
- Gentamycinsulfat-Lösung⁵³
- Penicillin-G-Lösung⁵⁴
- Streptomycinsulfat-Lösung⁵⁵
- Amphotericin-Lösung⁵⁶
- Beef-Extrakt-Lösung (s. Kap.7.2)

Die quantitative Bestimmung der Infektiosität der Viren wird vor und nach dem Prozeß der anaeroben Fermentation notwendig.

⁵³ Serva, D-69124 Heidelberg, Art. Nr. 17-5182

⁵⁴ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. A321-42

⁵⁵ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. A331-27

⁵⁶ Biochrom/Seromed®, D-12247 Berlin, Art. Nr. A2612

Zur Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe werden zunächst 0,2 ml der zu untersuchenden Virussuspension in ein steriles Glasröhrchen überführt, in welches zuvor 1,8 ml Zellkulturmedium (DMEM mit einem Zusatz von 0,4 % Gentamycinsulfat-Lösung, 0,4 % Penicillin-G-Lösung, 0,4 % Streptomycinsulfat-Lösung, 0,8 % Amphotericin-Lösung und 5 % FKS) vorgelegt wurden. Weitere Verdünnungsschritte, jeweils 1:10 bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-12} folgen, indem jeweils 0,2 ml der vorherigen Suspension in 1,8 ml vorgelegtes Zellkulturmedium weiterpipettiert werden. Je 100 μ l jeder Verdünnungsstufe werden nun in jeweils vier parallele Kavitäten einer 96-well-Microtiterplatte⁵⁷ überführt. Einige Kavitäten einer Platte werden außerdem mit je 100 μ l Titrationsmedium ohne Virus beschickt. Diese dienen später der Zellkontrolle.

Zur Untersuchung der Virusreduktion im Anschluß an einen Versuch, werden zunächst die Polycarbonat-Briefchen der Sandwich-Keimträger (s. Kap.2.2.3.3) an einer Seite vorsichtig mit einer Schere geöffnet, die Zetapor-Membran entnommen und in 1 ml vorgelegte Beef-Extrakt-Lösung untergetaucht. Glasröhrchen mit Lösung und Membran werden dann im Ultraschallbad fünf Minuten auf Eis beschallt, um danach die Beef-Extrakt-Lösung mit einer Pipette abzuziehen und in ein 1,8 ml Einfrier-Zentrifugenröhrchen zu pipettieren. So können die Proben bei -80 °C eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt werden.

Nach dem Auftauen der Probenröhrchen werden diese 20 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, um eventuelle Partikelreste der Membran, die die Zellen mechanisch schädigen können, auszufällen.

Die quantitative Auswertung findet bei allen Versuchen auf Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten/Well (Microtiterplatten) statt.

Die Zellen werden 6-12 h vor der Titration in die Platten eingesät, indem in jede der 96 Kavitäten jeweils 100 μ l der Zellsuspension pipettiert werden. Die Dichte der Suspension ist dabei so bemessen, daß sich die Zellen zum Zeitpunkt der Titration bereits am Plattenboden angeheftet und einen noch nicht ganz geschlossenen Zellrasen gebildet haben. Nach Zugabe der Proben aus den jeweiligen Verdünnungsstufen, folgt eine Inkubation im Brutschrank (4,5 % CO₂) bei 37 °C.

Der Zellrasen in den Microtiterplatten wird täglich lichtmikroskopisch kontrolliert.

Als infiziert und damit viruspositiv gilt ein Well, wenn mindestens ein Herd cytopathisch veränderter Zellen zu erkennen ist. Die Endablesung erfolgt erst, wenn keine Veränderungen im Zellrasen mehr zu erwarten sind, im Falle des BPV, wenn es Vergärungsprozessen ausgesetzt war, etwa nach 10-12 d.

Als Titer wird der positive dekadische Logarithmus derjenigen Verdünnung bezeichnet, bei welcher statistisch die Hälfte der Ansätze reagiert /Angabe in: \log_{10} KID₅₀/Testvolumen).

⁵⁷ Multimed, D-73230 Kirchheim u. Teck, Art. Nr. 149026

Ermittelt wurde dieser Wert nach dem Schätzverfahren von SPEARMAN (1908) und KAERBER (1931). Die ermittelte Viruskonzentration wird auf 1 ml umgerechnet.

2.3.3 Keimträgermethoden

2.3.3.1 Vorbemerkung

Bei Versuchen zur Tenazität von Bakterien wurde mit Keimsuspensionen (s. Kap. 2.2.1.4) beimpftes Substrat in Volumenkeimträger/Prüfkörper eingefüllt und so dem anaeroben Vergärungsprozeß ausgesetzt.

Das bovine Parvovirus dagegen wurde in sogenannten Sandwich-Keimträgern in die Anlagen eingebracht. Um ein späteres Wiederauffinden zu ermöglichen wurden sie in perforierte 50 ml Zentrifugenröhrchen⁵⁸ eingebracht, diese konnten dann mit Kabelbindern an den Probenlanzen fixiert werden.

2.3.3.2 Volumenprüfkörper

Für die Tenazitätsuntersuchungen mit Bakterien wurde die von RAPP (1995) entwickelte spezielle Keimträgertechnik modifiziert und verwendet.

Die Prüfkörper wurden mit einer Mischung aus frischem Gärsubstrat und den entsprechenden Testorganismen befüllt. So werden die Keime von Anfang an dem Milieu des Reaktors und somit all seinen potentiell inaktivierenden oder stabilisierenden Substanzen ausgesetzt. Um eine Angleichung des Keimträgerinhaltes an das Umgebungsmilieu der Vergärungsanlage zu ermöglichen, wurde eine semipermeable Membran verwendet, die aufgrund ihrer geringen Porengröße zugleich das Austreten der Bakterien verhinderte.

Da Versuche sowohl über kurze (24 h), als auch über längere (7-21 d) Zeiträume stattfanden, war es notwendig, Membranen aus unterschiedlichen Materialien zu benutzen. So wurden für Kurzzeitversuche Membranen aus Nitrocellulose⁵⁹ verwendet, die sich aber bei Langzeitversuchen im anaeroben Prozeß zersetzt hätten. Deshalb wurden hierfür solche aus Polycarbonatfolie⁶⁰ verwendet. Die Porengröße betrug dabei einheitlich Ø 0,2 µm.

Die Prüfkörper bestehen aus einer Polycarbonathülse, mit einer Länge von 39,5 mm und einem Durchmesser 31,8 mm, die an ihren Enden mit kommerziell erhältlichen Polycarbonat-

⁵⁸ Cellstar PP-Röhrchen, Greiner Labortechnik, Art. Nr. 227.261

⁵⁹ Cellulose Nitrate Filter, Porengr. Ø 0,2µm, Sartorius AG, D-37075 Göttingen, Art. Nr. 13107-25-N

⁶⁰ Polycarbonate Track-Etch Membrane, Porengr. Ø 0,2µm, Sartorius AG, D-37075 Göttingen, Art. Nr. 23007-25N

Filtrationsvorsätzen⁶¹ verschraubt werden. Zum Schutz gegen mechanische Beschädigungen der Membranen ist der Prüfkörper mit vier perforierten Filterunterstützungen versehen. Zur Abdichtung des Prüfkörpers wird beim Zusammenbau an der Ober- und Unterseite, jeweils zwischen Membran und Filterunterstützung eine Flachdichtung aus Viton⁶² der Materialstärke 0,5 mm eingelegt.

Für die Beschickung der Prüfkörper wird frisches Gärsubstrat der jeweiligen Anlage entnommen, mit einem Stabmixer homogenisiert und mit der entsprechenden, in Kap. 2.2.1.4 beschriebenen Keimsuspension im Verhältnis 10:1 gründlich vermischt.

Jeder Prüfkörper wird mit ca. 15 ml Substrat vorsichtig befüllt. Es wird darauf geachtet, daß die Außenseiten des Zylinders nicht kontaminiert werden.

Abgedichtet und verschraubt können die Prüfkörper so, unmittelbar nach ihrer Fertigstellung, in die Anlage eingebracht werden. Dazu werden sie mit Kabelbindern an zurechtgeschnittenen Lochblechlanzen aus rostfreiem Stahl fixiert und über die Probenahmestutzen im Reaktor plaziert.

Nach entsprechender Aufenthaltszeit werden die Lochblechlanzen entnommen, die Prüfkörper mit Aqua dest. gespült und sofort zur weiteren Untersuchung ins Labor gebracht.

2.3.3.3 Sandwichkeimträger

Diese bereits etablierte Methode, verhindert zwar ein unkontrolliertes Austreten von Virus, erlaubt aber zugleich den direkten Kontakt mit niedermolekularen inaktivierenden oder stabilisierenden Substanzen aus der Umwelt (TRAUB et al., 1986).

Außerdem wird eine mögliche Verlängerung der Überlebenszeiten von Viren in der Umwelt durch Adsorption an, oder Einbettung in suspendierte Partikel durch Nachahmung dieses natürlichen Zustandes berücksichtigt (PESARO et al., 1995).

Ermöglicht wird dies durch die Adsorption der Viren an eine spezielle elektropositiv geladene Membran⁶³, die zwischen zwei Polycarbonatmembranen⁶⁴ mit sehr geringer Porengröße ($\text{\O} 0,1 \mu\text{m}$) eingeschlossen wird (PESARO et al., 1995; SPILLMANN et al., 1987; TRAUB et al., 1986).

Nach dem Auftauen der Virussuspension wird diese mit Phosphat-/Beladungspuffer 1:10 verdünnt und gründlich vermischt.

Eine der Zetapor® Membranen, die zuvor auf einen Durchmesser von 15 mm ausgestanzt wurden, wird in einen einseitig mit einem Dichtungsring versehenen Filtrationsvorsatz so

⁶¹ Sartorius AG, D-37075 Göttingen, Art. Nr. 16517 E

⁶² Viton, Fa. Karl Spaeh, D-72516 Scheer

⁶³ Zetapor® Membrane, Cuno, D-55130 Mainz, Art. Nr. 64085-01-1 MDS

⁶⁴ Infiltec GmbH, D-67346 Speyer, Art. Nr. 19401

eingeschraubt, daß die rauhe Seite nach oben, in Richtung des breiteren Stutzens zu liegen kommt. Von dieser Seite wird die Membran mit einer 2 ml Einwegspritze beladen.

Nun wird der Filtrationsvorsatz mit seinem schmaleren Stutzen auf einem Glaskolben fixiert, die Spritze am oberen (breiteren) Stutzen aufgesteckt und 1 ml der Beladungssuspension in die Spritze pipettiert.

Nachdem die Suspension durch die Membran hindurch getropft ist, wird der Kolben in die Spritze eingeführt und vorsichtig mit der restlichen Flüssigkeit durchgedrückt.

Der Filtrationsvorsatz wird aufgeschraubt, die beladene Membran entnommen und zwischen zwei Polycarbonatfolien mit einer Porengröße von 0,1 µm eingeschweißt. Die von TRAUB beschriebene Filter-Sandwich-Methode wurde an diesem Punkt nach BRAUMILLER (2000) modifiziert, um eine höhere Dichtigkeit zu erreichen.

Die Polycarbonatmembranen wurden zuvor in einer Größe von 2,5x5,0 cm ausgeschnitten, in der Mitte gefaltet und an dieser Kante geschweißt. So konnte die beladene Zetapor-Membran in das nach drei Seiten geöffnete Briefchen eingeschoben und dieses dann gänzlich verschweißt werden.

Die so hergestellten Keimträger-Briefchen werden bis zum Versuch zwischen mit Aqua dest. befeuchtetem Zellstoff in einer Petrischale bei 4 °C gelagert (HOFERER, 2000).

Um die Briefchen anschließend vor mechanischer Beschädigung zu schützen und um ein Wiederauffinden zu ermöglichen, werden sie in gut perforierte 50 ml Zentrifugenröhrchen (s. Kap. 2.2.3) , die mit frischem Gärsubstrat befüllt wurden, eingelegt. Diese Zentrifugenröhrchen können mit Kabelbindern an zurechtgeschnittenen Lochplattenstreifen (Lanzen) fixiert und über die Keimträgerstutzen in den Reaktor eingebracht werden.

Nach Versuchsende werden die Lanzen mit den Zentrifugenröhrchen entnommen, die Keimträgerbriefchen mit einer Pinzette aufgesucht und mit Aqua dest. vorsichtig abgespült. Zwischen befeuchteten Zellstofflagen können sie so in einer Petrischale zur weiteren Aufarbeitung umgehend ins Labor gebracht werden.

Zur Technik der weiteren Aufarbeitung und zum Titrationsverfahren s. Kap. 2.2.2.4 „Virusnachweis“.

2.4 Bestimmung der D-Werte

Um die Inaktivierungsverläufe der verwendeten Testorganismen darstellen zu können, wurden zunächst Wasserbadversuche bei 55 °C angesetzt. Die Testorganismen wurden dazu in Form von beimpftem Substrat (s Kap.2.2.1.4), wie für die Hauptversuche in Prüfkörper verbracht, im Wasserbad bei kontinuierlicher Temperaturkontrolle belassen und nach 20, 22 und 24 h untersucht. Durch diese Versuchsanordnung sollte zum einen die direkte Wirkung von Substrat

und Temperatur auf die Keime berücksichtigt werden, zum anderen sollte der Austausch mit dem Umgebungsmilieu verhindert werden.

Um einen Vergleich führen zu können, wurde der Versuchsansatz parallel in der Vergärungsanlage untersucht. Hier war ein Austausch mit dem Umgebungsmilieu möglich. Die Proben wurden ebenfalls nach 20, 22 und 24 Stunden untersucht.

Die Proben-Entnahme nach 20, 22 und 24 h wurde in Anlehnung an die BioAfV (ANONYM, 1998) gewählt.

Für jeden Testkeim wurde ein Liniendiagramm erstellt, in welches die jeweilige Trendlinie eingefügt wurde. Über die Regressionsgerade wird so eine Berechnung der D-Werte, also der Zeit, die zur Reduktion des Testkeimes um eine Zehnerpotenz benötigt wird, ermöglicht (BÖHM, 1993).

Berechnung der D-Werte

Die Berechnung der D-Werte basiert auf den in den Trendliniendiagrammen dargestellten Formeln. Diese ermöglichen folgende Aussagen:

$$\text{z.B.: } y = -2,4854x + 8,2211 \quad R^2 = 0,6458$$

dabei bedeuten:

- ◆ 2,4854: zeigt die Steigung/das Gefälle der Regressionsgeraden an
- ◆ (-) zeigt das Abfallen der Regressionsgeraden von links nach rechts
- ◆ +8,2211: sagt aus, an welchem Punkt die Regressionsgerade die y-Achse schneidet
- ◆ R^2 (=B; Bestimmtheitsmaß): Maß zur Beschreibung der Güte der Anpassung von Regressionsfunktionen an die gegebenen Meßwertpunkte (KÖHLER et al., 1996), d.h. R^2 ist eine Maßzahl zur Beschreibung der Stärke des Zusammenhangs von Daten (hier Zeit und Titer). B nimmt immer einen Wert zwischen 0 und 1 (bzw. 0 % und 100 %) an. Liegt im Extremfall kein Zusammenhang vor, ergibt sich für B ein Wert von 0. Bei einem vollständigen Zusammenhang liegt der Wert des Bestimmtheitsmaßes bei 1.

Der D-Wert ergibt sich aus dem reziproken Wert der Steigung der Ausgleichsgeraden (BRÄUNINGER et al., 1994). Im obigen Beispiel läßt sich der D-Wert also folgendermaßen berechnen:

$1:2,4854=0,40$; wenn die Einheit der x-Achse Stunden bezeichnet, bedeutet dies, daß der entsprechende Testkeim in einer Zeit von 0,40 h um eine Zehnerpotenz reduziert würde.

Erstellung der Trendliniendiagramme

- ◆ alle Werte wurden bei Wasserbadtemperaturen von 55 °C ermittelt,
- ◆ es wurde lediglich die Keimreduktion im thermophilen Bereich nach 20, 22 und 24 h berücksichtigt,
- ◆ aus den Ergebnissen der Proben, die zum gleichen Zeitpunkt entnommen wurden, wurde der Mittelwert gebildet,
- ◆ es wurden nur diejenigen Proben in die Berechnung mit einbezogen, deren Restinfektionstiter über der Nachweisgrenze lag.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte im thermophilen Bereich für die Keime *Salmonella senftenberg* und *Campylobacter jejuni* keine Infektiosität mehr nachgewiesen werden.

Für *Salmonella senftenberg* liegen jedoch D-Wert-Berechnungen von HOFERER (2000) vor, die übernommen werden können.

Da für *Campylobacter jejuni* keine Werte aus der thermophilen Vergärung vorliegen, wurden die Wasserbadversuche zur Ermittlung der D-Werte so abgewandelt, daß die Temperatur auf 70 °C erhöht wurde, die Probenentnahmen aber nach 10, 20 und 30 Minuten erfolgten.

3 Ergebnisse

3.1 D-Werte der verwendeten Testorganismen im Wasserbad

In den Abbildungen 6 bis 10 sind die Inaktivierungsverläufe sowie die daraus errechneten Regressionsgeraden aus den Wasserbadversuchen für die Testkeime dargestellt, die später auch in den Hauptversuchen verwendet wurden.

Aus der in Abbildung 6 dargestellten Regressionsgeraden von *E. coli* bei 55 °C im Wasserbad errechnet sich ein D-Wert von 1,39 h.

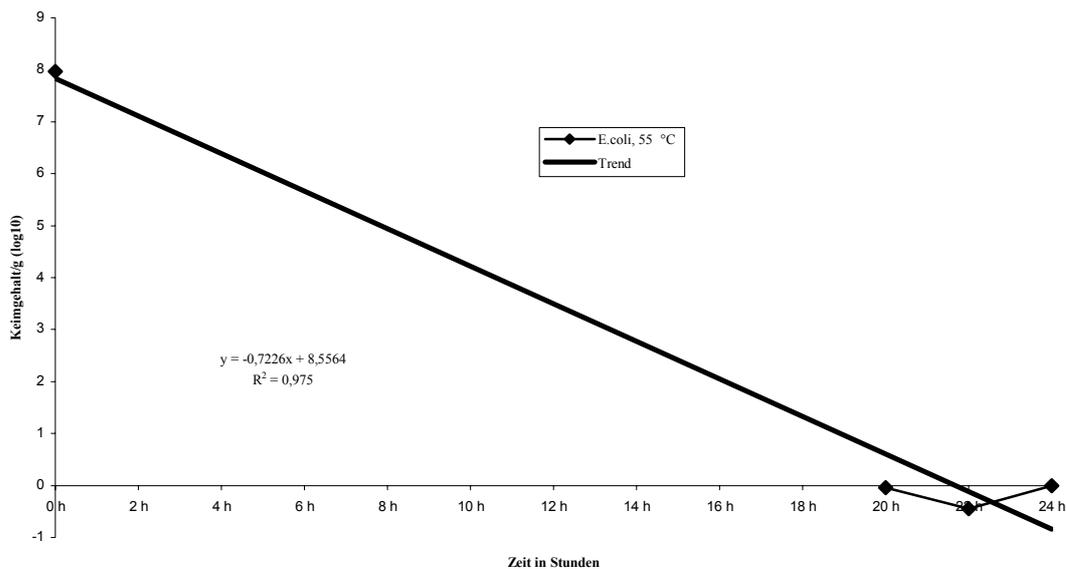


Abb. 6: Regressionsgerade für *E. coli* bei 55 °C im Wasserbad

Aus Abbildung 7 geht für *Streptococcus faecium* bei 55 °C im Wasserbad ein D-Wert von 1,46 h hervor.

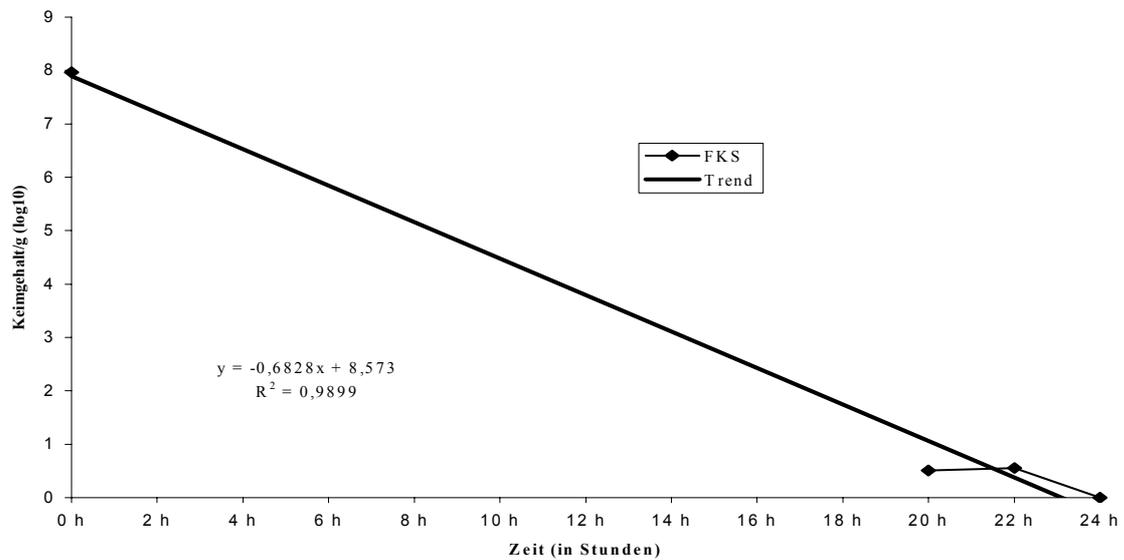


Abb. 7: Regressionsgerade für *Streptococcus faecium* bei 55 °C im Wasserbadversuch

Der D-Wert für *Clostridium perfringens* wird in Abbildung 8 mit einem Wert von 8,76 h ersichtlich.

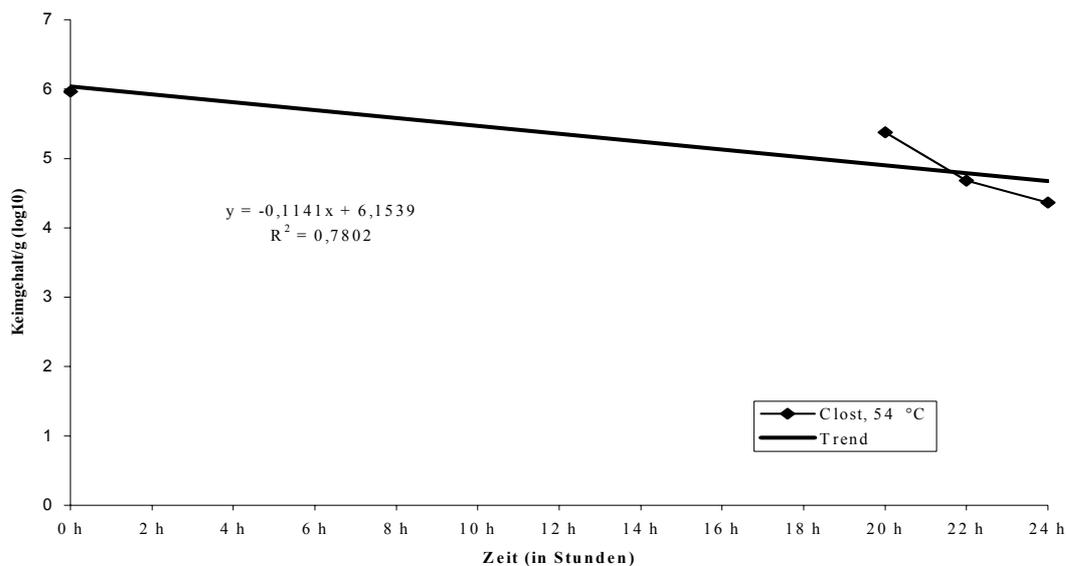


Abb. 8: Regressionsgerade für *Clostridium perfringens* bei 55 °C im Wasserbad

Für *Campylobacter jejuni* wurde eine Regressionsgerade bei 70 °C im Wasserbad erstellt, da es aus technischen Gründen nur möglich war, das Inaktivierungsverhalten dieses Keimes in der Pasteurisierung zu untersuchen. Es ergibt sich bei 70 °C ein D-Wert von 0,43 min, der in Abbildung 9 dargestellt ist.

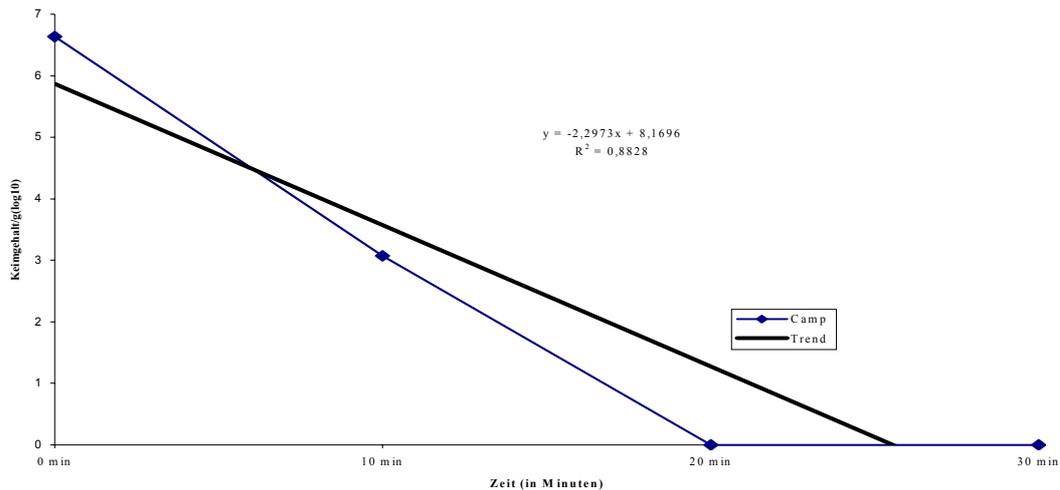


Abb. 9: Regressionsgerade für *Campylobacter jejuni* bei 70 °C im Wasserbadversuch

Der Wasserbadversuch mit bovinem Parvovirus (BPV) ist in Abbildung 10 dargestellt; hier konnte ein D-Wert von 1,98 h bei 55 °C im Wasserbad ermittelt werden.

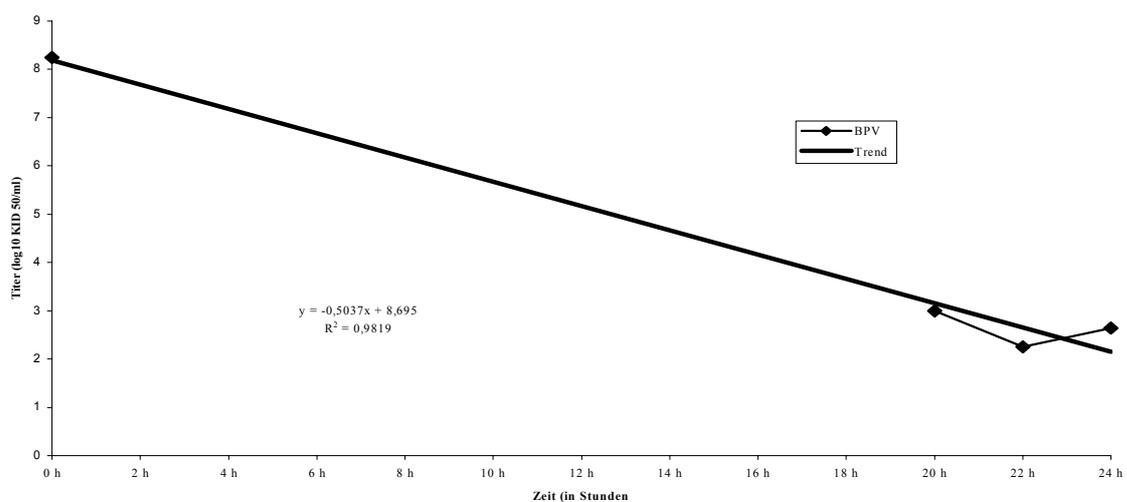


Abb. 10: Regressionsgerade für BPV bei 55 °C im Wasserbadversuch

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht aller in den Wasserbadversuchen ermittelten D-Werte, einschließlich der von HOFERER (2000), übernommenen für *Salmonella senftenberg* (s. Kap. 2.4).

Tab. 1: Übersicht über die im Wasserbad ermittelten D-Werte

D-Werte (in Stunden)		Temperatur	
		55 °C	70 °C
Bakterien	<i>E. coli</i>	1,39	
	<i>Streptococcus faecium</i>	1,46	
	<i>Salmonella senftenberg</i>	0,42	
	<i>Clostridium perfringens</i>	8,76	
	<i>Campylobacter jejuni</i>		0,043
Virus	bovines Parvovirus	1,98	

Im Wasserbad bei einer Temperatur von 55 °C konnte für *E. coli* ein D-Wert von 1,39 Stunden, für *Streptococcus faecium* ein Wert von 1,46, für *Clostridium perfringens* von 8,76 und für das bovine Parvovirus von 1,98 Stunden ermittelt werden.

Für *Salmonella senftenberg* wurde der D-Wert von 0,42 Stunden bei 55 °C im Wasserbad von HOFERER (2000) übernommen.

Campylobacter jejuni konnte im Wasserbad nur bei 70 °C überprüft werden. Hier ergab sich ein D-Wert von 0,043 Stunden.

3.2 Modellanlagen

3.2.1 Bakteriologischer Status im Substrat

Um einen Überblick über die Auswirkungen der anaeroben Kofermentation auf den bakteriellen Status im Substrat zu erhalten, wurden regelmäßig (ca. 1-2 mal monatlich) Output-Untersuchungen unternommen, die in Tabelle 2 dargestellt werden.

Gelegentlich wurde zugleich auch der Input untersucht um einen direkten Vergleich des Bakterienstatus vor und nach der Vergärung zu erhalten.

Die Substrate wurden jeweils auf die Anzahl von nativen Salmonellen sowie auf das Vorkommen von nativen *Escherichia coli*, Fäkalstreptokokken , *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni* untersucht.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über den Bakterienstatus im Outputmaterial nach unterschiedlicher Vorbehandlung.

Tab. 2: Übersicht über den Bakterienstatus im Outputmaterial nach unterschiedlicher Vorbehandlung (Angaben in KBE/g bzw.50g Substrat)

Vorbehandlung	Salm/50g	E. coli/g	FKS/g	Clost/g	Camp/g
VP/ mesophile Faulung	n.n.	1,50E+02	4,30E+03	7,50E+05	3,60E-01
	n.n.	4,30E+02	1,50E+04	4,30E+04	2,30E+00
	n.n.	1,50E+01	9,30E+02	9,30E+04	2,30E+00
mesophile Faulung	n.n.	n.n.	4,30E+00	9,30E+05	n.n.
	n.n.	n.n.	2,30E+02	n.d.	3,60E-01
	n.n.	n.n.	1,50E+01	n.d.	2,30E+00
	n.n.	n.n.	2,30E+02	2,10E+05	n.n.
	n.n.	2,80E+02	3,3,E+03	n.d.	n.d.
	n.d.	9,30E+01	9,20E+03	n.d.	n.d.
	n.d.	4,30E+00	4,30E+03	n.d.	n.d.
mesophile Faulung/NP	n.n.	n.n.	1,50E+01	9,20E+00	n.n.
	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+03	n.d.
	n.n.	n.n.	n.n.	2,00E+01	n.d.
	n.n.	n.n.	n.n.	6,40E+02	n.d.
thermophile Faulung, G/SR	n.n.	n.n.	2,30E+00	9,20E+00	n.n.
	n.n.	3,60E-01	n.n.	9,20E+02	2,30E+00
	n.n.	n.n.	4,30E+00		3,60E-01
	n.n.	9,30E+01	4,30E+03	9,30E+04	2,30E+00
	n.n.	n.n.	1,50E+04	7,40E+04	3,60E-01
	n.n.	9,20E+02	7,50E+04	7,40E+04	n.d.
	n.n.	9,30E+02	2,30E+03	4,30E+03	n.d.
thermophile Faulung, G/SR/BA	n.n.	1,50E+03	2,30E+04	4,30E+04	n.d.
	n.n.	2,30E+02	9,30E+02	4,30E+03	2,30E+00
	n.n.	2,30E+00	9,30E+01	2,30E+03	3,60E-01
	n.n.	1,10E+02	4,30E+02	2,30E+04	n.d.
	n.n.	n.n.	1,10E+00	7,40E+01	n.n.
	n.n.	n.d.	n.d.	4,30E+02	n.n.
	n.n.	1,10E+00	2,10E+00	4,30E+02	n.n.
n.n.	7,50E+00	4,30E+01	4,30E+03	n.d.	

Salm: *Salmonella senftenberg*; E. coli: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*; G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; VP/NP: Vor-bzw. Nachpasteurisierung; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Es wurden aus dem mesophilen Temperaturbereich mit Vorpasteurisierung drei, aus mesophiler Faulung acht und aus mesophiler Faulung mit Nachpasteurisierung vier Output Proben untersucht.

Aus dem thermophilen Temperaturbereich mit einer Substratzusammensetzung von 75 % Gülle und 25 % Speiseresten kamen acht, von 50 % Gülle, 25 % Speiseresten und 25 % Bioabfällen sieben Proben zur Untersuchung.

In keiner der untersuchten Output Proben, weder aus den mesophilen noch aus den thermophilen Vergärungsverfahren, konnten native Salmonellen (in 50 g Substrat) nachgewiesen werden.

Im mesophilen Bereich, ohne jede Pasteurisierungsphase lag *Escherichia coli* in drei Fällen unterhalb der Nachweisgrenze. In den 4 übrigen untersuchten Proben dieses Bereichs konnten die Bakterien knapp oberhalb dieser Grenze mit bis zu zwei Zehnerpotenzen KBE/g Substrat nachgewiesen werden.

Wurde das Substrat vor der mesophilen Faulung pasteurisiert, also eine Stunde lang bei 70 °C erhitzt, wurde *E. coli* ebenfalls mit 10^1 bis 10^2 KBE/g nachgewiesen.

Bei einer Pasteurisierung nach der mesophilen Faulphase dagegen lagen alle Untersuchungsergebnisse unterhalb der Grenze ihrer Nachweisbarkeit.

Nach einer Faulung im thermophilen Bereich mit Ausgangssubstrat Gülle und Speiseresten, konnte *E. coli* in drei von acht Fällen nicht mehr nachgewiesen werden, die übrigen Ergebnisse lagen bei 10^1 bis 10^3 KBE/g Substrat.

Wurde als Ausgangssubstrat ein Gemisch aus Gülle, Speiseresten und Bioabfällen eingesetzt konnte *E. coli* in einem von sieben Fällen nicht nachgewiesen werden. In den übrigen Untersuchungen wurden bis zu 10^2 KBE/g Substrat festgestellt.

Streptococcus faecium war nach mesophiler Faulung, sowie nach Vorpasteurisierung mit anschließender mesophiler Faulung stets in einem Bereich von der Nachweisgrenze bis zu 10^4 KBE/g nachweisbar.

Nach mesophiler Faulung mit Nachpasteurisierung lagen bis auf ein Ergebnis, das 10^1 KBE/g zeigte, alle übrigen unterhalb der Nachweisgrenze.

Nach thermophiler Faulung mit Gülle und Speiseresten konnten die Keime bis zu 10^4 KBE/g nachgewiesen werden. Die Werte lagen bei thermophiler Faulung mit zusätzlichen Bioabfällen jedoch in einem Bereich von 10^0 bis 10^2 KBE/g.

Clostridium perfringens konnte bei Proben sämtlicher Versuchsanordnungen nachgewiesen werden. Die Werte lagen bei mesophiler Faulung und mesophiler Faulung mit Vorpasteurisierung im Bereich 10^4 bis 10^5 KBE/g, bei mesophiler Faulung mit Nachpasteurisierung bei bis zu 10^3 KBE/g.

Nach thermophiler Faulung wurden bei beiden Substratkombinationen zwischen 10^0 und 10^4 KBE/g festgestellt.

Campylobacter jejuni konnte in allen untersuchten Versuchsanordnungen nur knapp über der Nachweisgrenze festgestellt werden. Bei mesophiler Faulung, mesophiler Faulung mit Nachpasteurisierung, sowie in beiden thermophilen Anordnungen lagen die Ergebnisse einzelner Proben auch unter dieser Grenze.

Einige der untersuchten Output Proben wurden anschließend in 1 l-Plastikgefäße gegeben, verschlossen und auf der Wetter abgewandten Seite des Institutsgebäudes im Freien gelagert. Nach jeweils 1, 2 und 3 Monaten wurden die Proben erneut auf ihren Bakterienstatus untersucht. Die Lagerung im Freien sollte die natürlichen Temperaturschwankungen, denen im Freien gelagerte Fermentersubstrate in praxi ausgesetzt sind, nachstellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Untersuchungen der Output Proben nach 1, 2 und 3 Monaten Lagerungsdauer (Angaben in KBE/g bzw. 50 g Substrat)

Vor- behandlung	Salmonellen /50g			<i>Escherichia coli</i> /g			Fäkalstreptokokken /g			<i>Clostridium perfringens</i> /g			<i>Campylobacter jejuni</i> /g		
	1 Monat	2 Monate	3 Monate	1 Monat	2 Monate	3 Monate	1 Monat	2 Monate	3 Monate	1 Monat	2 Monate	3 Monate	1 Monat	2 Monate	3 Monate
VP/meso- phile Faulung	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+02	n.n.	n.n.	2,30E+03	2,30E+02	9,30E+01	9,30E+01	9,30E+04	1,50E+04	3,60E-01	3,60E-01	3,60E-01
	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+02	2,40E+02	n.n.	9,30E+03	9,30E+01	9,30E+02	4,30E+04	9,30E+06	2,30E+05	2,30E+00	2,30E+00	3,60E-01
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.	4,30E+02	3,60E+02	n.d.	7,40E+04	9,30E+04	n.d.	2,30E+00	2,30E+00	n.d.
mesophile Faulung	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,60E+00	n.n.	n.n.	9,20E+02	1,50E+05	2,30E+04	2,30E+00	3,60E-01	9,20E-01
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,50E+01	1,50E+01	4,30E+01	n.d.	n.d.	4,30E+04	n.d.	n.d.	2,30E+00
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+01	n.n.	7,50E+00	3,60E-01	2,30E+04	3,60E+01	2,00E+03	9,30E+03	2,30E+00	3,60E-01	n.d.
thermophile Faulung, G/SR	n.n.	n.n.	n.n.	7,40E-01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,20E-01	2,00E+04	7,50E+02	n.n.	2,30E+00	2,30E+00
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,60E-01	n.n.	n.n.	2,10E+03	2,30E+03	n.n.	3,60E-01	9,20E-01
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,30E+00	2,00E+00	9,20E-01	9,30E+00	7,50E+03	9,30E+03	9,30E+03	9,20E-01	2,30E+00	n.n.
thermophile Faulung, G/SR/BA	n.n.	n.n.	n.n.	9,30E+00	n.n.	n.d.	9,30E+02	n.d.	n.d.	n.d.	7,20E+02	n.d.	9,20E-01	n.n.	n.n.
	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+00	n.n.	9,20E-01	2,10E+01	4,30E+00	1,50E+02	2,30E+04	7,40E+01	9,30E+03	n.n.	n.n.	n.n.
	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.-	4,30E+00	2,10E+02	7,20E+02	1,50E+03	4,30E+03	n.n.	3,60E-01	n.n.
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.	2,30E+00	4,30E+00	n.d.	4,30E+03	2,30E+04	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.	3,60E-01	9,30E+01	n.d.	1,50E+03	7,40E+02	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.
	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.	n.d.	9,30E+01	n.d.	n.d.	3,60E+03	n.d.	n.d.	n.n.	n.d.	n.d.

KBE: Koloniebildende Einheiten; G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; VP/NP: Vor- bzw. Nachpasteurisierung; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Aus den Temperaturbereichen mesophile Faulung mit Vorpasteurisierung, mesophile Faulung und thermophile Faulung mit 75 % Gülle und 25 % Speiseresten wurden jeweils drei Output Proben über einen Zeitraum von drei Monaten regelmäßig untersucht.

Sechs Output Proben kamen aus dem thermophilen Bereich mit 50 % Gülle, 25 % Speiseresten und 25 % Bioabfällen zur Untersuchung.

Es zeigt sich hier, daß auch bei keiner der Nachuntersuchungen Salmonellen gefunden werden konnten.

Bei *E. coli* reduzierten sich die Keimgehalte über die Wochen weiter, bis sie nach drei Monaten schließlich bis auf zwei Ausnahmen nicht mehr nachweisbar waren. Diese Ausnahmen liegen jedoch ebenfalls nur knapp über der Nachweisgrenze.

Die Keimzahlen der Fäkalstreptokokken verändern sich in den ersten vier Wochen kaum, reduzieren sich jedoch im zweiten Monat um bis zu zwei Zehnerpotenzen. Nach drei Monaten steigen die Keimzahlen, besonders bei den Proben aus der mesophilen und thermophilen (mit Gülle, Speisereste, Bioabfall) Faulung wieder um bis zu zwei Zehnerpotenzen an. Der Anstieg auf vier Zehnerpotenzen nach drei Monaten, wie er in einer Untersuchung vorliegt, erscheint aber unter Betrachtung aller übrigen Werte extrem und muß auf einen Meßfehler zurückgeführt werden.

Bei Proben aus der mesophilen Faulung mit Vorpasteurisierung zeigen sich in den Keimzahlen von *Clostridium perfringens* nur leichte Schwankungen, die absoluten Zahlen ändern sich jedoch auch nach drei Monaten nicht. Auch bei den Proben aus den übrigen Verfahren läßt sich dies beschreiben. Lediglich bei Proben aus der thermophilen Faulung mit Gülle, Speiseresten und Bioabfällen ist innerhalb der ersten vier Wochen eine Zunahme der Keimzahlen um bis zu drei Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Diese Zahlen bleiben aber, von kleinen Schwankungen abgesehen, in den nächsten acht Wochen stabil.

Campylobacter jejuni zeigt Zahlenwerte, die sich über die Monate kaum verändern und stets an der Grenze ihrer Nachweisbarkeit bleiben.

Insgesamt läßt sich erkennen, daß eine Veränderung der Zahlenwerte über die Monate unabhängig zu sein scheint von der Art der Vorbehandlung, wenn auch eine unterschiedliche Vorbehandlung einen unterschiedlichen Abbau der organischen Masse zur Folge hat.

Um einen Überblick über die Effektivität der Modellanlage im Hinblick auf die Keimreduktion zu erhalten, wurden in Tabelle 4 In- und Output Proben gegenübergestellt und der Keimgehalt vor und nach dem Durchlaufen des Prozesses festgehalten.

Tab. 4: Vergleichsuntersuchungen Input/Output im mesophilen und thermophilen Bereich (Angaben in KBE/g bzw. 50 g Substrat).

Vorbehandlung	IN/OUT	Substrat	Salm/50g	<i>E. coli</i> /g	FKS/g	Clost/g	Camp/g
mesophile Faulung, G/SR	IN	G	n.n.	4,30E+03	1,50E+04	3,60E+03	2,30E+00
	IN	SR	n.n.	3,60E+00	9,30E+04	n.d.	n.n.
	OUT		n.n.	n.n.	2,30E+02	2,10E+05	n.n.
	IN	G	n.n.	9,30E+02	7,50E+03	7,40E+02	9,30E+00
	IN	SR	n.n.	9,30E+03	7,50E+01	3,60E+02	2,30E+00
	OUT		n.n.	n.n.	1,50E+01	n.d.	2,30E+00
	IN	G, SR	n.n.	2,30E+04	3,60E+04	n.d.	n.d.
	OUT		n.n.	2,30E+02	9,30E+04	1,50E+03	n.d.
	IN	G, SR	n.n.	9,30E+02	2,30E+04	n.d.	n.d.
	OUT		n.n.	2,80E+02	3,3,E+03	n.d.	n.d.
	IN	G, SR	n.d.	n.n.	2,30E+04	n.d.	n.d.
	OUT		n.d.	9,30E+01	9,20E+03	n.d.	n.d.
	IN	G, SR	n.n.	2,40E+04	2,40E+06	2,40E+03	n.d.
	OUT		n.d.	4,30E+00	4,30E+03	n.d.	n.d.
thermophile Faulung, G/SR/BA	IN	G, SR, BA	n.n.	1,50E+03	4,30E+03	2,30E+04	n.n.
	OUT		n.n.	2,30E+02	9,30E+02	4,30E+03	2,30E+00
	IN	G, SR, BA	n.n.	9,30E+03	9,30E+05	9,30E+03	n.d.
	OUT		n.n.	2,30E+00	9,30E+01	2,30E+03	3,60E-01
	IN	G, SR, BA	n.n.	9,30E+03	1,50E+05	7,20E+02	2,10E+00
	OUT		n.n.	1,10E+02	4,30E+02	2,30E+04	n.d.
	IN	G, SR	n.n.	9,30E+03	n.d.	n.d.	9,20E-01
	OUT		n.n.	9,20E+02	7,50E+04	7,40E+04	n.d.
	IN	G, SR, BA	n.n.	1,50E+04	2,90E+05	1,50E+04	n.d.
	OUT		n.n.	7,50E+00	4,30E+01	4,30E+03	n.d.
	IN	SR	n.n.	9,30E+05	2,30E+05	9,20E+00	1,50E+00
	IN	G	n.n.	4,30E+03	2,30E+05	1,50E+02	n.n.
	IN	BA	n.n.	9,30E+04	9,30E+02	1,50E+04	n.n.
	OUT		n.n.	9,30E+02	2,30E+03	4,30E+03	n.d.
	IN	G, SR	n.n.	2,40E+05	1,10E+06	1,50E+05	n.d.
	OUT		n.n.	1,50E+03	2,30E+04	4,30E+04	n.d.

Salm: *Salmonella senftenberg*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*; KBE: Koloniebildende Einheiten; G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Aus dem Bereich der mesophilen Faulung wurden insgesamt sechs zusammengehörende Input/Output Proben untersucht.

Bei thermophiler Faulung und einer Substratzusammensetzung von 50 % Gülle, 25 % Speiseresten und 25 % Bioabfällen waren es sieben zusammengehörende Proben.

In keiner der durchgeführten Untersuchungen konnten Salmonellen nativ nachgewiesen werden.

In der mesophilen Faulung, bei einem Beschickungsmaterial von 75 % Gülle und 25 % Speiseresten, wird bei *E. coli* eine Reduktion der Keimzahlen von Input zu Output um bis zu vier Zehnerpotenzen deutlich. In drei von sechs Fällen lagen die Zahlen beim Output sogar unter der Nachweisgrenze.

Auch bei *Streptococcus faecium* ist eine Reduktion im Output (im Vergleich zum Input) um eine bis drei Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Nur in einem Fall konnte keine Reduktion der Keime festgestellt werden.

Für *Clostridium perfringens* liegt nur eine Vergleichsuntersuchung vor, bei der jedoch im Output eine um zwei Zehnerpotenzen höhere Keimzahl gefunden wurde wie im Input.

Bei *Campylobacter jejuni* liegen sämtliche Untersuchungsergebnisse an der Nachweisgrenze, eine deutliche Reduktion vom Input zum Output kann deshalb nicht beschrieben werden.

In der thermophilen Faulung, bei einem Beschickungsmaterial von 50 % Gülle, 25 % Speiseresten und 25 % Bioabfällen wird bei *E. coli* eine Reduktion der Keimzahlen im Vergleich Input/Output um ein bis vier Zehnerpotenzen festgestellt.

Die Fäkalstreptokokken lassen in diesem Vergleich ebenfalls eine Reduktion von ein bis vier Zehnerpotenzen erkennen.

Bei *Clostridium perfringens* dagegen wird eine wirkliche Reduktion der Keimzahlen vom In- zum Output nicht deutlich. Die Zahlen schwanken vielmehr in einem Bereich von 10^3 - 10^4 sowohl im In- als auch im Output.

Für *Campylobacter jejuni* gilt das bei der mesophilen Faulung (s. oben) beschriebene.

Wesentliche Unterschiede in den Keimzahlreduktionen bei mesophiler und thermophiler Faulung konnten nicht festgestellt werden.

Weisen Fäkalstreptokokken im Output Keimzahlen um bis zu vier Zehnerpotenzen auf (einmal im mesophilen Bereich, im thermophilen zweimal) scheinen diese Werte insgesamt betrachtet sehr hoch. In diesen Fällen ist auch an eine Rekontamination des Materials durch die Umgebung, insbesondere durch verschmutzte Auffangbehälter, wie es nicht immer ganz zu vermeiden war, zu denken.

3.2.2 Prüfkörperversuche im mesophilen Temperaturbereich

Zunächst wird in Tabelle 5 eine Übersicht gegeben über die durchgeführten Versuche im mesophilen Temperaturbereich, einschließlich der in diesen Zeiträumen festgehaltenen Prozeßparameter. Bei diesen Angaben handelt es sich, sofern die Versuche sich über Zeiträume länger als 24 Stunden erstreckten, um errechnete Mittelwerte, jeweils unter Angabe des Mini- und Maximalwertes aus diesem Zeitraum.

Bei den Prozeßparametern sind im Einzelnen pH-Wert, Temperatur im Inneren des Fermenters erfaßt..

Tab. 5: Übersicht über die Prüfkörperversuche im mesophilen Bereich (ca. 33 °C), einschließlich der begleitenden Prozeßparameter Gasvolumina, pH-Wert, Redoxpotential und Faulraumtemperatur; Beschickungsmaterial: Gülle/Speisereste 3:1

Keimträgerversuche		Beschickung/d			Gas Vol (m ³ /24h)			pH-Wert			Redoxpot (mVx-1)			°C (innen)				
Datum	Dauer	Keimart	G (l)	SR (l)	BA (l)	PaS (l)	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW
mesophile Faulung, G/SR																		
26.8.-15.9.99	21 Tage	BPV	15	5			0,114	0,534	0,298	7,44	8,16	7,77	471	597	564	33	33,1	33
22.10.-12.11.99	21 Tage	FKS	15	5			0,058	0,763	0,442	7,12	7,63	7,38	n.d.	n.d.	n.d.	32,6	32,9	32,8
26.10.-16-11.99	21 Tage	EHEC	15	5			0,058	1,455	0,472	7,29	7,67	7,41	511	519	514	32,6	32,9	32,8
16.11.-7.12.99	21 Tage	Clost				20	0,266	1,229	0,721	7,18	7,84	7,58	512	528	520	28	34,6	33,1
26.1.-15.2.00	21 Tage	<i>E. coli</i>	15	5			0,289	1,288	0,719	7,34	7,87	7,49	510	528	510	33,3	33,4	33,3
26.1.-15.2.00	21 Tage	FKS	15	5			0,289	1,288	0,719	7,34	7,87	7,49	510	528	510	33,3	33,4	33,3
26.1.-15.2.00	21 Tage	Clost	15	5			0,289	1,288	0,719	7,34	7,87	7,49	510	528	510	33,3	33,4	33,3
13.3.-3.4.00	21 Tage	BPV				15	0,373	1,305	0,661	7,35	7,51	7,42	305	525	501	33,2	33,7	33,3
3.4.-23.4.00	21 Tage	Camp	15	5			0,461	1,804	0,911	7,35	7,58	7,65	128	514	350	33,1	33,5	33,2

G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; PaS: pasteurisiertes Substrat; n.d.: nicht durchgeführt; GasVol: produzierte Gasvolumina; Redoxpot: Redoxpotential; °C (innen): Temperatur im Inneren des Fermenters; MIN: Minimalwert im Versuchszeitraum; MAX: Maximalwert im Versuchszeitraum; MW: errechneter Mittelwert der MIN/MAX im Versuchszeitraum; Salm: *Salmonella senftenberg*; EHEC: Enterohämorrhagische *E. coli*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*;

Aus den gewonnenen Daten wird deutlich, daß die Temperatur im Fermenter nur sehr geringen Schwankungen unterlag. Die maximale Abweichung von der Solltemperatur (33 °C) betrug lediglich 0,3 °C.

Die pH-Wert Messungen ergaben bei allen Versuchen Werte zwischen pH 7,3 und 7,8. Diese Werte blieben im gleichen Bereich, wenn zur Beschickung der Anlage ausschließlich pasteurisiertes Material verwendet wurde.

Die Höhe des Redoxpotentials schwankt während der verschiedenen Versuchsdurchgänge zwischen -350 und -564 mV. Sehr niedrige Werte sind nur von kurzer Dauer, Meßungenauigkeiten sind auf Grund dessen nicht auszuschließen.

Die in 24 Stunden produzierte Biogasmenge zeigt größere Schwankungen zwischen 298 und 911 Liter. Ein wesentlicher Unterschied in der produzierten Gasmenge bei Beschickung mit frischem oder pasteurisiertem Material ist nicht zu erkennen.

Weitere Vergleiche siehe auch Kapitel 3.2.4. „Prüfkörperversuche im thermophilen Temperaturbereich“.

3.2.2.1 Versuche mit Bakterien

Im mesophilen Temperaturbereich wurden Versuche mit allen verwendeten Prüfkeimen einmal mit Vorpasteurisierung und einmal mit Nachpasteurisierung durchgeführt.

Die jeweiligen Aufheizphasen wurden nicht mit betrachtet.

Ergebnisse dieser Versuchsvariante sind in den Tabellen 6 und 7 dargestellt.

Tab. 6: Keimzahlreduktion durch Pasteurisierung ohne Aufheizphase eine Stunde bei 70 °C und anschließender mesophiler Faulung bei 33 °C über einen Zeitraum von 21 d; Substrat: Gülle, Speisereste 3:1 (Angaben in KBE/ml bzw. g)

Keim	Substrat, beimpft	KT 1										KT 2					Endkontrolle
		70 °C/20min	70 °C/40min	70 °C/60min	24 h, 33 °C	7 Tage, 33 °C	21 Tage, 33 °C	70 °C/20min	70 °C/40min	70 °C/60min	24 h, 33 °C	7 Tage, 33 °C	21 Tage, 33 °C				
		Salm	9,30E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
FKS	9,30E+07	1,10E+07	2,40E+05	3,60E-01	2,30E+02	4,30E+01	1,10E+07	9,30E+04	n.n.	n.n.	n.n.	1,10E+07	9,30E+04	n.n.	n.n.	2,30E+02	2,30E+05
<i>E. coli</i>	9,30E+08	2,40E+08	9,30E+02	n.n.	9,30E+00	n.n.	7,50E+06	2,30E+01	n.n.	n.n.	n.n.	7,50E+06	2,30E+01	n.n.	n.n.	3,60E-01	9,20E+05
Camp	9,30E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,50E+05
Clost	9,30E+05	7,40E+04	3,60E+04	3,00E+04	2,30E+06	4,30E+05	7,50E+04	9,30E+04	2,30E+04	2,30E+04	2,30E+04	9,30E+04	4,30E+06	2,30E+04	3,60E+04	3,60E+05	
Clost	1,10E+06	1,50E+04	9,30E+03	4,30E+04	1,10E+07	4,10E+05	4,60E+04	4,60E+04	1,10E+04	1,10E+07	1,10E+07	4,60E+04	1,10E+07	1,10E+07	4,10E+05	2,30E+05	
Camp	9,30E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,50E+04

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; *E. coli*: *Escherichia coli*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp.: *Campylobacter jejuni*; KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

Tab. 7: Keimzahlreduktion durch mesophile Faulung bei 33,3 °C und anschließender Pasteurisierung ohne Aufheizphase eine Stunde bei 70 °C über einen Zeitraum von 21 Tagen; Substrat: Gülle, Speisereste 3:1 (Angaben in KBE/ml bzw. g)

Keim	Substrat, beimpft	KT 1										KT 2					Endkontrolle
		24 h, 33,3 °C	7 Tage, 33,3 °C	21 Tage, 33,3 °C	70 °C/20min	70 °C/40min	70 °C/60min	P/24 h	24 h, 33,3 °C	7 Tage, 33,3 °C	21 Tage, 33,3 °C	70 °C/20min	70 °C/40min	70 °C/60min			
		Salm	9,30E+06	2,40E+05	2,10E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
FKS	1,50E+07	4,60E+07	1,50E+07	4,30E+02	n.n.	n.n.	n.n.	2,40E+06	9,30E+06	2,40E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,30E+07
<i>E. coli</i>	9,30E+06	4,30E+05	2,40E+05	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+05	2,40E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,30E+06
Clost	2,30E+05	9,30E+05	2,10E+05	3,60E+03	1,50E+03	3,60E+03	1,60E+06	9,30E+03	3,60E+03	3,60E+03	2,10E+02	2,10E+04	2,10E+03	1,50E+03	9,30E+03	2,30E+06	
Camp	2,40E+06	9,30E+03	2,30E+02	8,40E+04	n.n.	n.n.	9,00E+05	9,20E+01	7,40E+02	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,20E+02	

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; *E. coli*: *Escherichia coli*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp.: *Campylobacter jejuni*; KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

In der Versuchsanordnung mesophile Vergärung mit Vorpasteurisierung wurde jeder der verwendeten Prüfkeime einmal, *Campylobacter jejuni* und *Clostridium perfringens* zweimal mit je zwei Parallelen eingesetzt.

Die Keimsuspensionen zur Beimpfung der Prüfkörper enthielten 10^7 - 10^9 KBE/ml.

Im unbehandelten Ausgangssubstrat konnten Salmonellen, *E. coli* und *Campylobacter* nicht nachgewiesen werden. Fäkalstreptokokken lagen mit 10^4 , Clostridien mit 10^3 KBE/g vor. Nach der Beimpfung wurden bei Salmonellen, *Campylobacter* und Clostridien 10^6 , bei den Fäkalstreptokokken 10^7 und bei *E. coli* 10^8 KBE/g festgestellt.

Durch die Erhitzung waren *Salmonella senftenberg* und *Campylobacter jejuni* bereits nach 20 min nicht mehr nachzuweisen, die Keimzahlen reduzierten sich also um je sechs Zehnerpotenzen. Beide Keime blieben über den gesamten Versuchsverlauf unterhalb ihrer Nachweisgrenze.

E. coli erfuhr während der ersten 20 min eine Reduktion um höchstens zwei Zehnerpotenzen, war nach 40 min mit 10^2 bzw. 10^1 KBE/g, nach 60 min nicht mehr nachzuweisen. Nach sieben und 21 d in der mesophilen Vergärung konnten stets einige wenige Keime gezählt werden.

Die Keimzahlen von *Streptococcus faecium* blieben ebenfalls in den ersten 20 min unverändert, reduzierten sich nach 40 min um zwei bis drei Zehnerpotenzen und konnten nach 60 min nicht mehr nachgewiesen werden. Dieser Wert wurde in den ersten 24 h der Vergärung beibehalten, stieg danach aber wieder um zwei Zehnerpotenzen an und blieb auf diesem Niveau während des weiteren Versuchs stabil.

Clostridium perfringens konnte nach 20 min um ein bis zwei Zehnerpotenzen reduziert werden. Ein Wert von 10^4 KBE/g wurde über die gesamte Pasteurisierung beibehalten. Nach 24 h in der Vergärung steigen die Keimzahlen leicht an, bleiben dann aber über den gesamten Versuchsverlauf auf dem Niveau der Pasteurisierung.

Endkontrollen (verbleiben während des gesamten Versuchs bei 4 °C im Laborkühlschrank), die nach 21 d untersucht wurden, wiesen Keimzahlen von 10^4 (Camp) bis 10^7 (Salm) KBE/g auf.

In der umgekehrten Versuchsanordnung (mesophile Vergärung mit Nachpasteurisierung) wurde jeder der verwendeten Prüfkeime einmal mit je zwei Parallelen eingesetzt.

Die Impflösungen wiesen Keimgehalte mit 10^7 (FKS) bis 10^9 (Salm) KBE/ml auf.

Im Substrat konnten Salmonellen und *Campylobacter* nicht nachgewiesen werden. Fäkalstreptokokken, *E. coli* und *Clostridium perfringens* mit je 10^3 KBE/g. Nach der Beimpfung wiesen die Substrate 10^5 (Clost) bis 10^7 (FKS) KBE/g auf.

24 h der mesophilen Vergärung ausgesetzt, konnten bei allen Keimarten Reduktionen um höchstens eine Zehnerpotenz festgestellt werden, außer in einem Prüfkörper mit *Campylobacter jejuni*, in dem eine Reduktion um drei Zehnerpotenzen stattfand.

Nach sieben Tagen konnte bei *Salmonella senftenberg* eine Reduktion um drei, nach 21 Tagen um sechs Zehnerpotenzen verzeichnet werden. Die untersuchten Proben aus der Pasteurisierung blieben negativ. Dieses Ergebnis bestätigte auch eine Kontrolluntersuchung 24 h nach der Erhitzung, in denen das Substrat bei Raumtemperatur gehalten wurde. Auch hier konnten Salmonellen nicht nachgewiesen werden.

Bei den Fäkalstreptokokken konnte auch nach sieben Tagen noch keine eindeutige Reduktion der Keimzahlen festgestellt werden, nach 21 Tagen jedoch um drei und fünf Zehnerpotenzen. In der anschließenden Pasteurisierung waren die Keime bereits nach 20 min nicht mehr nachzuweisen. Alle folgenden Untersuchungen kamen zum gleichen Ergebnis.

E. coli verhielt sich in der mesophilen Vergärung ähnlich den Streptokokken. Nach sieben Tagen war keine wesentliche Reduktion festzustellen, nach 21 Tagen jedoch waren die Keime nicht mehr nachzuweisen. Die Pasteurisierung und die Nachuntersuchung 24 Stunden später brachten keine Veränderungen.

Clostridium perfringens wurde nach 21 Tagen um drei Zehnerpotenzen reduziert. Die Keimzahlen hielten dieses Niveau von 10^3 KBE/g bei den folgenden monatlichen Untersuchungen.

Campylobacter jejuni konnte durch 21 Tage in der mesophilen Vergärung um vier Zehnerpotenzen auf 10^2 KBE/g reduziert werden. Bereits nach 20 min Pasteurisierung waren die Keime nicht mehr nachweisbar, dies änderte sich auch 24 h nach der Pasteurisierung nicht mehr.

Nach 21 Tagen konnten in den Endkontrollen noch 10^6 (*E. coli*, Clost) und 10^7 (Salm, FKS) KBE/g festgestellt werden, einzig bei *Campylobacter jejuni* kam es auch hier zu einer Reduktion um vier Zehnerpotenzen.

Zusammenfassend wird festgehalten, daß *Salmonella senftenberg* und *Campylobacter jejuni* im Prüfkörper sowohl durch die mesophile Vergärung nach spätestens 21 Tagen, als auch durch eine Pasteurisierung bei 70 °C nach maximal 20 min unter ihre Nachweisgrenzen reduziert werden können. Welche Reihenfolge eingesetzt wird, spielt dafür keine Rolle, da es nie zu einer Nachverkeimung kam, nachdem die Keime einmal nicht mehr nachweisbar waren.

Durch eine Vorpasteurisierung war *E. coli* nach 60 min nicht mehr nachweisbar, in der anschließenden mesophilen Vergärung konnten nur wenige Keime festgestellt werden. Wurde zuerst vergärt und dann pasteurisiert, waren die Keime nach maximal 21 Tagen nicht mehr nachweisbar, es kam auch 24 h nach der Pasteurisierung zu keiner Nachverkeimung.

Streptococcus faecium verhielt sich in Versuchen mit Nachpasteurisierung ähnlich wie *E. coli*, in Versuchen mit Vorpasteurisierung lag die Nachweisbarkeit nach 21 Tagen bei zwei Zehnerpotenzen.

Bei *Clostridium perfringens* kann eine Reduktion um zwei bis drei Zehnerpotenzen sowohl durch Vor- als auch durch Nachpasteurisierung erreicht werden. Die Versuchsanordnung spielt demnach keine Rolle. Die Reduktionsergebnisse bleiben unbefriedigend.

3.2.2.2 Versuche mit bovinem Parvovirus

Im mesophilen Temperaturbereich über 21 Tage wurden mit bovinem Parvovirus Versuche mit Vor- und Nachpasteurisierung durchgeführt.

Jeweils zwei parallele Keimträger wurden bei jedem Versuch untersucht.

Die Ergebnisse werden aus Tabelle 8 und 9 ersichtlich.

Tab. 8: Vorpasteurisierung und mesophile Faulung mit bovinem Parvovirus im Keimträger (Angaben in KID₅₀/ml); Beschickung: Gülle/Speisereste 3:1

Keimträger	Virus 1:10	70 °C/20 min	70 °C/30 min	70 °C/40 min	70°C/60 min	24 h	7 d	21 d
1	3,16E+05	n.d.	1,00E+04	n.d.	5,62E+02	1,00E+04	3,16E+02	5,62E+02
	3,16E+07	3,16E+06	n.d.	1,00E+08	1,78E+07	3,16E+06	1,00E+04	3,16E+02
2	3,16E+05	n.d.	1,00E+04	n.d.	5,62E+02	3,16E+02	3,16E+02	1,00E+03
	3,16E+07	3,16E+06	n.d.	1,00E+78	1,78E+07	5,62E+06	3,16E+03	3,16E+02

KID: Kulturinfektiöse Dosis; Keimträger 1 und 2 bezeichnen parallele Untersuchungen; n.d.: nicht durchgeführt

Tab. 9: Mesophile Faulung und Nachpasteurisierung, unter Berücksichtigung der Aufheizphase mit bovinem Parvovirus im Keimträger (Angaben in KID₅₀/ml); Beschickung: Gülle/Speisereste 3:1

Keimträger	Virus 1:10	24 h	7 d	14 d	21 d	40 °C	60 °C	70 °C/0 min	70 °C/20 min	70 °C/40 min	70°C/60 min
1	1,00E+08	1,00E+06	1,78E+04	1,00E+04	3,16E+04	1,78E+04	3,16E+03	3,16E+03	3,16E+03	3,16E+02	3,16E+02
	1,00E+08	1,11E+09	3,16E+04	3,16E+03	3,16E+02	5,62E+04	1,78E+04	3,16E+03	3,16E+03	3,16E+02	3,16E+02

KID: Kulturinfektiöse Dosis; Keimträger 1 und 2 bezeichnen parallele Untersuchungen)

Der Versuch wurde zweimal in zeitlichem Abstand durchgeführt. In jedem Versuch wurden immer zwei parallele Proben untersucht.

Sowohl der Pasteur, als auch die Vergärungsanlage wurden mit Gülle und Speiseresten im Verhältnis 3:1 beschickt.

In dieser Versuchsanordnung wurde auf die Berücksichtigung der Aufheizphase verzichtet.

Die 1:10 verdünnte Viruslösung, mit der die Keimträger beladen wurden, wies Titer von 10^5 und 10^7 KID₅₀/ml auf.

Im ersten Versuchsdurchgang war der Titer nach 30 min in der Pasteurisierung um eine, nach 60 min um drei Zehnerpotenzen reduziert. Diese Werte blieben auch bei Untersuchungen nach 2 h, sowie 7, 14 und 21 Tagen in der mesophilen Vergärung stabil.

Im zweiten Durchgang konnte der Virustiter nach 20 min bei 70 °C um eine Zehnerpotenz reduziert werden. Dies konnte jedoch nach 40 und 60 min nicht bestätigt werden, die Werte waren dem Ausgangstiter gleich.

Nach 24 h in der Vergärung wurde in beiden Parallelproben wieder ein Titer von 10^6 KID₅₀/ml festgestellt, nach 7 d reduzierte sich dieser um zwei bzw. drei Zehnerpotenzen und lag nach 21 d bei 10^2 KID₅₀/ml.

Die Titer der Direktelutionen lagen zwischen 10^5 und 10^7 KID/ml und entsprachen damit dem Titer des Beladungsvirus. Die parallelen Endkontrollen (während des Versuchs bei 4 °C gelagert und nach dessen Abschluß mit untersucht) wiesen Titer von sieben Zehnerpotenzen auf, lediglich einmal wurde nur ein Titer von 10^5 KID/ml festgestellt.

Die oben beschriebene Versuchsanordnung wurde umgekehrt, d.h. die Proben zuerst der Vergärung bei 33,3 °C ausgesetzt, anschließend in die Pasteurisierungseinheit verbracht und unter Berücksichtigung der Aufheizphase nach 20, 40 und 60 min untersucht.

Der Ausgangstiter der verdünnten Viruslösung lag bei 10^8 KID₅₀/ml.

Nach 24 h in der Vergärung konnte in einer Probe eine Reduktion um zwei Zehnerpotenzen festgestellt werden. Nach sieben Tagen war eine stabile Reduktion um vier Zehnerpotenzen gegenüber dem Ausgangstiter zu verzeichnen. In einem Parallelansatz reduzierte sich der Titer nach 14 und 21 d noch einmal um je eine Zehnerpotenz, im anderen Ansatz blieb er mit 10^4 KID₅₀/ml stabil.

Die Werte änderten sich durch die Erhitzung bei 40, 60 und 70 °C nicht wesentlich, wiesen jedoch nach einer Stunde bei 70 °C einen stabilen Wert von 10^2 KID₅₀/ml auf.

Die beiden parallelen Direktelutionen wiesen Titer entsprechend dem zur Beschickung der Keimträger auf und lagen bei acht Zehnerpotenzen. Die parallelen Endkontrollen (während des Versuchs bei 4 °C gelagert und nach dessen Abschluß mit untersucht) wiesen Titer mit sechs Zehnerpotenzen auf.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß durch eine Behandlung in mesophiler Vergärung mit Pasteurisierung bei 70 °C über eine Stunde bei bovinem Parvovirus im Sandwichkeimträger eine Virustiterreduktion von drei bis fünf Zehnerpotenzen erreicht werden kann. Die Reduktion scheint sich, unabhängig vom Ausgangstiter auf 10^2 KID₅₀/ml einzupendeln.

Die Reihenfolge der Behandlungsmaßnahmen spielt keine Rolle für das Reduktionsergebnis, ebenso wenig die Ausnutzung der Aufheizphase.

3.2.3 Prüfkörperversuche in der Pasteurisierung

3.2.3.1 Versuche mit Bakterien

Zunächst wurde das Verhalten der einzelnen Prüfkeime in der Pasteurisierung untersucht. Über Keimsuspensionen (s. Kap. 2.2.1.4) in Prüfkörper (s. Kap. 2.2.3.2) verbracht, wurden sie so dem Pasteurisierungsprozeß ausgesetzt, d.h. sie wurden eine Stunde bei 70 °C erhitzt.

Für jeden Keim wurden zwei Parallelansätze untersucht.

Die Ergebnisse dieser Pasteurisierungsversuche sind in Tabelle 10 dargestellt.

Die Aufheizphase wurde an dieser Stelle nicht berücksichtigt, dies folgt im Kap. 3.2.2 „Prüfkörperversuche im mesophilen Bereich“.

Tab. 10: Keimzahlreduktion durch Pasteurisierung ohne Aufheizphase eine Stunde bei 70 °C; Substrat: 75% Gülle, 25% Speisereste (Angaben in KBE/ml bzw. g)

Keim	Substrat, beimpft	KT1			KT2			Endkontrolle
		70 °C/20min	70 °C/40min	70 °C/60min	70 °C/20min	70 °C/40min	70 °C/60min	
Salm	9,30E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,40E+07
FKS	9,30E+07	1,10E+07	2,40E+05	3,60E-01	1,10E+07	9,30E+04	n.n.	2,30E+05
E. coli	9,30E+08	2,40E+08	9,30E+02	n.n.	7,50E+06	2,30E+01	n.n.	9,20E+05
Clost	9,30E+05	7,40E+04	3,60E+04	3,00E+04	7,50E+04	9,30E+04	2,30E+04	3,60E+05
Camp	9,30E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,50E+05

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; E. coli: *Escherichia coli*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp.: *Campylobacter jejuni*; KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

Untersucht wurden *Salmonella senftenberg*, *E. coli*, *Streptococcus faecium*, *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni* mit je zwei Parallelen. Die Pasteurisierungseinheit war mit einem Gemisch aus 75 % Gülle und 25 % Speiseabfällen beladen.

Die Keimsuspensionen enthielten 10^7 (Camp) bis 10^9 (Salm und *E. coli*) KBE/ml. Im unbehandelten Substrat konnten Salmonellen, *E. coli* und *Campylobacter jejuni* nicht nachgewiesen werden, Fäkalstreptokokken mit 10^4 und *Clostridium perfringens* mit 10^3 KBE/g. Die beimpften Substrate enthielten 10^5 (Clost) bis 10^8 (*E. coli*) KBE/g.

Nach einer Exposition von 20 min bei 70 °C konnten Salmonellen und *Campylobacter* nicht mehr nachgewiesen werden, dies blieb auch im weiteren Verlauf der Fall.

E. coli wies nach 20 min eine Keimzahl von 10^8 bzw. 10^6 KBE/g, nach 40 min von 10^2 bzw. 10^1 auf und war nach 60 min nicht mehr nachzuweisen.

Die Fäkalstreptokokken konnten nach 20 Minuten mit einer Keimzahl von 10^7 , nach 40 min mit 10^5 bzw. 10^4 KBE/g nachgewiesen werden und waren nach 60 min unterhalb der Nachweisgrenze.

Clostridium perfringens konnte nach 20 min um eine Zehnerpotenz reduziert werden, dieser Wert blieb über den gesamten Versuchsverlauf stabil.

Die Endkontrollen wiesen alle Werte von 10^5 bis 10^7 KBE/g auf.

Nach 20 min sind Salmonellen und *Campylobacter* bereits um sechs Zehnerpotenzen reduziert, diese Werte ändern sich im weiteren Verlauf nicht mehr.

E. coli und *Streptococcus faecium* sind nach 60 min unter ihrer Nachweisgrenze.

Clostridium perfringens läßt sich nach 20 min um eine Zehnerpotenz reduzieren, im Versuchsverlauf jedoch nicht weiter.

3.2.3.2 Versuche mit bovinem Parvovirus

Auf Keimträger aufgebracht (s. Kap. 2.2.3.3) bovinen Parvovirus wurde in einigen Versuchen allein der Pasteurisierung (70 °C/1 h) ausgesetzt, um deren Wirkung auf den Virustiter zu untersuchen.

Die Versuche wurden dabei wieder mit und ohne Aufheizphase angeordnet.

Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 11 dargestellt. Als Beschickungsmaterial für die Pasteurisierungseinheit dienten Gülle und Speisereste in einem Verhältnis von 3:1.

Tab. 11: Virustiterreduktion durch Pasteurisierung mit und ohne Aufheizphase bei 70 °C; Substrat: Gülle, Speisereste 3:1, Angaben in KID₅₀/ml

Aufheizphase	Virus 1:10	KT 1				KT 2			
		70 °C/ 0 min	70 °C/ 15 min	70 °C/ 30 min	70 °C/ 60 min	70 °C/ 0 min	70 °C/ 15 min	70 °C/ 30 min	70 °C/ 60 min
mit	1,00E+06	3,16E+02	5,62E+03	5,62E+02	3,16E+03	3,16E+03	5,62E+03	5,62E+02	3,16E+03
mit	5,62E+05	3,16E+02	3,16E+02	3,16E+02	3,16E+02	3,16E+02	3,16E+02	3,16E+02	3,16E+02
mit	1,00E+06	5,62E+02	3,16E+02	1,00E+04	5,62E+02	1,00E+04	5,62E+02	1,00E+04	5,62E+03
ohne	5,62E+05		3,16E+02	3,16E+02	5,62E+02		3,16E+03	3,16E+04	5,62E+02
ohne	1,00E+06		3,16E+03	5,62E+02	3,16E+03		3,16E+03	5,62E+02	3,16E+03

KID: Kulturinfektiöse Dosis; KT1/KT2: Keimträger 1 und 2 (bezeichnet parallele Untersuchungen)

Es wurden insgesamt drei Durchgänge mit und zwei ohne Berücksichtigung der Aufheizphase untersucht.

Der Ausgangstiter der 1:10 verdünnten Viruslösung (s. Kap. 2.2.2.3) lag zwischen 10⁵ und 10⁶ KID₅₀/ml.

In Versuchen, bei denen die Proben bereits zu Beginn der Aufheizphase eingebracht wurden, lagen die Titer mit Erreichen der 70 °C bei 10² bis 10⁴ KID₅₀/ml. Diese Werte blieben über einen Zeitraum von einer Stunde relativ stabil.

Bei Versuchen ohne Aufheizphase war nach 15 min ebenfalls eine Reduktion um zwei bis drei Zehnerpotenzen erreicht, die sich über 60 min nicht mehr wesentlich veränderte.

Die Werte der Direktelutionen und Endkontrollen (während des Versuchs bei 4 °C gelagert und nach dessen Abschluß mit untersucht) lagen allesamt in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 KID₅₀/ml.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß es bei der Pasteurisierung bei 70 °C für BPV im Keimträger unerheblich ist, ob es der Aufheizphase ausgesetzt ist oder nicht. Die Virustiterreduktion bewegt sich stets um zwei bis drei Zehnerpotenzen.

3.2.4 Prüfkörperversuche im thermophilen Temperaturbereich

Zunächst wird in Tabelle 12 und 13 eine Übersicht gegeben über die im thermophilen Temperaturbereich durchgeführten Versuche, einschließlich der begleitend gemessenen Prozeßparameter.

Bei diesen Parametern sind im Einzelnen pH-Wert, Temperatur im Inneren des Fermenters (°C (innen)), Redoxpotential (Redox) und Gasvolumen (GasVol) erfaßt.

Bei den Angaben handelt es sich, sofern Versuche über Zeiträume länger als 24 Stunden gingen, um errechnete Mittelwerte (MW), jeweils unter Angabe des Mini- und Maximalwertes (MIN/MAX) aus diesem Zeitraum.

Im thermophilen Bereich wurden Versuche mit drei verschiedenen Substratkombinationen durchgeführt, die anhand der Prozeßparameter vergleichend betrachtet werden.

Tab. 12: Übersicht über die Prüfkörperversuche im thermophilen Bereich (ca. 54 °C) mit G/SR (3:1) und G/SR/BA (2:1:1), einschließlich der begleitenden Prozessparameter Gasvolumina, pH-Wert, Redoxpotential und Faulraumtemperatur

Keinträgerversuche		Beschickung/d				GasVol (m ³ /24 h)				pH-Wert				Redoxpot (-)				°C (innen)				
Datum	Dauer	Keimart	G (l)	SR (l)	BA (l)	PaS (l)	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	
thermophile Faulung, G/SR																						
10.5.-30.5.00	21 Tage	FKS	15	5			0,304	1,868	0,826	7,25	7,73	7,55	191	560	503	52,9	54,3	53,1				
10.5.-30.5.00	21 Tage	<i>E. coli</i>	15	5			0,304	1,868	0,826	7,25	7,73	7,55	191	560	503	52,9	54,3	53,1				
10.5.-30.5.00	21 Tage	Camp	15	5			0,304	1,868	0,826	7,25	7,73	7,55	191	560	503	52,9	54,3	53,1				
11.5.-31.5.00	21 Tage	BPV	15	5			0,304	1,868	0,879	7,25	7,78	7,56	191	560	489	52,1	54,1	52,9				
11.5.-31.5.00	21 Tage	Clost	15	5			0,304	1,868	0,879	7,25	7,78	7,56	191	560	489	52,1	54,1	52,9				
11.5.-31.5.00	21 Tage	Salm	15	5			0,304	1,868	0,879	7,25	7,78	7,56	191	560	489	52,1	54,1	52,9				
14.06.00	24 h	FKS	15	5			x	x	0,379	x	x	7,51	x	x	185	x	x	54				
14.06.00	24 h	BPV	15	5			x	x	0,379	x	x	7,51	x	x	185	x	x	54				
19.06.00	24 h	Clost	10	5			x	x	0,195	x	x	7,59	x	x	236	x	x	54				
26.06.00	24 h	<i>E. coli</i>	10	5			x	x	0,418	x	x	7,68	x	x	560	x	x	55,1				
29.06.00	24 h	BPV	15	5			x	x	0,735	x	x	7,69	x	x	564	x	x	54,5				
03.07.00	24 h	Salm	15	5			x	x	1,362	x	x	7,63	x	x	561	x	x	55				
06.07.00	24 h	Clost	15	5			x	x	0,536	x	x	7,75	x	x	554	x	x	54,8				
10.07.00	24 h	Camp	15	5			x	x	0,955	x	x	7,71	x	x	567	x	x	54,9				
thermophile Faulung, G/SR/BA																						
11.08.00	24 h	Salm	10	5	5		x	x	0,904	x	x	7,87	x	x	583	x	x	55,4				
11.08.00	24 h	<i>E. coli</i>	10	5	5		x	x	0,904	x	x	7,87	x	x	583	x	x	55,4				
31.10.00	24 h	Clost	10	5	5		x	x	0,656	x	x	7,57	x	x	604	x	x	53,7				
14.11.00	24 h	FKS	10	5	5		x	x	0,346	x	x	7,61	x	x	604	x	x	53,5				

G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; PaS: pasteurisiertes Substrat; n.d.: nicht durchgeführt; X: GasVol: produzierte Gasvolumina; Redoxpot: Redoxpotential; °C (innen): Temperatur im Inneren des Fermenters; MIN: Minimalwert im Versuchszeitraum; MAX: Maximalwert im Versuchszeitraum; MW: errechneter Mittelwert der MIN/MAX im Versuchszeitraum; x: nur eine Messung am Tag, d.h. MIN und MAX entfallen; Salm: *Salmonella senftenberg*; EHEC: Enterohämorrhagische *E. coli*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*;

Tab. 13: Übersicht über die Prüfkörperversuche im thermophilen Bereich (ca. 54 °C) mit G/BA (1:1), einschließlich der begleitenden Prozeßparameter Gasvolumina, pH-Wert, Redoxpotential und Faulraumtemperatur

Keimträgerversuche		Beschickung/d			GasVol (m ³ /24 h)			pH-Wert			Redoxpot (-)			°C (innen)				
Datum	Dauer	Keimart	G (l)	SR (l)	BA (l)	PaS (l)	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW
thermophile Faulung, G/BA																		
11.12.00	24 h	Camp	10		10		x	x	1,226	x	x	7,79	x	x	611	x	x	53,4
12.02.01	24 h	BPV	10		10		x	x	1,431	x	x	8,13	x	x	606	x	x	54,7
05.03.01	24 h	Camp	10		10		x	x	0,585	x	x	8,27	x	x	630	x	x	54,8
13.12.00-2.1.01	21 Tage	Clost/VP	10		10		0,522	1,552	0,98	7,78	7,98	7,85	609	658	618	53,6	53,9	53,7
6.12.-27.12.00	21 Tage	Clost/NP	10		10		0,645	1,552	0,889	7,78	8	7,85	596	658	618	53,4	53,9	53,6
12.1.-2.2.01	21 Tage	Clost/NP	10		10		0,126	1,886	0,731	7,79	8,09	7,9	595	629	612	53,8	54,9	54,7
1.2.-14.2.01	14 Tage	Clost/NP	10		10		0,509	1,857	0,956	7,98	8,15	8,04	606	629	624	54,2	55	54,8
8.2.-14.2.01	7 Tage	Clost/NP	10		10		0,509	1,431	0,934	7,99	8,15	8,06	606	630	623	54,2	54,9	54,7
12.1.-15.1.01	60 h	Clost/NP	10		10		0,209	1,288	0,72	7,79	7,89	7,86	595	618	606	53,8	54,8	54,3
17.01.01	24 h	Clost/NP	10		10		x	x	0,608	x	x	7,89	x	x	614	x	x	54,8

G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; PaS: pasteurisiertes Substrat; n.d.: nicht durchgeführt; X: GasVol: produzierte Gasvolumina; Redoxpot: Redoxpotential; °C (innen): Temperatur im Inneren des Fermenters; MIN: Minimalwert im Versuchszeitraum; MAX: Maximalwert im Versuchszeitraum; MW: errechneter Mittelwert der MIN/MAX im Versuchszeitraum; x: nur eine Messung am Tag, d.h. MIN und MAX entfallen; Salm: *Salmonella senftenberg*; EHEC: Enterohämorrhagische *E. coli*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*;

Bei den ersten Versuchen (über 21 d) war eine Solltemperatur von 53 °C eingestellt, Schwankungen bewegten sich um 0,1 bis 1,1 °C.

Für die folgenden Versuche wurde die Solltemperatur auf 54,5 °C erhöht. Die Schwankungen bewegten sich auch hier um 0,1 bis 0,9 °C.

Für die Modellanlage gilt insgesamt, daß eingestellte Temperaturen relativ konstant beibehalten werden können. Aussagen, die sich auf die Vergärungstemperatur beziehen sind deshalb als zuverlässig zu bewerten.

Die Messungen der pH-Werte ergaben Werte zwischen pH 7,5 und 8,1. Es fällt auf, daß die Werte bei einer Substratkombination von Gülle und Bioabfällen leicht zum alkalischen Bereich hin ansteigen (häufiger Werte um pH 8,0 bis 8,1). Dies entspricht einer Differenz gegenüber anderen Substraten von etwa 0,3. Abhängigkeiten von der Temperatur (s. Tabelle 5) sind jedoch nicht zu erkennen.

Das Redoxpotential schwankt zwischen 185 und 630 mV. Höhere Werte finden sich vor allem bei der Substratkombination Gülle/Bioabfälle (606 bis 630 mV).

Die produzierten Biogasmengen liegen mit Werten von bis zu 1226 l im thermophilen Bereich höher, als im mesophilen (bis 911 l). Differenzen in der Menge zwischen den verschiedenen Substraten konnten aber nicht festgehalten werden.

3.2.4.1 Versuche mit Bakterien

Zunächst wurde die Versuchsanordnung insofern beibehalten, als daß die Prüfkörper der thermophilen Vergärung über einen Zeitraum von insgesamt 21 d ausgesetzt waren. Auch die Substratzusammensetzung Gülle/Speisereste im Verhältnis 3:1 blieb unverändert.

Die Ergebnisse werden aus Tabelle 14 ersichtlich.

Tab. 14: Keimzahlreduktion durch thermophile Faulung bei 53,1 °C über einen Zeitraum von 21 Tagen; Substrat: Gülle/Speisereste 3:1 (Angaben in KBE/ml bzw. g)

Keim	Substrat, beimpft	KT 1				KT 2				Endkontrolle
		24 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage	24 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage	
Salm	2,40E+07	n.n.	4,30E+05							
E.coli	2,40E+06	n.n.	n.n.	n	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,30E+05
FKS	2,30E+07	9,30E+04	n.n.	9,20E-01	4,30E+01	4,30E+04	n.n.	2,40E+01	2,30E+01	4,30E+07
Camp	5,00E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,60E-01	n.n.	n.n.	2,30E+04
Clost	2,40E+07	4,30E+04	3,80E+04	1,60E+04	4,30E+03	1,50E+04	4,30E+04	3,80E+04	6,40E+03	9,30E+06

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; E. coli: *Escherichia coli*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp.: *Campylobacter jejuni*; KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

Jeder der verwendeten Prüfkeime wurde dieser Behandlung einmal ausgesetzt.

Die Keimsuspensionen zur Beimpfung der Prüfkörper enthielten Keimzahlen von 10^6 (Clost) bis 10^8 (Salm, E. coli, FKS) KBE/ml.

Im unbehandelten Substrat waren Salmonellen und Campylobacter nicht nachzuweisen. E. coli und Clostridium perfringens waren mit 10^4 KBE/ml vertreten, Fäkalstreptokokken mit 10^6 KBE/ml.

Nach der Beimpfung lagen die Keimzahlen alle zwischen 10^6 (E. coli, Camp) und 10^7 (Salm, FKS, Clost) KBE/ml.

Nach 24 h thermophiler Behandlung waren *Salmonella senftenberg*, *E. coli* und *Campylobacter jejuni* nicht mehr nachweisbar. Dies wurde durch alle folgenden Untersuchungen (nach 7, 14 und 21 d) bestätigt.

Streptococcus faecium war nach 24 h um drei Zehnerpotenzen reduziert, konnte nach sieben Tagen nicht nachgewiesen werden und lag nach 14 und 21 Tagen am unteren Nachweisniveau.

Clostridium perfringens erfuhr nach 24 h ebenfalls eine Reduktion um drei Zehnerpotenzen. Dieser Wert änderte sich im weiteren Verlauf nur unwesentlich.

Die Endkontrollen, die nach 21 d untersucht wurden, wiesen Keimzahlen von 10^4 (Camp) bis 10^6 (Clost) KBE/ml auf.

Es kann festgehalten werden, daß sich in der thermophilen Vergärung die wesentliche Keimzahlreduktion nach 24 h ereignet hat. Die bis dahin erreichten Werte ändern sich im weiteren Verlauf nicht mehr. Eine Ausnahme stellt *Streptococcus faecium* dar. Bei diesem Keim

kommt es innerhalb der folgenden sieben Tage noch zu Reduktionen um bis zu vier Zehnerpotenzen, diese Werte ändern sich aber im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich.

Die folgenden Versuche berücksichtigen, in Anlehnung an die Bioabfallverordnung, die ersten 24 h der thermophilen Vergärung.

Zunächst wird die Substratzusammensetzung Gülle/Speisereste im Verhältnis 3:1 beibehalten.

Ein zweiter Versuchsdurchgang wird mit Gülle, Speiseresten und Bioabfällen im Verhältnis 2:1:1 gefahren.

Aus zeitlichen Gründen konnte die Anordnung Gülle/Bioabfälle 1:1, nur mit *Campylobacter jejuni* überprüft werden.

Sämtliche Ergebnisse aus dem thermophilen Temperaturbereich über Zeiträume bis zu 24 h sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: Keimzahlreduktion durch thermophile Faulung bei 53,5-55 °C über einen Zeitraum von 24 h (Angaben in KBE/ml bzw. g)

Thermophile Faulung	Keim	Substrat, beimpft	KT 1			KT 2			Endkontrolle
			20 h	22 h	24 h	20 h	22 h	24 h	
G/SR 3:1	Salm	1,50E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,50E+06
	<i>E.coli</i>	9,30E+07	9,20E-01	3,60E-01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,30E+07
	FKS	9,30E+07	4,30E+00	2,30E+00	1,50E+01	3,80E+00	2,30E+00	3,80E+00	9,30E+07
	Clost	9,30E+05	2,40E+05	2,40E+05	3,60E+02	2,40E+05	2,8E*03	7,40E+02	5,70E+05
	Camp	4,30E+07	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,30E+06
G/SR/BA 2:1:1	Salm	9,30E+07	2,00E+00	n.n.	n.n.	4,30E+00	n.n.	n.n.	9,30E+07
	<i>E.coli</i>	4,30E+07	2,10E+00	n.n.	n.n.	3,60E-01	n.n.	n.n.	2,30E+07
	FKS	2,40E+07	2,10E+02	7,50E+00	1,50E+01	9,30E+02	4,30E+00	2,30E+01	2,30E+07
G/BA 1:1	Camp	9,30E+05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,30E+05
	Camp	2,30E+06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+04

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; *E. coli*: *Escherichia coli*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp.: *Campylobacter jejuni*; KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten; G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

In dieser Versuchsanordnung mit einer Substratkombination Gülle/Speisereste, wurde jeder der verwendeten Prüfkeime einmal mit je zwei Parallelen getestet.

Außer für *Campylobacter jejuni* war dies auch bei der Kombination Gülle/Speisereste/Bioabfälle der Fall. Wie oben erwähnt, konnte mit der Kombination Gülle/Bioabfälle nur *Campylobacter jejuni* untersucht werden.

Die Keimzahlen der Suspensionen zur Beimpfung der Prüfkörper lagen immer im Bereich 10^5 bis 10^8 KBE/ml.

Salmonellen konnten im unbehandelten Substrat nie, Campylobacter nur einmal mit wenigen Keimen festgestellt werden. Die Keimzahlen für *E. coli* lagen bei 10^5 , für Fäkalstreptokokken bei 10^3 bzw. 10^5 und für *Clostridium perfringens* bei 10^3 KBE/ml.

Im beimpften Substrat wurden immer 10^5 bis 10^7 KBE/ml ermittelt.

In der Substratkombination Gülle/Speisereste war *Salmonella senftenberg* bereits nach 20 h nicht mehr nachweisbar, ebenso *Campylobacter jejuni*.

E. coli konnte nach 20 h um mindestens sieben Zehnerpotenzen reduziert werden und war nach 24 h nicht mehr nachweisbar.

Auch *Streptococcus faecium* konnte nach 20 h um sieben Zehnerpotenzen reduziert werden, blieb aber auch nach 24 h mit einigen wenigen Keimen /g nachweisbar.

Clostridium perfringens war nach 20 h unverändert wies nach 22 h einmal eine Reduktion um zwei Zehnerpotenzen auf und war nach 24 h um drei Zehnerpotenzen reduziert.

Wurde Bioabfall in der Fermenterbeschickung anteilig dazu genommen, konnten Salmonellen und *E. coli* nach 20 h noch mit einigen wenigen Keimen nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr nach 22 und 24 h.

Fäkalstreptokokken waren nach 20 h um fünf Zehnerpotenzen reduziert, nach 22 h um weitere zwei. Auch nach 24 h blieben sie knapp oberhalb der Nachweisgrenze zählbar.

Clostridium perfringens konnte nach 20 h um drei Zehnerpotenzen reduziert werden und behielt dieses Niveau auch nach 24 h.

Die in der Kombination Gülle/Bioabfälle eingesetzten Campylobacter erfuhren nach 20 h eine Reduktion um fünf bis sechs Zehnerpotenzen und waren in keiner der folgenden Untersuchungen (nach 22 und 24 h) nachweisbar.

Die nach 21 Tagen untersuchten Endkontrollen wiesen Keimzahlen von 10^5 bis 10^7 KBE/ml auf.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, daß der Zusatz von Bioabfällen möglicherweise einen begünstigenden Einfluß hinsichtlich der Reduktion sowohl auf *Salmonella senftenberg*, als auch auf *E. coli* hat, da diese Keime im Gegensatz zu anderen Substratzusammenstzungen nach 20 Stunden noch in geringer Konzentration nachgewiesen werden können. Auch die Keimzahlen von *Streptococcus faecium* liegen nach 20 Stunden etwas höher.

Auf *Campylobacter jejuni* hat die Substratkombination offensichtlich keinen Einfluß.

Bei *Clostridium perfringens* dagegen wirkt der Zusatz von Bioabfällen eher günstig auf die Keimzahlreduktion.

Versuche mit *Clostridium perfringens*

Da bei *Clostridium perfringens* durch thermophile Vergärung über Zeiträume bis zu 24 h keine befriedigenden Reduktionsergebnisse gewonnen werden konnten, wurden die Versuchszeiträume zunächst, wie bei mesophiler Vergärung auf 21 d ausgedehnt. Die Nachweisgrenze wurde selbst so noch nicht erreicht, deshalb wurde noch eine Stunde bei 90 °C nacherhitzt.

In der Nacherhitzung wurde die Aufheizphase bei einem Versuchsdurchgang mit berücksichtigt, bei einem weiteren wurde sie vernachlässigt.

Untersucht wurden stets zwei parallele Prüfkörper.

Aus technischen Gründen mußte der Versuch in einzelnen Etappen durchgeführt werden, d.h. für jeden Entnahmezeitpunkt wurde ein neuer Versuch angesetzt. Der Reduktionsverlauf soll jedoch als Einheit gewertet werden.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 16 und 17 dargestellt.

Tab. 16: Keimzahlreduktion von *Clostridium perfringens* durch thermophile Faulung (53,8-54,9 °C) über einen Zeitraum von 21 Tagen mit anschließender Erhitzung (90 °C/1h) unter Berücksichtigung der Aufheizphase; Substrat: Gülle:Bioabfälle, 1:1 (Angaben in KBE/g Substrat)

Substrat, beimpft	KT 1										KT 2					End- kontrolle
	90 °C/60min	24 h	60 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage	90 °C/60min	24 h	60 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage				
2,30E+06	9,20E-01	9,30E+02					3,60E-01	4,30E+03						9,30E+06		
2,30E+05	7,20E+00	4,30E+02					6,20E-01		9,30E+02					1,50E+07		
2,30E+06	7,40E+00			9,30E+02			9,30E+00			2,30E+03				1,50E+06		
2,30E+08	2,30E+00				2,10E+01		2,30E+00				7,50E+01			2,30E+05		
2,30E+05	2,30E+00						9,30E+00							9,30E+04		

KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten

Tab. 17: Keimzahlreduktion von *Clostridium perfringens* durch thermophile Faulung (53,8-54,9 °C) über einen Zeitraum von 21 Tagen mit anschließender Erhitzung (90 °C/1h) ohne Berücksichtigung der Aufheizphase; Substrat: Gülle:Bioabfälle, 1:1 (Angaben in KBE/g Substrat)

Substrat, beimpft	KT 1										KT 2					End- kontrolle
	90 °C/60min	24 h	60 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage	90 °C/60min	24 h	60 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage				
2,30E+06	7,40E-01	9,30E+02					3,50E+00	4,30E+03						9,30E+06		
2,30E+05	7,20E-01	4,30E+02					7,20E-01		9,30E+02					1,50E+07		
2,30E+06	4,30E+01			9,30E+02			7,50E+01			2,30E+03				1,50E+06		
2,30E+08	2,10E+00				2,10E+01		2,30E+00				7,50E+01			2,30E+05		
2,30E+05	9,20E-01						7,40E-01							9,30E+04		

KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten

Obwohl insgesamt je fünf Versuche dargestellt sind, sind diese als ein Versuch im Verlauf von 21 d zu betrachten.

Die Prüfkörper wurden zunächst der thermophilen Vergärung (53,8-54,9 °C) für längstens 21 d ausgesetzt. Im Fermenter befand sich zu der Zeit ein Substratgemisch aus Gülle und Bioabfällen im Verhältnis 1:1.

Anschließend wurde eine Stunde bei 90 °C erhitzt. Im ersten Durchgang unter Berücksichtigung der Aufheizphase, im zweiten Durchgang ohne deren Berücksichtigung.

Die Suspensionen zur Beimpfung der Prüfkörper wiesen stets Keimgehalte von 10^6 bis 10^7 KBE/ml auf. Die unbehandelten Substrate hatten Keimgehalte von 10^2 bis 10^3 KBE/g.

Nach der Beimpfung konnten im Substrat 10^5 bis 10^8 KBE/g festgestellt werden.

Nachdem die Proben 24 h der thermophilen, anaeroben Faulung ausgesetzt waren, konnten noch 10^2 bis 10^3 KBE/g festgestellt werden. Dieser Wert sinkt erst nach 14 d um eine weitere Zehnerpotenz. Nach 21 d ist er wieder um eine Zehnerpotenz angestiegen.

Werden die Proben in der anschließenden Erhitzung der Aufheizphase ausgesetzt, können in sieben von zehn Proben nach einer Stunde noch einige wenige Keime im Bereich 10^0 KBE/g festgestellt werden. In den übrigen Proben lag die Keimzahl an der Nachweisgrenze.

Werden die Prüfkörper erst bei Erreichen der 90 °C in die Pasteurisierungseinheit eingebracht, sind Keimzahlen im Bereich 10^0 KBE/g bei drei von zehn Proben festzustellen. In den übrigen sieben liegen die Zahlen an der Nachweisgrenze.

Die Endkontrollen wiesen nach 24 h Keimgehalte von 10^6 KBE/g auf, nach 21 d noch 10^4 KBE/g.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß es bei *Clostridium perfringens* im Prüfkörper nach 24 h in der thermophilen Vergärung zu einer Keimreduktion von drei bis sechs Zehnerpotenzen kommt. Die Werte ändern sich jedoch auch bei längerer Exposition (bis 21 d) nicht wesentlich. Erst durch eine anschließende Erhitzung bei 90 °C über eine Stunde können die Keimzahlen noch einmal um eine bis zwei Zehnerpotenzen reduziert werden.

Dabei liegen die Ergebnisse in Versuchsreihen ohne Berücksichtigung der Aufheizphase noch etwas günstiger.

Es wurde auch die umgekehrte Versuchsanordnung untersucht, in der die Prüfkörper im Substrat zuerst erhitzt wurden und der thermophilen Vergärung im Anschluß 21 d ausgesetzt wurden. Wieder wurde mit und ohne Aufheizphase gearbeitet und in jeder Versuchsanordnung zwei Parallelen untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Keimzahlreduktion von *Clostridium perfringens* durch Vorerhitzung (90 °C/1h) mit anschließender thermophiler Faulung (53,7 °C) über einen Zeitraum von 21 Tagen; Substrat: Gülle:Bioabfälle, 1:1 (Angaben in KBE/g Substrat)

		KT 1											End-
Aufheiz-	Substrat,	70 °C	80 °C	90 °C/0min	90 °C/20min	90 °C/40min	90 °C/60min	24 h	7 Tage	14 Tage	21 Tage	End-	
phase	beimpft											kontrolle	
mit	4,30E+07	9,30E+05	9,30E+04	1,50E+03	7,50E+02	7,50E+01	9,30E+01	4,30E+02	7,50E+02	9,30E+01	9,30E+01	4,30E+04	
ohne	4,30E+06					n.n.	7,40E-01	n.n.	2,10E+01	9,20E+00	n.n.	9,30E+04	
		KT 2											
mit	4,30E+07	4,30E+05	4,30E+05	7,50E+02	9,30E+02	9,30E+01	2,10E+02	2,30E+01	9,30E+01	9,30E+01	2,30E+01	4,30E+04	
ohne	4,30E+06					7,40E+00	2,30E+00	3,60E+00	9,30E+00	1,50E+01	9,20E+00	9,30E+04	

KT1/KT2: Prüfkörper 1 und 2 (bezeichnen parallele Untersuchungen); KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

Die Keimsuspensionen zur Beimpfung der Substrate wiesen Keimzahlen von 10^7 KBE/ml auf. Unbehandelte Substrate enthielten 10^3 und 10^4 KBE/g. Nach der Beimpfung liegen die Keimgehalte bei 10^6 und 10^7 KBE/g.

Wird die Aufheizphase berücksichtigt, sind bei 70 °C noch 10^5 , bei 80 °C 10^4 , bei 90 °C 10^3 KBE/g zu zählen. Nach einer Haltezeit von einer Stunde sind noch 10^1 und 10^2 KBE/g festzustellen. In der anschließenden thermophilen Vergärung liegen die Keimzahlen nach 24 h noch im gleichen Bereich und ändern sich auch nach 21 d nicht mehr.

Bleibt die Aufheizphase unberücksichtigt, liegen die Keimzahlen nach 60 min an der Nachweisgrenze. Nach 24 h in der thermophilen Vergärung sind Clostridien in einem Fall nicht mehr nachweisbar, im anderen nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Nach sieben und 14 d liegen die Keimzahlen wieder bei 10^0 und 10^1 KBE/g. In einem Fall sind die Keime nach 21 d nicht nachweisbar, im anderen knapp über der Nachweisgrenze.

Die Endkontrollen weisen nach 21 d einen Keimgehalt von 10^4 KBE/g auf.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß sich nach einer Erhitzung auf 90 °C über eine Stunde die Keimzahlen um vier bis sechs Zehnerpotenzen reduziert haben. Diese Werte ändern sich durch eine anschließende thermophile Vergärung nicht wesentlich, auch nicht über 21 d.

Wie bei der Versuchsanordnung „thermophile Vergärung mit Nacherhitzung“ kann auch hier festgestellt werden, daß die Keimzahlreduktionen bei einer Erhitzung ohne Aufheizphase etwas günstiger liegen.

3.2.4.2 Versuche mit bovinem Parvovirus

Bovines Parvovirus wurde auf Keimträger aufgebracht und dem thermophilen Vergärungsprozeß über 24 h ausgesetzt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsanordnung sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tab. 19: Virustiterreduktion durch thermophile Vergärung bei 53-54,5 °C; Substrat: Gülle, Speisereste 3:1 bzw. Gülle, Bioabfälle 1:1; Angaben in KID₅₀/ml

Substrat	Virus 1:10	KT 1			KT 2			KT 3		
		20 h	22 h	24 h	20 h	22 h	24 h	20 h	22 h	24 h
75%G+ 25%SR	5,62E+06	3,16E+05	5,62E+03	5,62E+03	3,16E+05	1,00E+05	3,16E+04	n.d.	n.d.	n.d.
75%G+ 25%SR	1,78E+08	3,16E+05	1,78E+04	3,16E+03	1,00E+06	5,62E+02	5,62E+03	n.d.	n.d.	n.d.
50%G+ 50%BA	3,16E+07	1,78E+02	3,16E+04	3,16E+02	3,16E+04	3,16E+04	1,00E+03	1,00E+06	5,62E+03	n.n.

KID: Kulturinfektiöse Dosis; KT1-KT3: Keimträger 1 bis 3 (bezeichnet parallele Untersuchungen); G: Rindergülle; SR: Speisereste; BA: Bioabfälle; n.n.: nicht nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Der Versuch wurde zweimal mit einer Substratkombination von 75 % Gülle, 25 % Speisereste und einmal bei einer Kombination von 50 % Gülle, 50 % Bioabfälle durchgeführt.

Die 1:10 verdünnte Viruslösung, welche auf die Keimträger aufgebracht wurde, wies einen Virustiter von 10⁶ bis 10⁸ KID₅₀/ml auf.

Nach 20 h in der thermophilen Vergärung wiesen alle Proben einen Titer von 10⁴ bis 10⁶ KID₅₀/ml auf, lediglich eine Ausnahme zeigte einen Titer von 10² KID₅₀/ml.

Zwei Stunden später sanken die Titer fast einheitlich um eine weitere Zehnerpotenz, eine Probe wies jedoch noch einen Titer von 10⁵ KID₅₀/ml auf.

Dieses Bild änderte sich auch weitere zwei Stunden später kaum. Nur im Versuch mit der Substratkombination Gülle/Bioabfälle konnte BPV nach 24 h nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Direktelutionen hatten Titer von 10⁵ bis 10⁸ KID₅₀/ml. Die Endkontrollen (während des Versuchs bei 4 °C gelagert und nach dessen Abschluß mit untersucht) 10⁶ und 10⁷ KID₅₀/ml.

3.2.4.3 D-Werte der verwendeten Testorganismen in der Modellanlage

Zunächst wurden die D-Werte im thermophilen Temperaturbereich unter Verwendung von Rindergülle (G) und Speiseresten (SR) als Beschickungsmaterial im Verhältnis 3:1 ermittelt (s.auch Kap. 3.1).

Aus Abbildung 11 geht für *E. coli* ein bei 55 °C in der thermophilen Vergärung ein D-Wert von 1,38 h hervor.

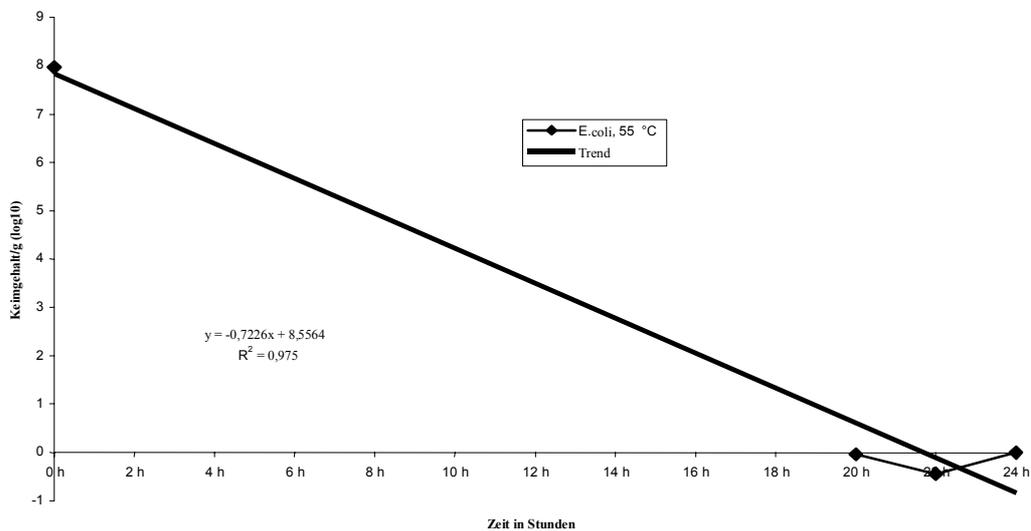


Abb. 11: Regressionsgerade für *E. coli* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR)

Abbildung 12 zeigt den D-Wert für *Streptococcus faecium* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung mit 1,54 h an.

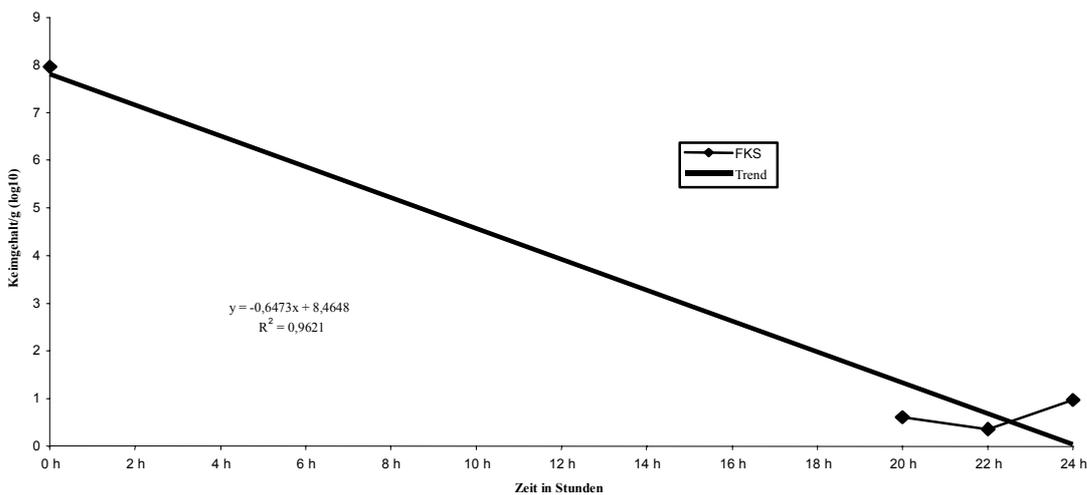


Abb. 12: Regressionsgerade für *Streptococcus faecium* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR)

In Abbildung 13 wird der D-Wert für *Clostridium perfringens* mit 5,95 h bei 54 °C in der thermophilen Vergärung ersichtlich.

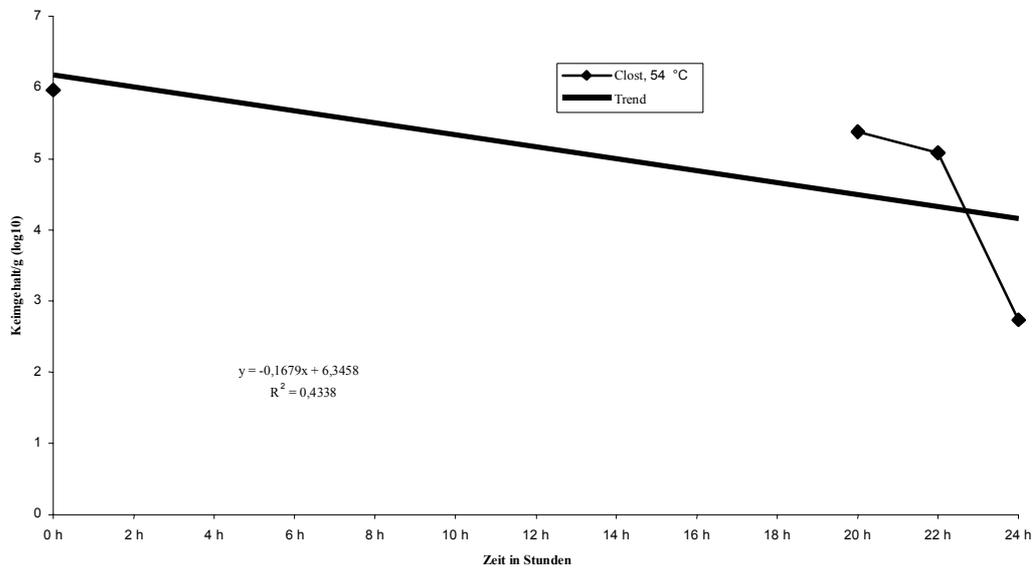


Abb. 13: Regressionsgerade für *Clostridium perfringens* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR)

Ein D-Wert von 2,75 h konnte für das bovine Parvovirus in der Vergärung bei 55 °C ermittelt werden, dieser Wert geht aus Abbildung 14 hervor.

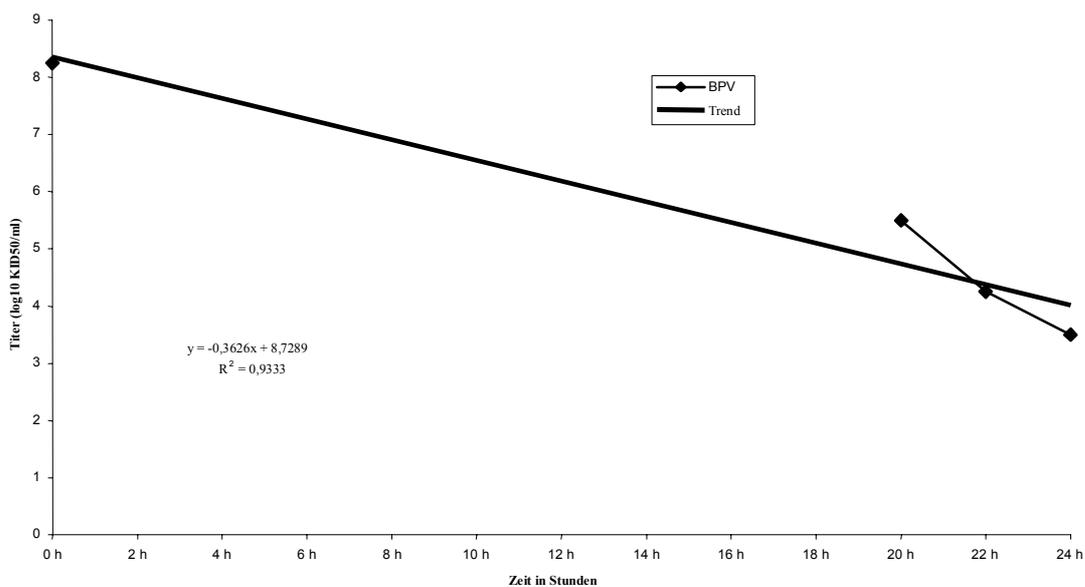


Abb. 14: Regressionsgerade für das *bovine Parvovirus* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR)

Die D-Werte im thermophilen Temperaturbereich wurden auch, zum besseren Vergleich, ermittelt, wenn als Beschickungsmaterial ein Gemisch aus Rindergülle (G), Speiseresten (SR) und Bioabfällen (BA) im Verhältnis 2:1:1 diente.

In Abbildung 15 wird für *E. coli* ein D-Wert von 1,48 h ersichtlich.

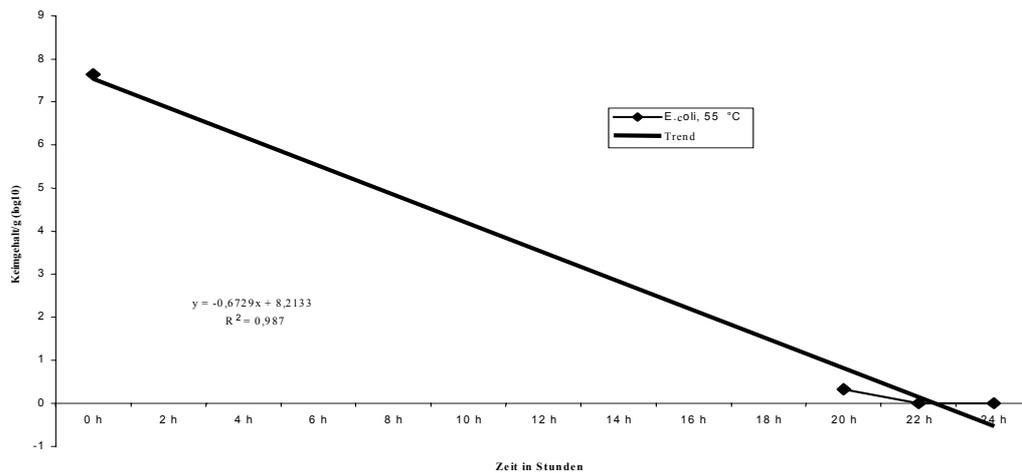


Abb. 15: Regressionsgerade für *E. coli* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR/BA)

Aus Abbildung 16 geht für *Streptococcus faecium* ein D-Wert von 1,88 h hervor.

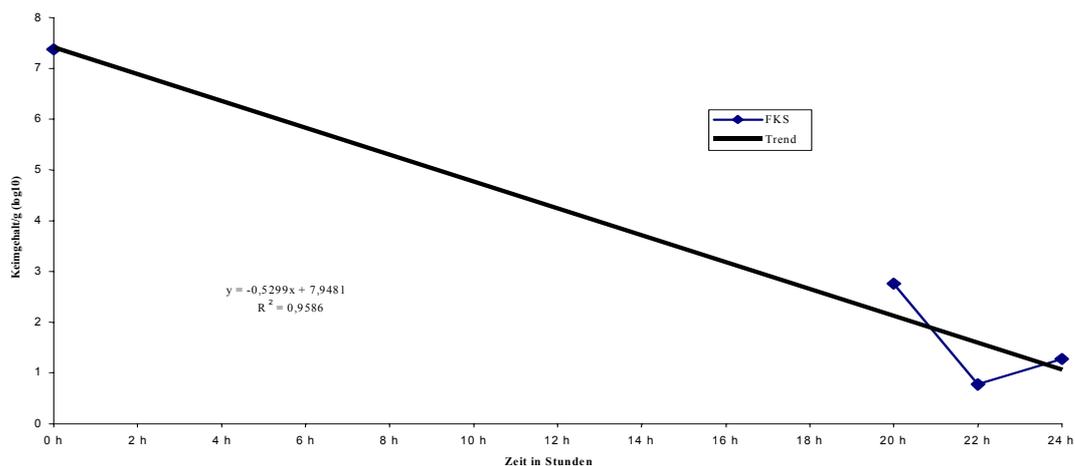


Abb. 16: Regressionsgerade für *Streptococcus faecium* bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR/BA)

Für *Clostridium perfringens* konnte ein D-Wert von 4,35 h ermittelt werden. Dieser wird in Abbildung 17 dargestellt.

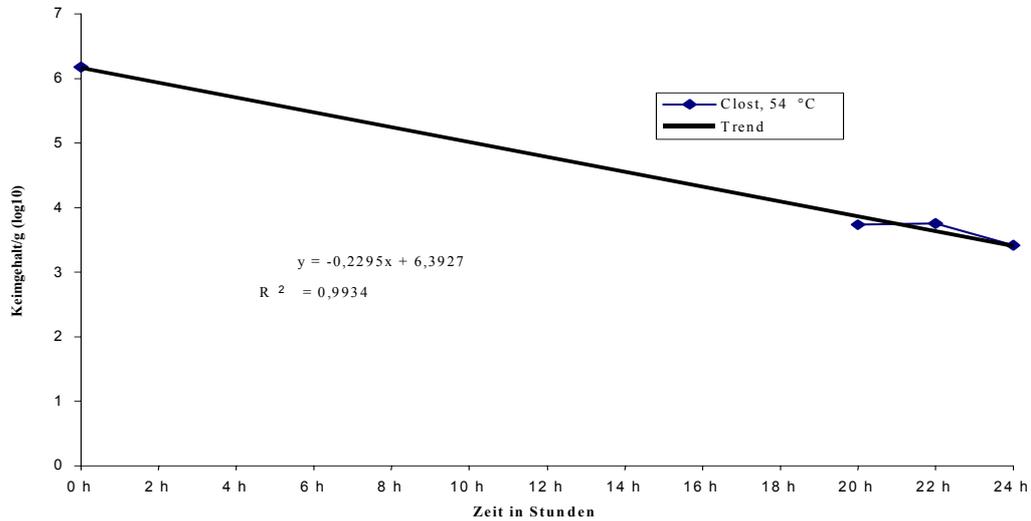


Abb. 17: Regressionsgerade für *Clostridium perfringens* bei 54 °C in der thermophilen Vergärung (G/SR/BA)

Das bovine Parvovirus weist einen D-Wert von 3,25 h auf. Dargestellt ist dieser Wert in Abbildung 18.

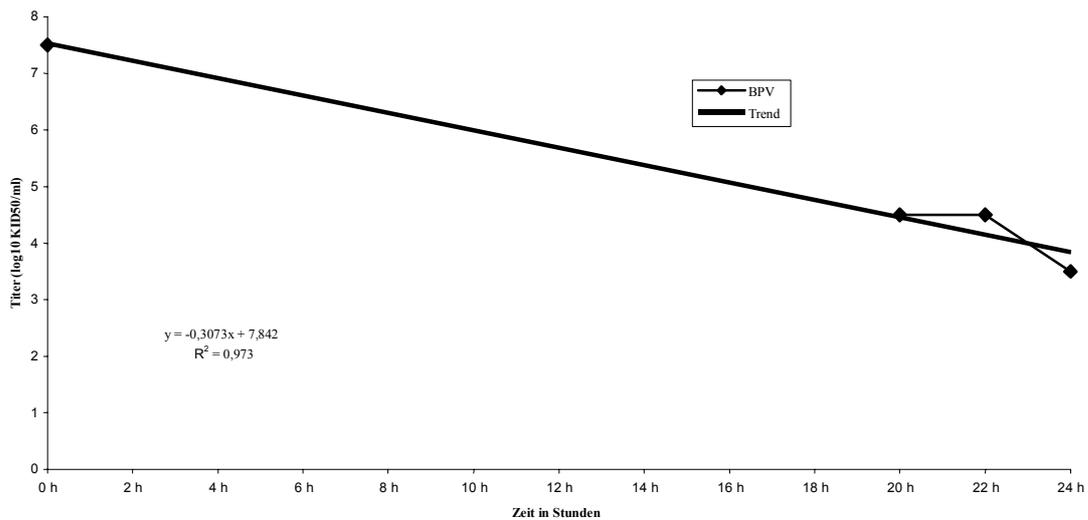


Abb. 18: Regressionsgerade für das bovine Parvovirus bei 55 °C in der thermophilen Vergärung (G/BA)

Tabelle 20 zeigt noch einmal die in der thermophilen Vergärung ermittelten D-Werte in der Übersicht. Die Substratkombinationen G/SR und G/SR/BA werden gegenüber gestellt.

Tab. 20: Übersicht über die in der thermophilen Vergärung (55 °C) ermittelten D-Werte

D-Werte (in Stunden)		Substratzusammensetzung		
		G/SR	G/SR/BA	G/BA
Bakterien	<i>E. coli</i>	1,38	1,48	
	<i>Streptococcus faecium</i>	1,54	1,88	
	<i>Clostridium perfringens</i>	5,95	4,35	
Virus	bovines Parvovirus	2,75		3,25

In der thermophilen Vergärung bei 55 °C und einer Substratkombination mit Gülle und Speiseresten im Verhältnis 3:1 konnte für *E. coli* ein D-Wert von 1,3 h , für *Streptococcus faecium* ein Wert von 1,54, für *Clostridium perfringens* von 5,95 und für das bovine Parvovirus von 2,75 h ermittelt werden.

Bei einer Substratkombination mit Gülle, Speiseresten und/oder Bioabfällen konnte für *E. coli* ein D-Wert von 1,4 h , für *Streptococcus faecium* ein Wert von 1,54, für *Clostridium perfringens* von 4,35 und für das bovine Parvovirus von 3,25 h ermittelt werden.

Für *Salmonella senftenberg*, sowie für *Campylobacter jejuni* konnte aufgrund der eindeutigen Inaktivierungsergebnisse in der thermophilen Vergärung ein D-Wert nicht ermittelt werden. Die Ergebnisse aus der Modellanlage lassen jedoch den Schluß zu, daß die D-Werte sich unter den im Wasserbad ermittelten bewegen (für *Salmonella senftenberg* unter 0,42 bei 55 °C und für *Campylobacter jejuni* unter 0,043 min bei 70 °C).

3.2.5 Versuche mit Keimsuspensionen im mesophilen Temperaturbereich

Im mesophilen Bereich wurden zwei Versuche mit Bakteriensuspension (Salmonellen und *E. coli*) unternommen, Tabelle 21 zeigt die Werte der begleitenden Prozeßparameter.

Tab. 21 : Suspensionsversuch im mesophilen Bereich (ca. 33 °C), einschließlich der begleitenden Prozeßparameter Gasvolumen, pH-Wert, Redoxpotential und Faulraumtemperatur

Suspensionsversuch			Beschickung	GasVol (m ³ /24h)			pH-Wert			Redoxpot (-)			°C (innen)		
Datum	Dauer	Keim	PaS (l)	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW	MIN	MAX	MW
17.3.-3.4.00	18 Tg	Salm	15	0,409	1,007	0,653	7,35	7,51	7,41	305	520	495	32,8	33,4	33,2
17.3.-3.4.00	18Tg	<i>E. coli</i>	15	0,409	1,007	0,653	7,35	7,51	7,41	305	520	495	32,8	33,4	33,2

PaS: pasteurisiertes Substrat; GasVol: produzierte Gasvolumina; Redoxpot: Redoxpotential; °C (innen): Temperatur im Inneren des Fermenters; MIN: Minimalwert im Versuchszeitraum; MAX: Maximalwert im Versuchszeitraum; MW: errechneter Mittelwert aus MIN/MAX im Versuchszeitraum; Salm: *Salmonella senftenberg*; *E. coli*: *Escherichia coli*

Die Temperaturen schwankten zwischen 0,2 bis 0,4 °C um den Sollwert von 33 °C.

Der pH-Wert lag zwischen 7,33 und 7,51.

Redoxpotentiale wurden zwischen 305 und 595 mV gemessen.

Die produzierten Gasvolumina waren zwischen 0,409 und 1,007 m³ notiert.

Die Werte fügten sich insgesamt in die unter Punkt 1.1.2.2. beschriebenen.

3.2.6 Versuche mit Keimsuspensionen in der Pasteurisierung

Der „Pasteur“ stellt eine geschlossene Einheit dar, deren Inhalt (ca. 50 l) leicht mit Keimsuspensionen versetzt werden kann, ohne die Umgebung zu kontaminieren. Außerdem ist er leicht zu desinfizieren.

Das Pasteursubstrat (75 % Gülle, 25 % Speisereste) wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit Keimsuspension (s. Kap. 2.2.1.4) versetzt und durchmischt.

Proben wurden während des Betriebs mit einer gereinigten Schöpfkelle entnommen.

In dieser Versuchsanordnung wurden zwei Varianten untersucht:

- die Aufheizphase wurde nicht berücksichtigt, d.h. die Keimlösungen wurden erst bei Erreichen der gewünschten Temperatur (70 bzw. 90 °C) zum Substrat gegeben, Proben wurden nach 20, 40 und 60 min gezogen
- die Aufheizphase wurde mit berücksichtigt, d.h. die Keimlösungen wurden zu Beginn der Aufheizphase zum Substrat gegeben, Proben wurden dann bei Erreichen der Temperaturen 50, 60 und 70 °C gezogen.

3.2.6.1 Pasteurisierung unter Berücksichtigung der Aufheizphase

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse dargestellt, die ohne Berücksichtigung der Aufheizphase gewonnen wurden.

Tab. 22: Verlauf der Keimzahlreduktion durch Pasteurisierung (70 °C/1 h), ohne Aufheizphase; Substrat: 75 % Gülle, 25 % Speisereste; Angaben in KBE/g Substrat

Keim	Substrat, beimpft	70 °C/ 20min	70 °C/ 40min	70 °C/ 60min
FKS	2,40E+07	n.d.	n.d.	4,30E+02
FKS	9,30E+06	n.d.	n.d.	2,30E+01
FKS	9,30E+06	n.d.	n.d.	n.n.
Salm	6,00E+00	n.n.	n.n.	n.n.
<i>E.coli</i>	4,50E+00	n.n.	n.n.	n.n.
FKS	4,30E+01	4,30E+01	9,30E+00	9,30E+00
Salm	7,80E+00	n.n.	n.n.	n.n.
<i>E.coli</i>	9,30E+00	n.n.	n.n.	n.n.
FKS	4,30E+01	2,40E+01	2,90E+00	2,40E+01

FKS: *Streptococcus faecium*; Salm: *Salmonella senftenberg*; *E. coli*: *Escherichia coli*; KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Diese Versuchsanordnung wurde insgesamt viermal mit Fäkalstreptokokken und je zweimal mit Salmonellen und *E. coli* durchgeführt.

Die für den Versuch hergestellten Keimlösungen wiesen durchgehend eine Keimzahl von 10^7 bis 10^8 KBE/ml auf.

Salmonellen waren im Substrat nie nachzuweisen. *E. coli* in einem Fall gar nicht, einmal in einer Anzahl von 10^3 KBE/g. FKS konnten immer mit drei bis vier Zehnerpotenzen nachgewiesen werden.

Bereits unmittelbar nach der Beimpfung und Durchmischung des Substrats konnten Salmonellen, *E. coli* und in einem Fall auch FKS nur noch knapp oberhalb ihrer Nachweisgrenze nachgewiesen werden. Dreimal lagen FKS jedoch auch in einem Bereich von 10^6 bis 10^7 KBE/g.

Im Versuchsverlauf konnten Salmonellen und *E. coli* in keinem Fall weder nach 20, noch nach 40 oder 60 min nachgewiesen werden. Fäkalstreptokokken konnten zwar im Versuchsverlauf um bis zu fünf Zehnerpotenzen reduziert werden, blieben aber in allen Versuchen auch nach einer Stunde bei 70 °C mit wenigen Keimen nachweisbar.

3.2.6.2 Pasteurisierung ohne Berücksichtigung der Aufheizphase

In Tabelle 23 sind die Ergebnisse dargestellt, die ohne Berücksichtigung der Aufheizphase gewonnen wurden.

Um eine eventuelle Nachverkeimung des pasteurisierten Substrats nachzuweisen wurden einige Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt und 24 h sowie 7 d nach ihrer Pasteurisierung erneut untersucht.

Tab. 23: Verlauf der Keimzahlreduktion durch Pasteurisierung (70 °C/1 h), mit Aufheizphase; Substrat: Gülle, Speisereste 3:1; Angaben in KBE/g Substrat

Keim	Substrat, beimpft	50 °C	60 °C	70 °C/ 0 min	70 °C/ 20 min	70 °C/ 40 min	70 °C/ 60 min	24 h	7 d
FKS	1,50E+07	n.d.	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.d.	n.d.
FKS	9,30E+06	n.d.	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.d.	n.d.
Salm	9,30E+06	2,40E+04	3,60E+01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.
E.coli	9,30E+06	2,40E+04	3,60E+01	n.n.	n.d.	n.d.	n.d.	n.n.	n.d.
FKS	4,30E+06	4,30E+05	9,30E+04	n.n.	n.d.	n.d.	n.d.	n.n.	n.d.
Salm	2,10E+06	2,30E+06	2,30E+05	2,30E+03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
E.coli	1,00E+07	9,30E+03	2,40E+04	2,30E+03	9,20E+00	2,40E+02	n.n.	n.n.	n.n.
FKS	3,60E+05	2,40E+06	2,40E+05	2,40E+03	7,40E+00	7,50E+01	n.n.	2,40E+04	2,40E+06
Clost	9,30E+05	2,30E+06	4,30E+04	4,30E+04	1,50E+04	2,30E+03	2,30E+02	n.d.	n.d.

FKS: *Streptococcus faecium*; Salm: *Salmonella senftenberg*; E. coli: *Escherichia coli*; Clost: *Clostridium perfringens*; KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Insgesamt wurde in dieser Versuchsanordnung viermal FKS, je zweimal Salmonellen und *E. coli* sowie einmal *Clostridium perfringens* eingesetzt.

Die Keimsuspensionen wiesen alle Keimgehalte von 10^7 bis 10^8 KBE/ml auf.

Im Substrat waren Salmonellen nie nachweisbar, *E. coli* einmal mit 10^1 , einmal mit 10^4 KBE/g, Fäkalstreptokokken zwischen 10^3 und 10^5 und Clostridien mit 10^3 KBE/g.

Nach Beimpfung und Durchmischung des Substrats wurden stets Keimgehalte von 10^5 bis 10^7 KBE/g gezählt.

Salmonellen konnten bei 50 °C mit einem Gehalt von 10^4 bzw. 10^6 , bei 60 °C mit 10^1 bzw. 10^5 KBE/g nachgewiesen werden. Bei Erreichen der geforderten 70 °C waren noch einmal 10^3 KBE/g vorhanden. Nach 20, 40 und 60 min Haltezeit bei 70 °C konnten Salmonellen jedoch nicht mehr festgestellt werden. In einem Fall wurde 24 h und 7 d nach der Pasteurisierung noch einmal untersucht, es konnten jedoch keine Salmonellen gefunden werden.

E. coli war bei 50 °C noch mit 10^4 bzw. 10^3 , bei 60 °C mit 10^1 bzw. 10^4 KBE/g zu zählen. In einem Versuchsdurchgang konnte der Keim mit Erreichen der 70 °C nicht mehr nachgewiesen werden, die Nachuntersuchung 24 h nach der Pasteurisierung bestätigte das Ergebnis. Im zweiten Durchgang dagegen waren bei Erreichen der 70 °C 10^3 KBE/g, nach 20 min wenige Keime, nach 40 min 10^2 KBE/g zu verzeichnen. Nach 60 min konnten keine Keime mehr nachgewiesen werden, dies wurde in Untersuchungen 24 h und 7 d nach der Pasteurisierung bestätigt.

Fäkalstreptokokken konnten sowohl bei 50, als auch bei 60 °C noch mit Keimgehalten von 10^4 bis 10^6 nachgewiesen werden. In drei Fällen konnten die Keime mit Erreichen der 70 °C und bei allen folgenden Untersuchungen nicht mehr nachgewiesen werden. In einem Versuchsdurchgang waren FKS bei 70 °C noch mit 10^3 KBE/g zu finden und erst nach 60 min nicht mehr nachweisbar. Es kam hier jedoch bereits über Nacht zu einer Nachverkeimung um vier, nach 7 d um sechs Zehnerpotenzen. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Rekontamination bei der Probennahme, da bei einer Parallelprobe nach 24 h Lagerungszeit keine Keime nachzuweisen waren und auch Lagerungsversuche aus Praxisproben keine Hinweise auf die Vermehrung von Fäkalstreptokokken in zuvor pasteurisierten Proben ergeben.

Für *Clostridium perfringens* kann bei 50 °C ein leichter Anstieg der Keimzahl (eine Zehnerpotenz) verzeichnet werden. Bei 60, 70 und bei 70 °C/20 min bleibt der Keimgehalt stabil bei 10^4 KBE/g. Nach 40 und 60 min kommt es zu einer Reduktion um jeweils eine Zehnerpotenz. Untersuchungen 24 h und 7 d nach der Pasteurisierung wurden nicht vorgenommen.

3.2.6.3 *Clostridium perfringens* in der Pasteurisierung

Da mit *Clostridium perfringens* in der Pasteurisierung bei 70 °C und einer Haltezeit von einer Stunde keine befriedigenden Reduktionsraten erzielt werden konnten, wurden mit diesem Keim separat Erhitzungsversuche bei 90 °C und einer Haltezeit von einer Stunde im Pasteur durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 24 aufgelistet.

Als Beschickungsmaterial diente ein Gemisch aus 50 % Gülle und 50 % Bioabfall.

Auch hier wurde je einmal mit und ohne Berücksichtigung der Aufheizphase gearbeitet.

Die Angaben beziehen sich auf KBE/g Substrat.

Tab 24.: Verlauf der Keimzahlreduktion bei *Clostridium perfringens* durch Erhitzung auf 90 °C/1 h, mit und ohne Aufheizphase; Substrat: Gülle, Bioabfälle 1:1
(Angaben in KBE/g Substrat)

Aufheiz- phase	Substrat, beimpft	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C/ 0 min	90 °C/60 min	24 h
ohne	4,30E+03				4,30E+03	9,30E+00	9,20E-01
mit	4,30E+07	9,30E+03	9,30E+03	4,30E+02	4,30E+01	4,30E+01	9,30E+00

KBE: Koloniebildende Einheiten

Der Versuch wurde einmal ohne, einmal mit Berücksichtigung der Aufheizphase durchgeführt.

Die Impflösungen hatten Keimgehalte von 10^7 bzw. 10^8 KBE/ml, das unbehandelte Substrat 10^0 und 10^3 KBE/g, nach der Beimpfung 10^3 und 10^7 KBE/g.

Ohne Berücksichtigung der Aufheizphase entspricht der Keimgehalt bei 90 °C/0 min dem des beimpften Substrats. Nach einer 60-minütlichen Haltezeit mit 90 °C waren die Keime nur noch knapp über der Nachweisgrenze zu zählen. 24 h nach der Erhitzung (Proben wurden verschlossen bei Raumtemperatur gelagert) erhöhte sich dieser Wert um eine Zehnerpotenz und lag dann bei 10^1 KBE/g.

Wurde die Aufheizphase mit betrachtet, reduzierte sich der Keimgehalt von 10^7 bei 60 °C auf 10^3 KBE/g, dieser Wert änderte sich auch bei Erreichen der 70 °C nicht. Bei 80 und 90 °C konnten dann wieder Reduktionen jeweils um eine Zehnerpotenz festgestellt werden. Nach 60 min bei 90 °C war dieser Wert immer noch stabil. 24 h nach der Erhitzung (Proben wurden verschlossen bei Raumtemperatur gelagert) allerdings, wurde erneut eine Zehnerpotenz weniger gezählt, der Wert lag nur noch knapp über der Nachweisgrenze.

Es kann festgehalten werden, daß mit einer Steigerung um 20 °C in der Pasteurisierung bei *Clostridium perfringens* eine Keimzahlreduktion von zwei bis drei Zehnerpotenzen erreicht werden kann, der Keimgehalt nähert sich damit der Nachweisgrenze.

Eine vollständige Eliminierung scheint aber auch mit einer Erhitzung auf 90 °C und einer Haltezeit von einer Stunde nicht möglich.

3.3 Praxisanlagen

In den großtechnischen Anlagen in Hessen und Bayern wurden, begleitend zu den Keimträgerversuchen, auch jeweils die In- und Outputmaterialien untersucht, um den Forderungen einer direkten Prozeßprüfung nachzukommen.

3.3.1 Kofermentationsanlage „H“ in Hessen

Es handelt sich um eine thermophil betriebene Großanlage, in der innerhalb der Untersuchungszeiträume Temperaturschwankungen von 55,3 bis 62 °C gemessen wurden.

3.3.1.1 Bakteriologischer Status im Substrat

Zur Übersicht über den Bakteriengehalt des Materials wurde die Gesamtbakterienzahl (GKZ) erfaßt. Des weiteren wurde auf das Vorkommen nativer Salmonellen (in 50 g Substrat) und *E. coli* sowie *Streptococcus faecium* untersucht. Die Angaben beziehen sich auf KBE/g Substrat (außer bei Salmonellen: 50 g Substrat).

Aus technischen Gründen kam es bei der Erhebung des bakteriologischen Status im Substrat zu keinen Untersuchungen auf *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni*.

Tabelle 25 zeigt den Bakterienstatus des Outputmaterials, sowie einen Keimzahlenvergleich zwischen In- und Output an der Kofermentationsanlage „H“ in Hessen.

Bei mehreren Input Proben auf einen Output, wurden die Einzelkomponenten der Materialien untersucht.

Tab. 25: Übersicht über den Bakterienstatus im Outputmaterial, sowie Keimzahlenvergleich Input/Output in der thermophilen Kofermentationsanlage "H" (Angaben in KBE/g bzw. 50 g Substrat)

Datum	Stufe	Substrat	pH-Wert	GKZ/g	Salm/50g	<i>E. coli</i> /g	FKS/g
thermophile Faulung, SR/BA							
Mai 1999	IN	SR/BA	5,5	8,30E+07	n.n.	4,30E+04	2,30E+06
	OUT	SR/BA	8,11	1,10E+08	n.n.	n.n.	3,60E+00
	IN	SR	4,65	1,30E+05	n.n.	n.n.	1,50E+04
	OUT	SR/BA	8,29	7,10E+07	n.n.	n.n.	n.n.
	OUT	SR/BA	8,1	6,80E+07	n.n.	n.n.	n.n.
	IN	BA	6,43	9,00E+07	n.n.	2,30E+07	2,10E+07
	OUT	SR/BA	8,03	2,40E+06	n.n.	n.n.	3,60E+01
Mai 2000	IN	BA	5,34	4,40E+08	n.n.	2,30E+02	2,30E+05
	IN	SR	4,2	5,50E+07	n.n.	9,30E+04	4,30E+05
	IN	BA	5,21	9,60E+08	n.n.	2,30E+04	9,30E+03
	OUT	SR/BA	8,08	3,90E+07	n.n.	4,30E+01	1,50E+02
	IN	SR	4,89	5,30E+07	n.n.	4,30E+02	2,30E+02
	IN	BA	4,72	1,30E+08	n.n.	4,30E+03	7,50E+04
	OUT	SR/BA	8,55	4,50E+07	n.n.	n.n.	n.n.
	IN	SR	4,68	4,50E+08	n.n.	2,30E+03	2,30E+06
	IN	BA	4,5	2,70E+09	n.n.	9,30E+05	2,30E+06
OUT	SR/BA	8,48	4,30E+07	n.n.	n.n.	n.n.	

GKZ: Gesamtbakterienzahl; Salm: *Salmonella senftenberg*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*; KBE: Koloniebildende Einheiten; G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

1999 kamen insgesamt 3 In- und 4 Output Proben zur Untersuchung, 2000 dann 7 In- und 3 Output Proben.

Als begleitender Prozeßparameter wurde in den untersuchten Substraten jeweils der pH-Wert gemessen. Dabei zeigt sich, daß im Inputmaterial stets ein leicht saures Milieu, etwa um pH 5 herrscht, im Outputmaterial dagegen verschiebt sich der pH leicht in den alkalischen Bereich, mit einem Wert um pH 8.

Die Gesamtbakterienzahl liegt in allen untersuchten Substraten bei Werten von 10^6 bis 10^9 . Ein Unterschied in der Zahl zwischen In- und Outputmaterial ist nicht zu erkennen.

In keiner der untersuchten Proben waren native Salmonellen nachweisbar.

Im Mai 1999 war *E. coli* in keiner der betrachteten Output Proben festzustellen. Im darauffolgenden Jahr nur in einer von drei Proben mit einem Wert von 10^1 KBE/g. Gegenüber dem Input kam es in beiden Probendurchgängen zu Reduktionen von zwei bis fünf Zehnerpotenzen, d.h., bei *E. coli* wurde die Nachweisgrenze erreicht. 1999 waren zwei Fälle zu verzeichnen in denen *E. coli* auch im Input nicht nachzuweisen war.

Streptococcus faecium lag im Output 1999 zweimal unterhalb der Nachweisgrenze, zweimal knapp darüber mit Werten von 10^0 bis 10^1 Keimen /g Substrat. 2000 lagen die Werte ebenfalls zweimal unter der Nachweisgrenze, einmal mit 10^2 KBE/g etwas darüber.

Gegenüber dem Input wurde eine Reduktion der Keimzahlen von zwei bis sechs Zehnerpotenzen verzeichnet.

3.3.1.2 Prüfkörperversuche mit Bakterien

Im Rahmen einer direkten Prozeßprüfung wurden an der großtechnischen Anlage „H“ im Mai 1999 Versuche durchgeführt, bei denen verschiedene Bakterien in Prüfkörpern in den Prozeß eingebracht und nach 24 Stunden, sowie nach 7 und 14 Tagen untersucht wurden.

Diese Untersuchungen wurden ein Jahr später im Mai 2000 wiederholt.

Der zunächst geplante vierte Probenentnahmetermin wurde aufgrund der eindeutigen Ergebnisse nach 14 Tagen fallengelassen.

Aus technischen Gründen war es bei beiden Versuchsdurchgängen lediglich möglich, Salmonellen, Fäkalstreptokokken und *Clostridium perfringens* zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 26 festgehalten.

Tab. 26: Keimzahlreduktion verschiedener Keime im Prüfkörper in der thermophil betriebenen Anlage „H“ über einen Zeitraum von 14 Tagen (Angaben in KBE/g bzw. 50 g Substrat)

Datum	Keim	Temp (°C)	Substrat, beimpft	KT 1			KT 2			KT 3			Endkontrolle
				24 h	7 Tage	14 Tage	24 h	7 Tage	14 Tage	24 h	7 Tage	14 Tage	
Mai 1999	Salm	62	9,30E+07	n.n.	2,30E+08								
	Salm	59,7	9,30E+07	n.n.	2,30E+08								
	Salm	57,7	9,30E+07	n.n.	2,30E+08								
	Salm	56,5	3,50E+08	pos	n.n.	9,30E+07							
	FKS	56,5	9,30E+07	pos	pos	n.n.	n.n.	n.n.	pos	pos	n.n.	pos	1,10E+08
	Clost	56,5	2,40E+08	4,30E+03	4,30E+04	7,50E+03	1,50E+03	9,30E+04	9,30E+04	7,50E+03	4,30E+03	2,10E+04	2,10E+07
	Salm	55,7	3,50E+08	pos	n.n.	9,30E+07							
	FKS	55,7	9,30E+07	pos	pos	n.n.	pos	pos	pos	n.n.	n.n.	pos	1,10E+08
Mai 2000	Clost	55,7	2,40E+08	4,30E+03	7,50E+04	4,60E+04	9,30E+03	4,30E+04	9,30E+03	4,30E+03	2,40E+05	2,10E+07	2,10E+07
	Salm	55,3	3,50E+08		n.n.	9,30E+07							
	FKS	55,3	9,30E+07		pos	n.n.		pos	n.n.		pos	pos	1,10E+08
	Clost	55,3	2,40E+08	4,30E+04	4,30E+04	9,30E+04	9,30E+04	9,30E+04	1,50E+04	2,40E+05	2,40E+05	2,10E+07	2,10E+07

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Temp (°C): Betriebstemperatur im Fermenter; KBE: Koloniebildende Einheiten; KT1-KT3: Prüfkörper 1-3 (bezeichnet parallele Untersuchungen); n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; pos: qualitativ nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

1999 wurden vier Versuche mit Salmonellen und je einer mit Fäkalstreptokokken und *Clostridium perfringens* durchgeführt. 2000 waren es dann je zwei Versuche mit Salmonellen, Fäkalstreptokokken und *Clostridium perfringens*.

Die Anlage wurde im Versuchszeitraum im oberen thermophilen Temperaturbereich gefahren, es wurden Temperaturen von 55,3 bis 62 °C gemessen.

Die Keimsuspensionen zur Beimpfung der Prüfkörper wiesen durchweg Keimgehalte von acht Zehnerpotenzen auf.

Salmonellen wurden im unbehandelten Substrat nie nachgewiesen, Fäkalstreptokokken in beiden Versuchsabschnitten mit 10^5 KBE/g, *Clostridium perfringens* mit 10^4 KBE/g. Nach der Beimpfung lagen die Werte bei 10^7 bis 10^8 KBE/g.

Im ersten Jahr konnten Salmonellen bei vier Versuchsdurchgängen mit je drei Parallelen nach 24 h einmal qualitativ nachgewiesen werden, jedoch in keiner der übrigen untersuchten Prüfkörper und zu keinem späteren Zeitpunkt.

Im zweiten Jahr konnten sie in einem von drei Prüfkörpern nach 24 h qualitativ nachgewiesen werden jedoch in keinem der später entnommenen Prüfkörper.

Fäkalstreptokokken wurden 1999 in zwei von drei Prüfkörpern nach 24 h qualitativ nachgewiesen. Nach 7 d waren alle drei Parallelen positiv. Weitere 7 d später konnten Fäkalstreptokokken in keinem der Prüfkörper festgestellt werden.

2000 waren alle nach 24 h und 7 d untersuchten Prüfkörper „FKS-positiv“, bis auf eine Ausnahme, die nach 24 h entnommen wurde. Nach 14 d konnten Fäkalstreptokokken in keiner der fünf untersuchten Proben festgestellt werden.

Weder 1999 noch 2000 zeigten die Keimzahlen von *Clostridium perfringens* eine deutliche Reduktion über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum. Die Zahlen bewegten sich bei allen Parallelen und zu allen Entnahmezeitpunkten stets bei drei bis fünf Zehnerpotenzen. Möglicherweise nehmen die Keimzahlen sogar nach einer Exposition von 7 Tagen um eine Zehnerpotenz zu.

Die Endkontrollen, die nach 14 d untersucht wurden, lagen mit ihren Keimgehalten immer im Bereich von sieben bis acht Zehnerpotenzen.

3.3.1.3 Keimträgerversuche mit bovinem Parvovirus

In die großtechnische Anlage „H“ wurden über Zeiträume von 14 d Probenpakete mit BPV-Sandwichkeimträgern (s. Kap. 2.2.4.2) eingebracht und zu jedem Entnahmezeitpunkt (nach 2 h sowie nach 7 und 14 d) jeweils mit drei Parallelansätzen untersucht.

Der Reduktionsverlauf der Virustiter ist in Tabelle 27 festgehalten.

Tab. 27: Virustiterreduktion in der thermophil betriebenen Anlage „H“ über einen Zeitraum von 14 Tagen (Angaben in KID₅₀/ml)

Temp. (°C)	Virus 1:10	KT 1			KT 2			KT 3		
		24 h	7 Tg	14 Tg	24 h	7 Tg	14 Tg	24 h	7 Tg	14 Tg
62	5,62E+06	3,16E+02	3,16E+03	n.n.	3,16E+02	3,16E+03	n.n.	3,16E+02	n.n.	n.n.
59,7	5,62E+06	5,62E+01	5,62E+02	n.n.	3,16E+02	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.
57,7	5,62E+06	n.d.	3,16E+03	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.	3,16E+02	n.n.
56,5	1,00E+08	1,78E+02	n.n.	n.n.	3,16E+02	n.n.	n.n.	5,62E+01	5,62E+01	n.n.
55,7	1,00E+08	1,00E+02	5,62E+01	n.n.	5,62E+01	n.n.	n.n.	1,00E+02	n.n.	n.n.
55,3	1,00E+08	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.

KID: Kulturinfektiöse Dosis; KT1-KT3: Keimträger 1-3 (bezeichnen die Parallelansätze); n.d.: nicht durchgeführt; n.n.: nicht nachweisbar

An dieser Anlage wurden insgesamt sechs Versuchsdurchgänge mit BPV durchgeführt.

Das Virus wies in einer Verdünnung von 1:10 eine KID₅₀ von 10⁶ bzw. 10⁸ auf.

In zwei Fällen konnten die Untersuchungen nach 24 h nicht durchgeführt werden. Bei den übrigen Proben lagen die Werte bei allen Parallelen bei 10¹ bis 10² KID₅₀/ml.

Nach 7 d waren die Virustiter uneinheitlich und schwankten von 10³ bis unterhalb ihrer Nachweisbarkeit.

Nachdem die Proben 14 d dem Vergärungsprozeß ausgesetzt waren, konnte in keinem Fall (auch in keiner Parallele) mehr Virus nachgewiesen werden.

Direktelutionen wiesen stets Titer von 10⁵ KID₅₀/ml auf. Ebenso die Endkontrollen, die während des Versuchs bei 4 °C gelagert und nach dessen Abschluß mit untersucht wurden.

3.3.2 Kofermentationsanlage „B“ in Bayern

Diese Anlage wurde thermophil betrieben, während der Versuche wurden Betriebstemperaturen von 51,5 und 51,6 °C gemessen.

3.3.2.1 Bakteriologischer Status im Substrat

Zur Übersicht über den Bakteriengehalt des Materials wurde in beiden Durchgängen die Gesamtbakterienzahl (GKZ) erfaßt. Des weiteren wurde auf das Vorkommen nativer Salmonellen (in 50 g Substrat) und *E. coli* sowie *Streptococcus faecium* untersucht. Die Angaben beziehen sich auf KBE/g Substrat (außer bei Salmonellen: 50 g Substrat).

Aus technischen Gründen kam es bei der Erhebung des bakteriologischen Status beim ersten Untersuchungsgang 1999 im Substrat zu keinen Untersuchungen auf *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni*. Im zweiten Untersuchungsgang 2000 wurden diese beiden Bakteriengruppen mit erfaßt.

Tabelle 28 zeigt den Bakterienstatus des Outputmaterials, sowie einen Keimzahlenvergleich zwischen In- und Output an der Kofermentationsanlage „B“ in Bayern.

Als „Gemisch“ wurde das Inputmaterial bezeichnet. Es handelt sich hier um eine thermophile Kofermentationsanlage mit Naßvergärung, in der die Einzelkomponenten nicht separat untersucht werden konnten.

Gleiche Nummern bezeichnen immer zusammengehörende In- und Output Proben. Bei gleich bezifferten Output Proben handelt es sich bei „Gemisch“ um Gärreste in fester Form, bei „PW“ um das davon abgepreßte Wasser.

Tab. 28 : Übersicht über den Bakterienstatus im Outputmaterial, sowie Keimzahlenvergleich Input/Output in der thermophilen Kofermentationsanlage "B" (Angaben in KBE/g bzw. 50g Substrat)

Datum	Stufe	Substrat	pH-Wert	GKZ/g	Salm/50g	<i>E. coli</i> /g	FKS/g	Clost/g	Camp/g	
				thermophile Faulung, G/SR/BA						
Jan. 1999	OUT	SR/BA	8,37	3,20E+07	n.n.	n.n.	4,30E+00			
	IN	Gemisch	5,18	4,30E+08	n.n.	4,30E+04	9,30E+02			
	OUT	PW	8,01	3,80E+07	n.n.	n.n.	9,20E-01			
	OUT	Gemisch	8,33	2,10E+07	n.n.	n.n.	n.n.			
	IN	Gemisch	5,42	9,60E+07	n.n.	7,20E+02	4,60E+06			
	OUT	Gemisch	8,42	3,80E+07	n.n.	1,50E+00	9,30E+02			
	IN	Gemisch	6,16	1,30E+08	n.n.	2,40E+04	3,60E+04			
	OUT	Gemisch	8,31	3,10E+07	n.n.	n.n.	3,60E-01			
	IN	Gemisch	6,12	9,60E+08	n.n.	2,40E+04	2,30E+05			
	OUT	Gemisch	8,6	3,10E+07	n.n.	n.n.	9,30E+00			
	IN	Gemisch	6,3	5,80E+08	n.n.	2,10E+04	3,60E+03			
	OUT	Gemisch	8,42	5,80E+08	n.n.	3,60E-01	n.n.			
	IN	Gemisch	6,24	7,40E+08	n.n.	3,80E+06	9,30E+05			
	OUT	Gemisch	8,35	3,20E+07	n.n.	4,30E+02	9,30E+03			
	OUT	PW	8,33	9,40E+07	n.n.	9,20E+01	4,30E+03			
	IN	Gemisch	6,56	3,40E+08	9,30E+02	2,40E+06	4,60E+05			
	OUT	PW	8,34	2,80E+07	n.n.	7,40E-01	4,30E+02			
	OUT	Gemisch	7,94	9,60E+06	n.n.	n.n.	1,50E+03			
	IN	Gemisch	6,21	8,60E+07	pos	2,40E+05	4,30E+03			
	OUT	PW	8,45	1,50E+07	n.n.	9,20E+00	1,50E+02			
OUT	Gemisch	8,74	1,30E+07	n.n.	9,20E-01	9,30E+02				
IN	Gemisch	5,27	4,70E+08	pos	4,30E+04	9,30E+05				
OUT	PW	8,06	4,30E+07	n.n.	n.n.	9,20E+02				
OUT	Gemisch	7,7	3,70E+07	n.n.	9,30E+01	4,3E+04				
IN	Gemisch	5,52	5,80E+08	n.n.	4,30E+03	1,50E+04				
OUT	PW	8,44	6,30E+07	n.n.	1,10E+01	2,30E+03				
OUT	Gemisch	8,19	4,20E+07	n.n.	3,60E+00	2,00E+03				
Okt. 2000	IN	Gemisch	6,3	5,80E+08	n.n.	2,10E+04	3,60E+01	9,30E+03	9,20E-01	
	OUT	Gemisch	8,42	1,70E+07	n.n.	3,60E-01	n.n.	2,10E+02	3,60E-01	
	IN	Gemisch	6,24	7,40E+08	n.n.	3,80E+06	9,30E+05	2,00E+02	n.n.	
	OUT	Gemisch	8,35	3,20E+07	n.n.	4,30E+02	9,30E+03	4,30E+02	n.n.	
	OUT	PW	8,33	9,40E+07	n.n.	9,20E+01	4,30E+03	2,10E+03	n.n.	
	IN	Gemisch	6,56	3,40E+08	9,30E+02	2,40E+06	4,60E+05	2,40E+04	n.n.	
	OUT	Gemisch	7,94	9,60E+06	n.n.	n.n.	1,50E+03	1,50E+03	n.n.	
	OUT	PW	8,34	2,80E+07	n.n.	7,40E-01	4,30E+02	1,50E+03	n.n.	
	IN	Gemisch	6,21	8,60E+07	pos	2,40E+05	4,30E+03	9,30E+03	n.n.	
	OUT	Gemisch	8,74	1,30E+07	n.n.	9,20E-01	9,30E+02	2,30E+04	n.n.	
	OUT	PW	8,45	1,50E+07	n.n.	9,20E+00	1,50E+02	2,30E+04	n.n.	
	IN	Gemisch	5,27	4,7E+08	pos	4,30E+04	9,30E+05	9,30E+01	n.n.	
	OUT	Gemisch	7,7	3,70E+07	n.n.	9,30E+01	4,30E+04	1,50E+04	n.n.	
	OUT	PW	8,06	4,30E+07	n.n.	n.n.	9,20E+00	1,50E+04	n.n.	
	IN	Gemisch	5,52	5,80E+08	n.n.	4,30E+03	1,50E+04	4,30E+02	n.n.	
	OUT	Gemisch	8,19	4,20E+07	n.n.	3,60E+00	2,00E+03	7,40E+01	n.n.	
OUT	PW	8,44	6,30E+07	n.n.	1,10E+01	2,30E+03	2,30E+01	9,20E-01		

In vorstehender Tabelle bedeuten:

GKZ: Gesamtbakterienzahl; Salm: *Salmonella senftenberg*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Camp: *Campylobacter jejuni*; KBE: Koloniebildende Einheiten; G: Rindergülle; SR: Speisereste und Großküchenabfälle; BA: Bioabfälle; PW: Preßwasser; Gemisch: Anlagentypisches Beschickungsmaterial; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar

1999 wurden insgesamt 10 In- und 17 Output Proben untersucht. 2000 waren es 6 In- und 11 Output Proben.

Als begleitender Prozeßparameter wurde in den untersuchten Substraten jeweils der pH-Wert gemessen. Dabei zeigt sich, daß im Inputmaterial stets ein leicht saures Milieu, zwischen pH 5 und 6,5 herrscht, im Outputmaterial dagegen verschiebt sich der pH leicht in den alkalischen Bereich, mit einem Wert um pH 8.

Die Gesamtbakterienzahl lag bei allen untersuchten Proben in einem Bereich von 10^6 und 10^8 KBE/g Substrat und läßt keine Unterschiede zwischen In- und Outputmaterialien erkennen.

Bei der Anlagenbeprobung 1999 konnten Salmonellen im Input unter insgesamt zehn Proben, zweimal qualitativ und einmal quantitativ nachgewiesen werden, jedoch in keiner der 17 Output Proben.

Im Oktober 2000 wurden bei insgesamt sechs Input Proben zweimal Salmonellen quantitativ, einmal qualitativ nachgewiesen, jedoch in keiner der elf Output Proben.

1999 war *E. coli* in elf Output Proben nicht nachzuweisen, in den übrigen Proben lagen die Zahlenwerte bei 10^0 bis 10^2 KBE/g Substrat. Gegenüber den Input Proben, bei denen die Werte zwischen 10^2 und 10^6 lagen, bedeutet dies eine Reduktion um bis zu sechs Zehnerpotenzen.

2000 lagen die Zahlenwerte von *E. coli* im Output knapp oberhalb der Nachweisgrenze, bis zu 10^2 KBE/g Substrat. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Gärrest- und Preßwasser Proben war nicht festzustellen. In den Input Proben wurden 10^3 bis 10^6 KBE/g Substrat festgehalten, was einer Reduktion um bis zu fünf Zehnerpotenzen entspricht.

Streptococcus faecium konnte im ersten Durchgang zweimal nicht, 14 mal in einem Bereich von 10^0 bis 10^3 und einmal sogar mit 10^4 KBE/g Substrat nachgewiesen werden. Im Input lagen die Zahlen bei 10^2 bis 10^6 . Dies entspricht einer Reduktion von 10^1 bis 10^5 KBE/g Substrat.

Im zweiten Durchgang wurde *Streptococcus faecium* im Output einmal nicht, neunmal zwischen 10^2 und 10^3 und einmal sogar mit 10^4 KBE/g Substrat nachgewiesen. Im Input einmal mit 10^1 , in den übrigen Proben mit 10^3 bis 10^5 KBE/g Substrat, dies entspricht einer Reduktion um ein bis zwei Zehnerpotenzen.

Im Untersuchungsgang 2000 wurde das Vorkommen von *Clostridium perfringens* mit Werten von 10^1 bis 10^4 in In- und Output gleichermaßen erfaßt. Es konnte weder eine Reduktion noch eine Zunahme der KBE verzeichnet werden.

Campylobacter jejuni war im Output nur in zwei Fällen mit Werten um die Nachweisgrenze vertreten, in einem davon wurde dieser Wert auch im dazugehörigen Input festgestellt. In allen übrigen Proben konnte *Campylobacter jejuni* nicht nachgewiesen werden. Eine Reduktion oder Zunahme konnte nicht beobachtet werden.

3.3.2.2 Prüfkörperversuche mit Bakterien

Im August 2000 wurde an der großtechnischen Anlage „B“ eine umfangreiche Prozeßprüfung durchgeführt, in deren Rahmen auch Prüfkörperversuche mit den Keimen *Salmonella senftenberg*, *E. coli*, *Streptococcus faecium*, *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni* stattfanden.

Es wurde ein Zeitraum von insgesamt 21 d untersucht, die Probenentnahmen fanden nach 24 und 6 h, sowie nach 7 und 21 d statt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tab. 29: Keimzahlreduktion verschiedener Keime im Prüfkörper in der thermophil betriebenen Anlage „B“ über einen Zeitraum von 21 Tagen (Angaben in KBE/g bzw. 50 g Substrat)

Keim	Substrat, beimpft	KT I					KT 2					End- kontrolle
		24 h	60 h	7 Tage	21 Tage	24 h	60 h	7 Tage	21 Tage			
Salm	4,60E+07	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	9,30E+06
E.coli	5,70E+06	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+00	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,30E+07
FKS	1,10E+09	4,30E+00	1,10E+00	3,60E-01	2,30E+00	4,30E+00	9,3E*00	n.n.	9,30E+01	2,30E+07		
Clost	1,10E+09	2,10E+04	n.d.	9,30E+03	4,30E+04	9,30E+03	n.d.	9,30E+03	2,30E+04	4,30E+05		
Camp	1,10E+08	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.	n.n.	n.d.	n.n.	n.n.	4,30E+04		

Salm: *Salmonella senftenberg*; FKS: *Streptococcus faecium*; Clost: *Clostridium perfringens*; Temp (°C); KBE: Koloniebildende Einheiten; n.n.: nicht (mehr) nachweisbar; n.d.: nicht durchgeführt

Wie oben beschrieben wurden fünf verschiedene Bakterienarten in Prüfkörpern dem thermophilen Vergärungsprozeß ausgesetzt. Jede Keimart wurde mit je zwei Parallelen untersucht.

Während der Versuche wurden Betriebstemperaturen von 51,5 und 51,6 °C gemessen.

Die Keimsuspensionen, die zur Beimpfung der Prüfkörper hergestellt wurden, wiesen sämtlich Keimgehalte mit sieben Zehnerpotenzen auf, außer *Campylobacter*, hier wurden neun Zehnerpotenzen festgestellt.

Das unbehandelte Substrat wies weder Salmonellen noch *Campylobacter* auf. *E. coli* war mit 10^1 KBE/g vertreten, Fäkalstreptokokken mit 10^0 und *Clostridium perfringens* mit 10^4 KBE/g.

Nach der Beimpfung lagen die Keimgehalte zwischen 10^6 KBE/g (*E. coli*) und 10^9 KBE/g (*Clost*).

Salmonellen, wie auch *Campylobacter* und *E. coli* konnten in den beiden Parallelen bereits 24 h nach der Exposition nicht mehr festgestellt werden. Dies blieb auch bei allen folgenden Untersuchungen der Fall. Eine Ausnahme findet sich bei *E. coli*, hier konnte in einem Prüfkörper nach 21 d ein Keimgehalt von $2,3 \times 10^0$ KBE/g festgestellt werden.

Eine deutliche Reduktion der Keimzahl liegt auch bei *Streptococcus faecium* vor. Bis auf einen Prüfkörper, der nach 7 d untersucht wurde und keine Keime mehr enthielt, waren die Keimzahlen bereits nach 24 h an die Nachweisgrenze gesunken und änderten sich im übrigen Verlauf nicht wesentlich.

Clostridium perfringens dagegen läßt nach 24 h zwar eine Reduktion der Keimzahlen um fünf Zehnerpotenzen erkennen, dieser Wert bleibt jedoch über den gesamten restlichen Versuchszeitraum nahezu unverändert. Wie bereits bei Anlage „H“ könnte auch hier sogar ein Anstieg der Keimzahlen um eine Zehnerpotenz nach 21 d vermutet werden.

Endkontrollen, die nach 21 d untersucht wurden, wiesen Keimzahlen zwischen 10^4 KBE/g (*Camp*) und 10^7 KBE/g (*E. coli*, FKS) auf.

3.3.2.3 Keimträgerversuche mit bovinem Parvovirus

Über Zeiträume von 21 d wurden in die großtechnische Anlage „B“ Probenpakete mit BPV-Sandwichkeimträgern (s. Kap. 2.2.3.3) eingebracht und zu jedem Entnahmezeitpunkt (nach 24 und 6 h, sowie nach 7 und 21 d) jeweils mit drei Parallelansätzen untersucht.

Der Reduktionsverlauf der Virustiter ist in Tabelle 30 festgehalten.

Tab. 30: Virustiterreduktion in der thermophil betriebenen Anlage „B“ über einen Zeitraum von 21 Tagen (Angaben in KID₅₀/ml)

Virus 1:10	KT 1				KT 2				KT 3			
	24 h	60 h	7 Tg	21 Tg	24 h	60 h	7 Tg	21 Tg	24 h	60 h	7 Tg	21 Tg
1,78E+07	3,16E+02	1,78E+02	n.n.	n.n.	n.n.	5,62E+01	n.n.	n.n.	3,16E+02	n.n.	n.n.	n.n.
1,78E+07	5,62E+01	n.n.	n.n.	n.n.	1,00E+02	n.n.	n.n.	n.n.	5,62E+01	n.n.	n.n.	n.n.

KID: Kulturinfektiöse Dosis; KT1-KT3: Keimträger 1-3 (bezeichnen die Parallelansätze); n.n.: nicht nachweisbar

Der Versuchsdurchgang an dieser Anlage wurde insgesamt zweimal wiederholt.

Der Virustiter, in einer Verdünnung von 1:10; lag bei 10⁷ KID₅₀/ml.

Nachdem die Proben 24 h dem Vergärungsprozeß ausgesetzt waren, lagen die Werte bei 10¹ bis 10² KID₅₀/ml, in einem Fall war gar kein Virus mehr nachweisbar.

Nach 60 h konnte in vier Fällen kein Virus mehr nachgewiesen werden, einmal mit einer KID₅₀/ml von 10¹, ein weiteres Mal von 10² KID₅₀/ml.

Sieben und 21 d nach Versuchsbeginn war in keinem Fall Virus nachzuweisen.

Die Direktelutionen zeigten stets einen Virusgehalt von 10⁷ KID₅₀/ml, die Endkontrollen, die während des Versuchs bei 4 °C gelagert und nach dessen Abschluß mit untersucht wurden von 10⁶ bis 10⁷ KID₅₀/ml.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkungen

Ein wichtiger Fluß von Krankheitserregern zum Tier erfolgt durch die Kette: infizierte tierische Fäkalien – Dünger – Ernteprodukte – Tier. Dieser Erregertransport dürfte eine der Hauptursachen für die Verbreitung tierischer Seuchen sein. Durch eine Entseuchung kann sichergestellt werden, daß der Zyklus der Übertragung von pathogenen Keimen auf Mensch und Tier unterbrochen wird (OECHSNER, 1991).

In Gülle kann eine große Anzahl pathogener Mikroorganismen vorkommen und ihre Infektiosität über einen langen Zeitraum behalten (STRAUCH, 1990; STRAUCH & BALLARINI, 1994). Dies gilt ebenso für viele biogene Stoffe, die bei der Biogasgewinnung als Kofermentate zusätzlich zur Gülle Verwendung finden (STRAUCH, 1996).

Sollen Endprodukte aus Kofermentationsanlagen als landwirtschaftliche Dünger eingesetzt werden, muß der Behandlungsprozeß, um Infektionskreisläufe auszuschließen, eine ausreichende Hygienisierung der Endprodukte gewährleisten.

Für die Kofermentation gilt dies im besonderen Maße, da durch diese Substrate neue Pathogene aus verschiedensten Herkunftsquellen in die Behandlungsprozesse und anschließend, über Endprodukte, in landwirtschaftliche Betriebe eingetragen werden könnten.

In den vorliegenden Untersuchungen sollten Antworten gefunden werden auf die Fragen, inwieweit der Prozeß der anaeroben Kofermentation im mesophilen (33 °C) und im thermophilen (53-55 °C) Temperaturbereich zu einer Inaktivierung verschiedener seuchenhygienisch relevanter Bakterien und Viren bzw. entsprechender Indikatororganismen führt.

Darüber hinaus sollten verschiedene Substratkombinationen (Rindergülle:Speisereste 3:1; Rindergülle:Speisereste:Bioabfälle 2:1:1; Rindergülle:Bioabfälle 1:1) in der anaeroben Vergärung eingesetzt und ihr Einfluß auf eine Inaktivierung oder auch Stabilisierung von *Salmonella senftenberg*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecium*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* und bovines Parvovirus untersucht werden.

Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die, in Zusammenhang mit der anaeroben Faulung noch wenig erforschten Keime *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni*, gerichtet werden.

Zur Bearbeitung dieser Fragen wurden Versuche mit Indikatororganismen zunächst an halbtechnischen Modellanlagen, ergänzt durch Praxisversuche an zwei großtechnischen Praxisanlagen durchgeführt.

Prozeßbegleitend wurden jeweils In- und Output-Untersuchungen vorgenommen. Die Hauptversuche wurden jedoch mit einer speziellen Keimträger- bzw. Prüfkörpertechnik durchgeführt.

4.2 Beurteilung der Input/Output-Prüfungen

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes, d.h. in der mesophilen (33 °C) und thermophilen (53-55 °C) Vergärung, sowie bei verschiedenen Substratkombinationen (Gülle:Speisereste 3:1; Gülle:Speiserest:Bioabfälle 2:1:1; Gülle:Bioabfälle 1:1) wurde aus der Modellanlage gewonnenes Outputmaterial in etwa 14-täglichem Abstand auf das Vorkommen nativer Bakterien untersucht (vgl. Tab. 4).

An den großtechnischen Anlagen wurden solche Untersuchungen im Untersuchungszeitraum kontinuierlich durchgeführt (vgl. Tabb. 25 u. 28).

Um eine Übersicht über die tatsächliche Keimreduktion zu erhalten, wurde auch entsprechendes Inputmaterial auf seinen Keimgehalt hin betrachtet. Hierbei handelt es sich zwar theoretisch um das gleiche Material, praktisch jedoch können diese Proben nicht identisch sein.

Als entscheidender Punkt kann festgehalten werden, daß bei keiner der untersuchten Output-Proben, weder bei solchen, die an der Modellanlage gewonnen wurden, noch bei solchen aus Praxisbetrieben, je Salmonellen in 50 g Substrat gefunden werden konnten. Dies war auch dann der Fall, wenn im zugehörigen Inputmaterial Salmonellen nachzuweisen waren.

Die Forderung der BioAbfV (ANONYM, 1998), die in 50 g Outputmaterial keine Salmonellen zuläßt, konnte also in den beiden großtechnischen Praxisanlagen und in der Modellanlage sowohl im mesophilen Temperaturbereich mit einer Substratkombination von 75 % Gülle und 25 % Speisereste, als auch im thermophilen Bereich mit Kombinationen von 75 % Gülle, 25 % Speisereste, 50 % Gülle, 25 % Speisereste, 25 % Bioabfälle und 50 % Gülle, 50 % Bioabfälle erfüllt werden.

Es muß auch erwähnt werden, daß Salmonellen, waren sie an einem Punkt des Verfahrens nicht nachzuweisen, an keinem Späteren wieder zu finden waren. Insbesondere gilt dies für Proben, die nach ihrer Behandlung längere Zeit gelagert wurden. Dies wird auch von HOFERER (2000) bestätigt.

Eine vergleichbare Aussage bezüglich *Escherichia coli* und *Streptococcus faecium* kann nur vorbehaltlich getroffen werden.

Wesentliche Unterschiede in der Keimzahlreduktion konnten an der Modellanlage zwischen mesophiler Vergärung über 21 d und thermophiler Vergärung über 24 h nicht festgestellt werden.

Während die Keimzahlen im Outputmaterial sich bei *E. coli* meist um die Nachweisgrenze bewegten und insgesamt nur acht mal (bei 30 Untersuchungen) im Bereich von zwei Zehnerpotenzen lagen, waren Fäkalstreptokokken, bei der gleichen Anzahl Untersuchungen 16 mal mit 10^1 - 10^3 KBE/g nachzuweisen. Für *E. coli* konnte einmal ein Wert von 10^3 , für Fäkalstreptokokken sechsmal ein Wert von 10^4 KBE/g ermittelt werden. Beide Keimgruppen waren im Input mit durchschnittlich 10^4 KBE/g bzw. ml nachzuweisen.

An den großtechnischen Anlagen konnten Werte dieser Größenordnung für *E. coli* nie, für Fäkalstreptokokken an der Anlage "B" bei 27 Untersuchungen zweimal festgestellt werden. Auch hier lagen die Ausgangskeimzahlen im Bereich 10^5 - 10^6 KBE/g bzw. ml.

Die hohen Keimzahlen im Output (*E. coli* bei 10^3 , Fäkalstreptokokken bei 10^4 KBE/g) der halbtechnischen Anlage wurden insbesondere bei der Versuchsanordnung "thermophile Vergärung mit Gülle und Speiseresten" festgestellt. Diese Versuchsvariante wurde in den jahreszeitlich bedingt, warmen Monaten Mai bis Mitte Juli durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt bestand keine Möglichkeit die Beschickungssubstrate zu kühlen, so daß von einer besonders hohen Keimdichte im Ausgangsmaterial ausgegangen werden muß. Zudem kommt es an der Modellanlage zu einer Maßstabverschiebung, das Ausleitungsrohr für Outputmaterial betreffend. Die hohe Keimbelastung des Ausgangsmaterials einerseits und die Möglichkeit der raschen Rekontamination durch das Auslaufrohr, welches aus technischen Gründen nicht desinfiziert werden konnte andererseits, liefert wahrscheinlich eine Erklärung zu diesem Phänomen. Eine Reduktion um drei bis vier Zehnerpotenzen war jedoch immer gewährleistet.

Clostridium perfringens bleibt immer mit mehreren Zehnerpotenzen nachweisbar und wird sowohl in der mesophilen als auch in der thermophilen Vergärung höchstens um zwei bis drei Zehnerpotenzen reduziert, erreicht aber in keinem Fall die Nachweisgrenze. Die Forderung der "Nicht-Nachweisbarkeit" von Clostridien im Outputmaterial, wie sie von österreichischen Behörden angestrebt wurde (PHILIPP, 2001), erscheint deshalb nicht realistisch.

Campylobacter jejuni konnte nach der mesophilen wie auch der thermophilen Vergärung mit gleicher Häufigkeit nicht, oder in sehr geringen Konzentrationen festgestellt werden. Das Wachstumsoptimum dieser Keime wird im Temperaturbereich von 42-45 °C angegeben, unter 30 und über 47 °C ist ein Wachstum nicht mehr möglich. Wenn bei diesen Temperaturen vereinzelt *Campylobacter jejuni* isoliert werden können, so ist dies sowohl vom

Bakterienstamm, als auch vom Substrat abhängig (BUTZLER, 1984). DOYLE und ROMAN (1981) fanden heraus, daß *Campylobacter jejuni* durch eine Erhitzung auf 55 °C innerhalb der ersten Minute um 90 % seiner Population reduziert wird. In entrahmter Milch (angereichert mit 10^6 - 10^7 KBE/ml) überlebten die Keime bei 60 °C selbst diese Minute nicht.

Eine Pasteurisierung bei 70 °C über einen Zeitraum von einer Stunde sollte deshalb den Forderungen nach vollständiger Elimination auch in inhomogenem Material genügen.

Darüber hinaus erweisen sich *Campylobacter*-Stämme als empfindlich im alkalischen Milieu bei pH-Werten über 8 (BUTZLER, 1984). Durch Zugabe von Bioabfällen wird dieser pH-Bereich oftmals erreicht und überschritten. Dies schränkt das Wachstum dieser Bakterien zusätzlich ein, möglicherweise erübrigt sich dadurch sogar die Erhitzungsstufe für diesen Keim ganz.

4.3 Beurteilung der Prüfkörperversuche im mesophilen Temperaturbereich

Durch die Vorpasteurisierung mit anschließender Vergärung im mesophilen Temperaturbereich bei einer Substratkombination von 75 % Gülle und 25 % Speiseresten (vgl. Tab. 6) konnten *Salmonella senftenberg* und *Campylobacter jejuni* sicher inaktiviert werden. Keiner der beiden Keime war zu einem späteren Zeitpunkt wieder nachweisbar.

E. coli und *Streptococcus faecium* waren nach 60 min unter der Nachweisgrenze, konnten jedoch im Verlauf der Vergärung wieder nachgewiesen werden. Es handelt sich hier um eine vernachlässigbare Wiederverkeimung durch das Betriebsgeschehen. Beide Keimarten können durch diese Prozeßvariante zuverlässig um sechs bis acht Zehnerpotenzen reduziert werden.

Auch bei *Clostridium perfringens* kommt es durch diese Behandlung zu einer stabilen Reduktion, jedoch nur um zwei Zehnerpotenzen.

Wird zuerst vergärt und im Anschluß pasteurisiert (vgl. Tab.7), können alle Keimarten, bis auf *Clostridium perfringens*, nach der Pasteurisierung nicht mehr nachgewiesen werden. Eine sichere Hygienisierung durch diese Prozeßvariante kann festgestellt werden, da auch 24 h nach der Erhitzung die Keimzahlen unter der Nachweisgrenze bleiben.

Clostridium perfringens kann jedoch auch hier lediglich um zwei bis drei Zehnerpotenzen reduziert werden.

Das bovine Parvovirus kann durch beide Varianten um drei bis fünf Zehnerpotenzen reduziert werden (vgl. Tab.8 u. 9). Der Titer bleibt jedoch unabhängig von der Vorbehandlung bei 10^2 KID₅₀/ml stabil.

Untersuchungen von LEUZE (1984) und SAIER (1987) an pasteurisiertem Klärschlamm bestätigen, daß es dadurch zu keiner vollständigen Inaktivierung des Virus kommt.

Mesophile Anaerob-Verfahren besitzen zwar i.d.R. eine mikrobizide und viruzide Wirkung, jedoch kann eine ausreichende Hygienisierung der Prozeßendprodukte nicht garantiert werden. Für mesophile Verfahren sind demnach zusätzliche Maßnahmen zur Hygienisierung erforderlich (z.B. eine Erhitzungsstufe), wenn die Endprodukte nach den Bestimmungen der BioAbfV in den Verkehr gebracht werden sollen. Nach den vorliegenden Untersuchungen reicht eine Vorerhitzung des Materials auf 70 °C für eine Stunde aus, um in Kombination mit dem mikrobiziden/viruziden Effekt der anschließenden mesophilen Vergärung eine sichere Hygienisierung zu gewährleisten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von RÜCKERT (1991) und MARTENS et al. (1998) überein.

Für die Vernichtung pathogener Mikroorganismen sind nicht nur hohe Temperaturen in entsprechend langen Einwirkzeiten ausschlaggebend. Vielmehr werden bei der Verrottung der organischen Substanz mikrobielle Stoffwechselprodukte gebildet, die sich als Hemmstoffe mit bakteriostatischem, bakteriziden und auch fungizidem Effekt erweisen (KNOLL, 1986).

Da es sich bei der mesophilen Vergärung mit Vor-oder Nachpasteurisierung um ein komplexes Behandlungsverfahren handelt, sollte im Hinblick auf die Eliminierung der Keime der Vorpasteurisierung der Vorzug gegeben werden, da eine anschließende Faulung zu einer weiteren Titerreduktion führt. Untersuchungen von LEUZE (1984) bestätigen dies insbesondere für Viren.

Zunächst etwas verwirrend erscheint die Tatsache, daß in Pasteurisierungsversuchen Keimzahlen, wenn auch unwesentlich, so doch höher lagen, wenn die Aufheizphase mit berücksichtigt wurde. Dies liegt jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit daran, daß diese Keime einer längeren Adaptationsphase (bis zu 4,5 h) ausgesetzt waren, und sich so eher an die höheren Temperaturen gewöhnen konnten, während in der Versuchsanordnung ohne Aufheizphase die Keime plötzlich sehr hohen Temperaturen ausgesetzt waren.

4.4 Beurteilung der Prüfkörperversuche im thermophilen Temperaturbereich

Die zunächst über 21 d angesetzten Versuche im thermophilen Temperaturbereich (vgl. Tab.14) zeigten, daß bei *Salmonella senftenberg*, *E. coli* und *Campylobacter jejuni* nach 24 h eine zuverlässige Inaktivierung möglich ist.

Streptococcus faecium dagegen kann nach 24 h nur um drei Zehnerpotenzen reduziert werden, spätestens nach sieben Tagen ist auch dieser Keim um sieben Zehnerpotenzen reduziert.

Clostridium perfringens wird nach 24 h um drei Zehnerpotenzen reduziert, die Keimzahlen behalten dieses Niveau jedoch über den gesamten Versuchsverlauf bei.

Untersuchungen von RÜCKERT (1991) bestätigen die Ergebnisse für Enterobakterien, Fäkalstreptokokken und Salmonellen. Auch PLYM-FORSELL (1983) konnte *Salmonella senftenberg* nach 24 h bei 55 °C nicht mehr nachweisen.

Für die thermophile Vergärung über 24 h in der Modellanlage wurden die D-Werte ermittelt und können mit denen aus den Wasserbadversuchen verglichen werden (vgl. Tabb. 1 u. 20).

Wird in der thermophilen Vergärung die Substratkombination wie in der mesophilen Vergärung beibehalten (Gülle:Speisereste, 3:1), dann kann bei gleicher Temperatur für *E. coli* im Wasserbad ein D-Wert von 1,39 h, im Fermenter von 1,38 h ermittelt werden. Wird jedoch Bioabfall (dann im Verhältnis 2:1:1) zugegeben, steigt der Wert auf 1,48 h.

Bei *Streptococcus faecium* sind die D-Werte 1,46 (Wasserbad), 1,54 (Gülle:Speisereste 3:1) und 1,88 h (Gülle:Speisereste:Bioabfälle 2:1:1) errechnet worden.

Auch das bovine Parvovirus verhält sich auf diese Weise. Im Wasserbad liegt der D-Wert bei 1,98 h, im Fermenter bei 2,75 (Gülle:Speisereste 3:1) und 3,25 (Gülle:Bioabfälle 1:1).

Der Zusatz von Bioabfällen wirkt sich also hemmend auf die Inaktivierung dieser Keime aus.

Clostridium perfringens dagegen zeigt im Wasserbad einen D-Wert von 8,76, bei Gülle/Speisereste (3:1) einen D-Wert von 5,95 und bei Gülle/Speisereste/Bioabfälle (2:1:1) einen Wert von 4,35 h.

Auf diesen Keim scheint der Zusatz von Bioabfällen einen begünstigenden Einfluß bezüglich seiner Inaktivierung zu haben. Möglicherweise spielt hier die Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich eine entscheidende Rolle.

Insgesamt erwiesen sich thermophile Faulprozesse als geeignet, ein seuchenhygienisch unbedenkliches Endprodukt zu erzeugen, wenn eine tatsächliche Reaktorverweilzeit von mindestens 24 h garantiert werden kann. Zu diesem Schluß kommen auch MARTENS et al. (1998).

4.5 Beurteilung der verwendeten Prüfkörper/Keimträger

Um die Inaktivierungskinetik eines geeigneten Indikatororganismus während des Hygienisierungsprozesses ermitteln zu können, muß dieser dem herrschenden Milieu möglichst unverfälscht ausgesetzt werden.

Dies wird am besten dadurch gewährleistet, daß Keimsuspensionen direkt in das Fermentersubstrat eingemischt und Proben dieses durchmischten Substrats in gewissen Zeitabständen (abhängig von der Prozeßvariante) untersucht werden. Ausgehend von einem bestimmten Ausgangswert kann so der jeweilige Resttiter des Prüfkeimes bestimmt werden.

In Fermentern der Praxisanlagen (auch der Modellanlage) läßt sich dies jedoch aus verschiedenen Gründen nicht realisieren. Zum einen sind aufgrund der großen Volumina sehr große Mengen an Keimsuspensionen notwendig, um ausreichend hohe Ausgangstiter für eine Inaktivierungskinetik zu erreichen. Zum anderen ist eine gleichmäßige und homogene Verteilung der Suspensionen schwer zu gewährleisten.

Wichtigster Punkt aber, der gegen diese Art der Keimeinbringung spricht, ist die damit verbundene Verteilung und möglicherweise auch Weiterverbreitung der Mikroorganismen in der Umwelt.

Um einen Indikatorkeim in dem zu untersuchenden Milieu mit möglichst geringen stofflichen Barrieren zu exponieren, andererseits auch eine Verbreitung des Organismus zu verhindern, wurden bereits in der Vergangenheit Keimträger und Prüfkörpertechniken etabliert (PESARO et al., 1995; RAPP, 1995; SPILLMANN et al., 1987), die diesen Anforderungen weitestgehend gerecht wurden. Durch BRAUMILLER (2000), MOSS (2000) und HOFERER (2000) wurden diese Techniken weiterentwickelt. So standen für die vorliegenden Untersuchungen zwei Systeme für Inaktivierungsversuche zur Verfügung: das Volumen-Prüfkörpersystem für Versuche mit Bakterien, in denen die Keime bereits vor der Einbringung in den Versuch mit entsprechendem Substrat vermischt werden, und das Sandwich-Keimträgersystem für Versuche mit bovinem Parvovirus, dabei kommen die Keimträger erst mit Einbringung in die Fermenter mit dem Substrat in Berührung.

Beide Methoden ermöglichen eine permanente Milieugleichung über semipermeable Membranen.

In der abgeschlossenen Pasteurisierungseinheit, mit einem Volumen von lediglich 50 l war die Einbringung von Keimsuspensionen jedoch durchführbar und vertretbar, da eine Erhitzung bis zur vollständigen Inaktivierung möglich war.

Die Ergebnisse aus dieser Versuchsanordnung bestätigen die Ergebnisse, die durch Prüfkörperversuche gewonnen wurden (vgl. Tabb. 10 u. 23).

4.6 Beurteilung der Versuche mit *Clostridium perfringens*

Durch Erhitzung von *Clostridium perfringens* auf 70 °C und einer Haltezeit von einer Stunde konnten keine befriedigenden Inaktivierungen festgestellt werden (vgl. Tabb. 6 u. 7), deshalb wurden Versuche mit einer Erhitzung auf 90 °C über die Dauer einer Stunde durchgeführt (vgl. Tabb.16, 17, 18). Hier konnte dann eine Inaktivierung bis zu sechs Zehnerpotenzen nachgewiesen werden. Die Werte näherten sich der Nachweisgrenze. Eine sichere Eliminierung dieser Keime muß aber selbst bei Temperaturen über 90 °C angezweifelt werden, auch wenn im Anschluß an eine einstündige Erhitzung bei 90 °C noch eine Vergärungsstufe im thermophilen Bereich folgt (vgl. Tab.18).

Die Eignung von *Clostridium perfringens* als Indikatororganismus wird aufgrund dieser „Zick-Zack“-Ergebnisse (BÖHM, 2001) in Frage gestellt, obwohl seine Thermostabilität erneut bewiesen werden konnte.

4.7 Beurteilung der Versuche mit *Campylobacter jejuni*

In den vorliegenden Versuchsreihen ist das Inaktivierungsverhalten von *Campylobacter jejuni* dem von *Salmonella senftenberg* sehr ähnlich. Dies trifft insbesondere zu, wenn diese Keime einmal unter die Nachweisgrenze reduziert werden konnten. Keiner der beiden Keime konnte danach noch einmal festgestellt werden.

Für Fragestellungen dieser Art erübrigt sich der Einsatz von *Campylobacter jejuni*, wenn *Salmonella senftenberg* verwendet wird, da auch seine Verwendung als Prüfkeim einen ungleich höheren Arbeitsaufwand erfordert und seine Nachweisbarkeit nicht immer eindeutig ist.

4.8 Beurteilung der Prozeßparameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Inaktivierung der verwendeten Prüforganismen

Was STRAUCH (1992) für Komposte forderte gilt für Gärsubstrate gleichermaßen: Die chemisch-physikalischen Parameter der verschiedenen Verfahren sind in die Überprüfung einzubeziehen und die unterschiedlichen Verfahrensabläufe zu berücksichtigen.

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes wurden an der Modellanlage die Parameter pH-Wert, Biogasvolumen, Methangehalt des Gases, Fermenter- und Wasserbadtemperatur sowie Redoxpotential im Gärsubstrat protokolliert (vgl. Tab.5 u. 12).

In den Praxisanlagen konnten lediglich die Prozeßtemperaturen (entsprechend den Forderungen der BioAbfV nach indirekter Prozeßprüfung) und pH-Werte der untersuchten Substrate festgehalten werden (vgl. Tab.25 u. 28).

Wie schon in anderen Untersuchungen zuvor (z.B. HAAS et al., 1995; LUND et al., 1996; PESARO et al., 1995; MARTENS et al., 1999) wurde durch die Ergebnisse bestätigt, daß für die Beurteilung thermophiler anaerober Prozesse die Betriebstemperatur entscheidend ist. Eine Keiminaktivierung verläuft umso schneller, je höher diese Temperatur ist. Bei Temperaturen um 55 °C konnten einzig das bovine Parvovirus und *Clostridium perfringens* innerhalb 24 h nicht vollständig inaktiviert werden. Das Parvovirus widerstand sogar bei Temperaturen bis 62 °C, wie sie in der Praxisanlage „H“ erreicht wurden noch mehr als sieben Tage. *Clostridium perfringens* konnte im thermophilen Temperaturbereich sowohl in der Praxis als auch in den Modellanlagen um maximal vier Zehnerpotenzen reduziert werden.

Auch im mesophilen Temperaturbereich findet eine Inaktivierung der Mikroorganismen statt, allerdings in einem Zeitmaßstab von Tagen und Wochen. In diesen Fällen ist nicht die erreichte Temperatur die entscheidende Größe, da diese i.d.R. nicht höher liegen, als diejenigen, unter denen sich die verwendeten Organismen normalerweise vermehren. Die Wirksamkeit des mesophilen Bereichs liegt wahrscheinlich in einem Summeneffekt verschiedener Prozeßkomponenten, wie pH-Wert, Redoxpotential, NH₃-Konzentration etc. (HAAS et al., 1995; PESARO et al., 1995). Dabei lassen sich die Wirkungen dieser Komponenten derzeit noch nicht im Einzelnen voneinander abgrenzen.

Beurteilt man die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche an der Modellanlage, so fällt auf, daß die pH-Werte leicht ansteigen (um pH 8), wenn Bioabfälle zum Beschickungsmaterial dazu genommen werden.

In diesen Fällen kam es, berücksichtigt man die D-Werte, bei *E. coli*, *Streptococcus faecium* und bovinem Parvovirus zu einem leichten Anstieg derselben, bei *Clostridium perfringens* dagegen einer erheblichen Senkung.

Die zusätzlich zu Temperatur und pH-Wert gewonnenen Prozeßparameter lieferten keinerlei Anhaltspunkte über ihren Einfluß auf die Inaktivierung der verwendeten Prüforganismen.

HOFERER (2000) stellt allerdings fest, daß es bei ammoniakreicherer Schweinegülle im Vergleich zu Rindergülle zu einer schnelleren Inaktivierung der Indikatororganismen kam. Dies konnte er insbesondere im thermophilen Temperaturbereich beobachten.

Durch dieses Monitoring der Prozeßparameter an der Modellanlage war es möglich, den ungestörten Ablauf des Prozesses zu überwachen und gegebenenfalls regulierend einzugreifen.

4.9 Beurteilung der Praxisversuche

Die mikrobizide Wirkung des thermophilen Gärprozesses in den beiden großtechnischen Anlagen „B“ in Bayern und „H“ in Hessen wurde durch bakteriologische Untersuchungen des In- und Outputmaterials überprüft (vgl. Tab. 25 u. 28).

Es zeigte sich, daß Gülle und Speisereste bzw. Bioabfälle durchschnittlich 10^7 - 10^8 KBE/ml aerobe Gesamtbakterien enthielten. Diese Werte wurden auch von GRUNWALD (1995) ermittelt.

Bei Anlage „B“ konnten in fünf von 17 Input Proben Salmonellen nachgewiesen werden. Allgemein handelt es sich bei Speiseresten und Bioabfällen vorwiegend um Schäl- und Essensreste, die roh oder gekocht den braunen bzw. grünen Tonnen zugeführt werden. Dort beginnt oftmals der Vergärungsprozeß, mit einer Versäuerung im pH-Bereich 4-6. Bei diesen pH-Werten kann bereits von einer mikrobistatischen bis mikrobiziden Wirkung auf einige Keime (u.a. Salmonellen) ausgegangen werden. Dies erklärt die relativ seltenen Nachweise von Salmonellen bei vermeintlich hoch belastetem Material.

Weder bei Anlage "H" noch bei Anlage "B" konnten in den untersuchten Output Proben Salmonellen festgestellt werden. Damit werden die Forderungen der BioAbfV (1998) diesbezüglich erfüllt.

Auch die übrigen untersuchten Keime wiesen stets Werte an den Nachweisgrenzen auf, im Durchschnitt lag *E. coli* noch mit einer Zehnerpotenz unter den Fäkalstreptokokken. Die ermittelten Keimzahlreduktionen liegen damit unter den von BENDIXEN (1994) geforderten Werten für thermophile Anlagen. Hier sollte eine Reduktion der Fäkalstreptokokken um vier

Zehnerpotenzen bei einer mittleren hydraulischen Verweilzeit von 48-72 Stunden gewährleistet sein.

Insgesamt verlief der Vergärungsprozeß in beiden Anlagen, während der Versuchsdurchgänge so, daß ein seuchenhygienisch unbedenkliches Endprodukt gewährleistet werden konnte (PHILIPP et al., 2000).

Die Versuche mit Keimen in Prüfkörpern bestätigen die Endproduktkontrollen. Sämtliche Keime können im Verlauf von 14 Tagen (Anlage "H"), bzw. 21 Tagen (Anlage "B") um sechs bis acht Zehnerpotenzen bis an ihre jeweiligen Nachweisgrenzen reduziert werden (vgl. Tab. 26 u. 29). Einzige Ausnahme bildet auch hier, wie in den Versuchen an den Modellanlagen, *Clostridium perfringens*. Dieser Keim wird nach 21 Tagen um maximal fünf Zehnerpotenzen reduziert und weist dann noch Werte von 10^3 KBE/g auf.

Das bovine Parvovirus erwies sich bei Temperaturen um/über 55 °C als thermoresistenter als die Fäkalstreptokokken (vgl. Tab. 27 u. 30). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen aus anderen Studien zur thermophilen Anaerob-Behandlung, in denen sich Parvoviren als resistenter als Bakterien und als limitierend herausgestellt hatten (MARTENS et al., 1998; LUND et al., 1996; PESARO et al., 1995).

BÖHM (2001) fordert deshalb für Anlagen, die eine Ausnahmegenehmigung nach dem TierKBG anstreben, das bovine Parvovirus als Prüfkeim aufzunehmen.

Ergebnisse, die an Modellanlagen gewonnen wurden, konnten durch Untersuchungen an Praxisanlagen bestätigt werden.

Es fällt sogar auf, daß bei Output-Untersuchungen an Praxisanlagen häufig niedrigere Werte festgestellt werden. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich im Größenverhältnis des Auslaufrohres zum Output-Volumen. Die Rekontamination durch verschmutzte Auslaufrohre erweist sich in diesen Größenverhältnissen als weniger gravierend, als dies an der Modellanlage der Fall ist. Möglicherweise liegt ein weiterer Grund darin, daß in der Praxis eine strenge Trennung von "reiner" und "unreiner" Seite nicht nur gefordert, sondern auch gewährleistet ist.

Allerdings wurden Unterschiede in den Ergebnissen, die an Praxisanlagen gewonnen wurden und solchen aus Laborversuchen auch von anderen Autoren beschrieben, u.a. SOLDIERER (1991), PINKEPANK (1997), BRAUMILLER (2000), HOFERER (2000).

Es muß unter Praxisbedingungen mit einer erheblich größeren Schwankungsbreite an Ergebnissen gerechnet werden, da 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, TS, Alter von Gülle und Cosubstraten) (MARTENS et al., 2000).

4.10 Beurteilung der verwendeten Indikatororganismen

Salmonellen eignen sich gut als Prüforganismen. Ihre Handhabung ist wenig aufwendig und ihre Nachweisbarkeit eindeutig. Aufgrund ihrer seuchenhygienischen Relevanz und der vorstehenden Gründe wird ihre Beibehaltung als Prüforganismus befürwortet.

Um vor allem thermophile Vergärungsprozesse mit Indikatororganismen überprüfen zu können sollten jedoch auch thermostabilere Keime hinzugezogen werden, nicht *jedoch Clostridium perfringens*, der sich zwar als äußerst thermostabil erwies und auch unter größtem Aufwand, die Hygienisierung betreffend, als nicht gänzlich inaktivierbar. Dieser Keim läßt aufgrund seiner schwankenden Ergebnisse keine klaren Aussagen bezüglich seiner Inaktivierung zu. Nativ ist außerdem stets mit variablem Vorkommen sowohl seiner versporteten Form, als auch vegetativer Keime zu rechnen. Desweiteren ist der Nachweis oft nicht eindeutig und die Handhabung der Keime im Labor mit erheblichem Aufwand verbunden.

Enterokokken erweisen sich gegenüber den Salmonellen als sehr stabil. Auch ihre Handhabung ist einfach, der Nachweis eindeutig, dies gilt in gleicher Weise für *E. coli*. Bezüglich der Seuchenrelevanz wird vorgeschlagen, diese Keime in Kombination zu verwenden.

GEWECKE und KÜNZEL (1989) empfahlen dies auch für die Bioabfallkompostierung.

Auch *Campylobacter jejuni* scheidet aufgrund der vorliegenden Untersuchungen als Indikatororganismus aus. Dieser Keim erweist sich als wenig stabil und wird nativ in Substraten nur bedingt nachgewiesen. Seine Inaktivierungskinetik kann in Untersuchungen wie den vorliegenden der von *Salmonella senftenberg* gleichgestellt werden. Der Arbeitsaufwand mit *Campylobacter jejuni* ist jedoch ungleich größer, der Nachweis bereitet Schwierigkeiten.

Aufgrund seiner Thermostabilität und seiner Seuchenrelevanz kann das bovine Parvovirus als geeigneter Maßstab für Behandlungsverfahren betrachtet werden, deren wesentliche Komponente in der thermischen Inaktivierung besteht. Der Nachweis seiner Inaktivierung über drei bis vier Zehnerpotenzen erlaubt den Rückschluß, daß mit einem hinreichend großen Sicherheitsspielraum alle relevanten Tierseuchenerreger und fast alle anderen Bakterien und Viren sicher inaktiviert worden sind (MARTENS et al., 2000).

Eine Inaktivierung von ≥ 4 Zehnerpotenzen wird von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft bei Desinfektionsmittelprüfungen zur Viruzidie als beweisend für eine ausreichende Desinfektionsmittelwirksamkeit angesehen (DVG, 1988).

BÖHM (2001) schlägt vor, das bovine Parvovirus als Prüforganismus mit aufzunehmen, wenn an einer Anlage eine Ausnahmegenehmigung gemäß § 8, Abs.2 TierKBG (1975) zur Mitverarbeitung von Großküchenabfällen o.ä. angestrebt wird. Durch die vorliegenden Untersuchungen wird dieser Vorschlag befürwortet.

4.11 Schlußfolgerungen

Grundsätzlich bietet die Kofermentation für verschiedene Substrate, die sich als Monosubstrate biologisch kaum verwerten lassen, die Möglichkeit, diese Stoffe einer Verwertung im Sinne des Kreislaufwirtschaftsgesetzes (KrW-/AbfG, 1994) zuzuführen und Produktkreisläufe ökologisch sinnvoll zu schließen (BRAUKMEIER & STEGMANN, 1999). Bei der anaeroben Vergärung wird netto erneuerbare Energie in Form von Biogas freigesetzt. Daraus läßt sich Strom und Wärme gewinnen. Aus einer Tonne Haushaltsabfall können rund 100 m³ Biogas erwartet werden, was rund 70 l Heizöl entspricht. Gleichzeitig entstehen aus dieser Tonne 350-400 kg anaerober Kompost (EDELMANN, 1995).

Ausgangstoffe aus einer Gäranlage müssen die gleichen Qualitätsansprüche erfüllen wie herkömmliche Komposte.

Ein durch landwirtschaftliche Verwertung von Endprodukten verursachter Ausbruch von Tierseuchen (z.B. Schweinepest, Maul- und Klauenseuche) muß ausgeschlossen sein (MARTENS et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden an den Modellanlagen Versuche im mesophilen (ca. 33 °C) und thermophilen (53-55 °C) Temperaturbereich durchgeführt. Bedingt durch die BioAbfV (1998) umfaßten Versuche im mesophilen Bereich Zeiträume über mindestens drei Wochen. Da gravierende Unterschiede in den Inaktivierungskinetiken der Indikatororganismen durch den Zusatz von 25 % Bioabfall, bzw. bei einer Kombination von 50 % Gülle und 50 % Bioabfall nicht erwartet werden konnten, wurde deshalb aus Zeitgründen im mesophilen Temperaturbereich auf verschiedene Substratkombinationen verzichtet. Im thermophilen Temperaturbereich wurde zunächst, um einen Überblick zu erhalten ein Versuchsdurchgang über 21 d untersucht. Bei diesem Durchgang wurde die Substratkombination 75 % Gülle und 25 % Speisereste beibehalten.

Da die BioAbfV (1998) für thermophil betriebene Anlagen eine Mindestaufenthaltszeit des Substrats von 24 h vorschreibt, wurden alle anschließenden Versuche im thermophilen Bereich über 24 h angesetzt. So war es möglich in dieser Versuchsvariante auch Substratkombinationen mit 50 % Gülle, 25 % Speiseresten und 25 % Bioabfällen bzw. mit 50 % Gülle und 50 % Bioabfällen einzusetzen.

Da während der Untersuchungen jedoch im thermophilen Temperaturbereich Hinweise erarbeitet wurden, die auf einen Einfluß der Bioabfälle auf die Inaktivierungskinetiken der verwendeten Indikatororganismen (besonders *Clostridium perfringens* und bovines Parvovirus) deuten, werden vergleichende Untersuchungen in zukünftigen Projekten als notwendig betrachtet.

Durch größere Bioabfall-Anteile bei Versuchen im thermophilen Temperaturbereich kam es aufgrund des dadurch steigenden Trockensubstanzgehaltes zu technischen Problemen.

Das Rührwerk der Modellanlage war nicht in der Lage, Anteile von mehr als 50 % Bioabfällen unter zu mischen. Bereits bei diesen Mengen kam es im August 2000 zu erheblichen Schwierigkeiten, die WEILAND (1999) für Vergärungsverfahren mit Trockensubstanzgehalten oberhalb 40 % beschreibt. Es treten hier durch den Wassermangel biologische Prozeßstörungen auf. An der Modellanlage wurde ein Austausch der mechanischen Elemente des Rührwerkes notwendig. Nach der Behebung der technischen Probleme wurde zum einen auf größere Bioabfallmengen verzichtet, zum anderen kam es dadurch auch, den Projektablauf betreffend, zu großen zeitlichen Verzögerungen.

Für trockenes, verholztes Material ist die anaerobe Vergärung ohnehin nicht geeignet, da der Holzbaustoff Lignin anaerob nicht abgebaut werden kann (EDELHANN, 1995).

Bezüglich der verwendeten Indikatororganismen wird folgendes festgehalten:

Die Beibehaltung von *Salmonella senftenberg* als Prüforganismus wird befürwortet. *Streptococcus faecium* sowie *E. coli* erweisen sich gegenüber den Salmonellen als sehr stabil. Bezüglich der Seuchenrelevanz wird vorgeschlagen, diese Keime in Kombination zu verwenden, wie GEWECKE und KÜNZEL (1989) dies für die Bioabfallkompostierung empfohlen. Auch BÖHM (1998) ist der Meinung, daß sich für die Beurteilung eines Hygienisierungsprozesses der Nachweis von Salmonellen als mikrobiologischer Parameter bisher am besten bewährt hat. Mit Einschränkungen befürwortet auch er die zusätzliche Verwendung von Fäkalstreptokokken und *E. coli*.

Das bovine Parvovirus sollte insbesondere als Prüfkeim herangezogen werden, wenn seitens der Anlagenbetreiber eine Ausnahmegenehmigung zur Verwendung von Großküchenabfällen gemäß § 8, Abs.2 TierKBG (1975) angestrebt wird.

Auch HOFERER (2000) betrachtete Fäkalstreptokokken und bovines Parvovirus als potentielle Indikatororganismen.

Eine Übernahme von *Campylobacter jejuni* und/oder *Clostridium perfringens* als Indikatororganismen wird abgelehnt. Beide Keimarten erweisen sich als aufwendig in der

Handhabung, es werden hohe Ansprüche an Ausrüstung und Technik gestellt und die Ergebnisse sind wenig eindeutig und aussagekräftig.

Da der Begriff „seuchenhygienisch unbedenkliche“ Gülle nach Strauch (1991) nicht eindeutig definiert ist, gilt als „behandelte“ Gülle eine solche, die nach einer Behandlung mit einem geeigneten Verfahren nicht mehr als 10^3 Enterobacteriaceen pro ml bzw. g und keine Salmonellen in einem Gramm aufweist. Diese Forderung (keine Salmonellen in 50 g) wird durch die BioAbfV (ANONYM, 1998) für Endprodukte aus der Kofermentation übernommen.

Es wird deshalb die Forderung der BioAbfV (ANONYM, 1998), die durch die "Hinweise zur Durchführung der Bioabfall-Verordnung" (2000), die sog. „Kleinanlagenregelung“ konkretisiert wurden, vertreten. Nachstehend wird in Tabelle 33 der Vorschlag für erweiterte mikrobiologische Untersuchungen der Gärreste daraus zitiert:

Tab. 31: Vorschlag für eine erweiterte mikrobiologische Untersuchung des Gärrestes bei Anlagen ohne direkte Prozeßprüfung ("Input- / Outputkontrollen")

Art der Anlage	Gesamtbakterienzahl bei 37° C Richtwerte	" <i>E. coli</i> " (fäkalcoliforme Bakterien) Richtwerte	Enterokokken Richtwerte
Anaerobbehandlung (Vergärung)	$\leq 5 \times 10^8$ KBE/g	$\leq 5 \times 10^3$ KBE/g	$\leq 5 \times 10^3$ KBE/g

Durch den Rat der europäischen Union (ANONYM, 2001) wird für Fermentationsrückstände und Kompost die Forderung gestellt, daß in 25 g keine Salmonellen gefunden werden dürfen, gleichzeitig dürfen 300 Enterobacteriaceen in 1 g auftreten. BÖHM (2001) hält diese Forderungen für Salmonellen für bedenklich, für Enterobacteriaceen für nicht einhaltbar. Diese Meinung wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

Die hier geschilderten Ergebnisse beweisen, wie erwartet, einen grundsätzlich mikrobiziden und viruziden Effekt anaerober Vergärungsverfahren.

Für Praxisanlagen sind neben den beschriebenen direkten auch indirekte Prozeßprüfungen vorgeschrieben. Eine alleinige Endproduktkontrolle ist nicht ausreichend. Indirekte Prozeßprüfungen beinhalten Temperaturmessungen durch automatische Temperaturschreiber möglichst kontinuierlich, mindestens jedoch einmal arbeitstäglich. Die Messungen sollen an mindestens drei repräsentativen Zonen des Gärgutes in den für die thermische Inaktivierung relevanten Anlagenteilen erfolgen. Der Temperaturverlauf und die Beschickungsintervalle der Anlage sind fortlaufend und prüffähig aufzuzeichnen. Sie müssen mindestens fünf Jahre aufbewahrt und Überwachungsbehörden auf Anfrage vorgelegt werden (MARTENS et al., 2000).

5 Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen sollten Antworten gefunden werden auf die Fragen, inwieweit der Prozeß der anaeroben Kofermentation im mesophilen (33 °C) und im thermophilen (53-55 °C) Temperaturbereich zu einer Inaktivierung verschiedener seuchenhygienisch relevanter Bakterien und Viren bzw. entsprechender Indikatororganismen führt.

Es sollten verschiedene Substratkombinationen (Rindergülle:Speisereste 3:1; Rindergülle:Speisereste:Bioabfälle 2:1:1; Rindergülle:Bioabfälle 1:1) in der anaeroben Vergärung eingesetzt und ihr Einfluß auf eine Inaktivierung oder auch Stabilisierung der Indikatororganismen *Salmonella senftenberg*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecium*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* und bovines Parvovirus untersucht werden.

Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die, in diesem Zusammenhang noch wenig erforschten Keime *Clostridium perfringens* und *Campylobacter jejuni*, gerichtet werden.

Zur Bearbeitung dieser Fragen wurden Versuche mit Indikatororganismen zunächst an den halbtechnischen Modellanlagen, später auch an zwei großtechnischen Praxisanlagen durchgeführt.

Es wurden sowohl Input/Outputprüfungen, als auch Tenazitätsuntersuchungen mit Prüfkörpersystemen (Volumenprüfkörper für Bakterien, Sandwichkeimträger für Viren) vorgenommen.

Die verwendeten Prüfkörpersysteme eignen sich gut zur Überwachung und Prüfung anaerober Kofermentationsverfahren. Auch an großtechnischen Praxisanlagen können Vorrichtungen angebracht werden, die eine Versuchsdurchführung erlauben.

Die Beibehaltung von *Salmonella senftenberg* als Prüforganismus wird befürwortet. *Streptococcus faecium* sowie *E. coli* erweisen sich gegenüber den Salmonellen als sehr stabil. Bezüglich der Seuchenrelevanz wird vorgeschlagen.

Das bovine Parvovirus sollte insbesondere als Prüfkeim herangezogen werden, wenn seitens der Anlagenbetreiber eine Ausnahmegenehmigung gemäß § 8, Abs. 2 TierKBG (1975) zur Verwendung von Großküchenabfällen angestrebt wird.

Auch HOFERER (2000) betrachtete Fäkalstreptokokken und bovines Parvovirus als potentielle Indikatororganismen.

Eine Übernahme von *Campylobacter jejuni* und/oder *Clostridium perfringens* als Indikatororganismen wird abgelehnt. Beide Keimarten erweisen sich als aufwendig in der Handhabung, es werden hohe Ansprüche an Ausrüstung und Technik gestellt und die Ergebnisse sind wenig eindeutig und aussagekräftig.

Die mesophile Vergärung allein ermöglicht eine sichere Inaktivierung von *Salmonella senftenberg* und *Campylobacter jejuni*.

Streptococcus faecium und *E. coli* können durch Pasteurisierung in Kombination mit mesophiler Vergärung um sechs bis acht Zehnerpotenzen reduziert werden, bovines Parvovirus um fünf. *Clostridium perfringens* läßt sich bei keiner Versuchsvariante sicher inaktivieren, auch nicht wenn bei der Erhitzung Temperaturen von 90 °C herrschen.

Sowohl durch Vor- als auch durch Nachpasteurisierung können Prozesse mit mesophiler Vergärung hygienisch unbedenkliche Produkte hervorbringen.

Im Hinblick auf die Eliminierung der Keime sollte jedoch der Vorpasteurisierung der Vorzug gegeben werden, da eine anschließende Gärung zu einer weiteren Titerreduktion führt (LEUZE, 1984).

In thermophilen Vergärungsprozessen können *Salmonella senftenberg*, *E. coli* und *Campylobacter jejuni* nach 24 Stunden sicher inaktiviert werden.

Streptococcus faecium wird nach 24 Stunden um drei, spätestens nach 7 Tagen um sieben Zehnerpotenzen reduziert. Dies genügt dem Entwurf über "Hinweise zur Durchführung der Bioabfall-Verordnung" (2000). Bovines Parvovirus kann nach 24 Stunden um drei bis sieben Zehnerpotenzen reduziert werden.

Bei *Clostridium perfringens* ändern sich die Keimzahlen gegenüber den mesophilen Verfahren nicht wesentlich.

Auffällig bleibt jedoch, daß bei *Clostridium perfringens* der Zusatz von Bioabfällen zum Beschickungsmaterial einen positiven Einfluß auf die Inaktivierung dieser Keime besitzt, die D-Werte werden deutlich niedriger.

Die beiden beprobten Praxisanlagen lassen keine Zweifel über die Funktionsfähigkeit des Prozesses zu.

Die indirekte Prozeßprüfung durch möglichst kontinuierliche Temperaturlaufzeichnungen an mindestens drei repräsentativen Zonen des Gärgutes wie sie bereits durch die BioAbfV (ANONYM, 1998) verankert ist wird für Praxisanlagen als sinnvoll und notwendig betrachtet.

Insgesamt bleibt die Aussage, daß biotechnologische Verfahren nur ein begrenztes keimabtötendes Verhalten aufweisen. Eine seuchenhygienische Unbedenklichkeit bedeutet in diesem Zusammenhang in der Regel nur eine weitgehende Freiheit von solchen Organismen, die eine den verwendeten Prüforganismen vergleichbare Widerstandsfähigkeit haben (BREITENFELDT, 1997).

Bei der Einhaltung bestimmter Rahmenbedingungen (Fermentertemperatur, Aufenthaltszeiten; Überwachungsstrategien) können nach jetzigem Kenntnisstand zu Untersuchungen in thermophilen Anaerobanlagen bzw. mesophilen Anlagen mit entsprechend vorgeschalteter Pasteurisierungsstufe zumindest "seuchenhygienisch unbedenkliche" Endprodukte erzielt werden (PHILIPP et al., 2000).

6 Literaturverzeichnis

ABINANTI, F. R., WARFIELD, M. S. (1961): Recovery of a Hemadsorbic Virus (Haden) from the Gastrointestinaltract of Calves. *Virology* **14**, 288-289

AMTSBERG, G., BISPING, W, KRABISCH, P. MATTHIESEN, I. (1977a): Zum Vorkommen und zur Bedeutung von *Clostridium perfringens* beim Kalb. 1. Mitt.: Quantitative bakteriologische Untersuchungen zum *Clostridium perfringens*-Keimgehalt in Kot und Darminhalt von gesunden und erkrankten Kälbern. *Zentralblatt Veterinärmed. Reihe B*, **24**, 104-113

ANONYM (1975): Gesetz über die Beseitigung von Tierkörpern, Tierkörperteilen und tierischen Erzeugnissen (Tierkörperbeseitigungsgesetz TierKBG). *Bundesgesetzblatt I* S. 2313, 2610

ANONYM (1994): Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Beseitigung von Abfällen (Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz KrW-/AbfG). *Bundesgesetzblatt I* Nr.66 vom 06.10.1994, zuletzt geändert am 03.05.2000, S. 2705

ANONYM (1997): Düngemittelverordnung (DüMV). *Bundesgesetzblatt I*, zuletzt geändert am 16.07.1997, S 1450

ANONYM (1998): Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung BioAbfV). *Bundesgesetzblatt I*, S 2955

ANONYM (1999): Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung BioStoffV). *Bundesgesetzblatt I* 1999, S. 50

ANONYM (2000): Endgültiger Entwurf der „Hinweise zum Vollzug der Bioabfallverordnung“. BMU-Referat WA II 4.

ANONYM (2001): Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte. *Rat der Europäischen Union*, 8880/1/01

BENDIXEN, H. J. (1994): Safeguards against Pathogens in Danish Biogas Plants. In: Wat. Sci. Tech. Vol. **30/12**, 171-180

BÖHM, R. (1993): Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, **100**, 275-278

BÖHM, R. (1995): Die Problematik der Festsetzung mikrobiologischer Grenz- und Richtwerte in der Umwelthygiene. In: Hohenheimer Umwelttagung **27**, 75-85

BÖHM, R. (1998): Die Bewertung von mesophilen und thermophilen Kofermentationsanlagen aus der Sicht der Hygiene. In: MÄRKEL, H., STEGMANN, R., DECHEMA e. V. (Hrsg.): Technik anaerober Prozesse. Beiträge einer Veranstaltung des Sonderforschungsbereiches 238 der DFG an der Technischen Universität Hamburg-Harburg in Zusammenarbeit mit dem Forschungsausschuß Biotechnologie der DECHEMA e. V., 215-230

BÖHM, R. (2001): persönliche Mitteilung

BÖHNEL, H., LUBE, K. (2000): *Clostridium botulinum* and Bio-compost: A Contribution to the Analysis of Potential Health Hazards Caused by Bio-waste Recycling. J. Vet. Med. B **47**, 785-795

BRAUKMEIER, J., STEGMANN, R. (1998): Kovergärung von Bioabfällen mit landwirtschaftlichen Abfällen bzw. Klärschlämmen. In: WIEMER, K., KERN, M. (Hrsg.): Bio- und Restabfallbehandlung II, M.I.C.-Baeza-Verlag, Witzenhausen, 471-483

BRAUMILLER, P. (2000): Aerobe und anaerobe Behandlung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft unter den Aspekten der Seuchenhygiene. Teil B: Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikator-Bakterien und -Viren im Kompostierungsprozess. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben HS 059, Inst. f. Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim

BRÄUNINGER, S., FISCHER, I., PETERS, J. (1994): Zur Temperaturstabilität des bovinen Parvovirus. Zbl. Hyg., **196**, 270-278

BREER, C., HESS, E., KELLER, U. (1979): Soll Klärschlamm vor oder nach dem Ausfaulen pasteurisiert werden? Gas-Wasser-Abwasser **59**, 323-328

BREITENFELDT, P., MARTENS, W., PHILIPP, W. (1997): 2. Human-/Veterinärhygiene der Bioabfallkompostierung. Teilbereich I „Substrathygienische Untersuchungen“. In: Förderschwerpunkt Bioabfallverwertung: Hygiene der Bioabfallverwertung. Bundesstiftung Umwelt, Zeller Verlag Osnabrück, Initiativen zum Umweltschutz; Bd. **9**, 62-88

BRODSKY, M. H., CIEBIN, B. W. (1979): Effect of heat treatment on the performance of tryptose-sulfit-cycloserine-agar for enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. **37** (5), 1038-1040

BUSSE, M. (1985): Enterobacteriaceen als Indikatorkeime für Lebensmittel – Eine kritische Betrachtung. Forum Mikrobiologie **8**, 92-99

BUTZLER, J.-P. (1984): Campylobacter Infection in Man and Animals. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V. (DVG) (1988): Richtlinien für die Überprüfung chemischer Desinfektionsmittel in der Veterinärmedizin. 2. Auflage, DVG Gießen, Germany

DÖLL, W., SCHMIDT, H. (1969): Die Keimausbeute von Clostridien auf selektiven und nicht-selektiven Anaerobier-Nährböden, dargestellt an Reinkulturen von verschiedenen Clostridien-Species. Zentralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Originale, Bd. **212**, 109-114

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

EDELMANN, W. (1995): Integration der Anaerobtechnik in Gesamtkonzepte der biologischen Abfallbehandlung. In: Biologische Abfallbehandlung II. Kompostierung – Anaerobtechnik – Kalte Vorbehandlung – Klärschlammverwertung. WIEMER, K., KERN, M. (Hrsg.) Witzenhausen: K. Wiemer, M. Kern, 1995 (Abfall-Wirtschaft. Neues aus Forschung und Praxis), 541-569

EL SUKHON, S. N. (1974): Vorkommen und Bedeutung von *Clostridium perfringens* beim Schwein in Nordwestdeutschland. Vet. med. Diss. TiHo Hannover

EISGRUBER, H. (1986): Prüfung von Verfahren zur Kultivierung und Schnelldifferenzierung von Clostridien aus frischem Fleisch sowie aus anderen Lebensmitteln. Vet. med. Diss. Univ. Berlin

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

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

GRUNWALD, R. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zur gemeinsamen anaeroben Fermentation von Gülle und Speiseabfällen in Biogasanlagen. Dipl.-Arbeit, Universität Hohenheim, Inst. für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik

HAAS, B., AHL, R., BÖHM, R., STRAUCH, D. (1995): Inactivation of virus in Liquid Manure. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **14**, 435-445

HOFERER, M. (2000): Aerobe und anaerobe Behandlung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft unter den Aspekten der Seuchenhygiene. Teil C: Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikator-Bakterien und-Viren im Anaerob-Prozeß. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben HS 059, Inst. f. Umwelt-und Tierhygiene, Universität Hohenheim

KÄßMEYER, P. (1999): Bioenergie Schwaben GmbH, Vergärungstechnik auf dem neuesten Stand. In: Biologische Abfallbehandlung. Erste Erfahrungen mit der Bioabfall-Verordnung in Deutschland. 7. Hohenheimer Seminar, **Bd. I**, 193-200

KAERBER, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naumyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., **162**, 380

KNOLL, K.-H. (1986): Bewertung der Kompostierung von Abfällen in hygienischer Hinsicht. In: HÖSEL-SCHENKEL-FUHRER: Müllhandbuch. Kennzahl 5075, Lieferung **2/86**, Erich Schmidt Verlag, Berlin

KÖHLER, W., SCHACHTEL, G., VOLSKE, P. (1996): Biostatistik. Springer Verlag Frankfurt, 2. Auflage

KÜBLER, H. (1994): Ist die aerobe Abfallkompostierung ökologisch zweite Wahl? Müll und Abfall Nr. 2, 70-73

LEUZE, M., (1984): Hygienische Untersuchungen über das Verhalten von Viren bei der 2-stufigen anaeroben Klärschlammstabilisierung. Vet.-Med. Diss., Gießen

LUND, B., JENSEN, V. F., HAVE, P., AHRING, B. (1996): Inactivation of virus in anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas plants. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**, 25-31

MAHNEL, H. (1979): Resistenzunterschiede zwischen Viren verschiedener Gruppen gegenüber einigen chemisch-physikalischen Dekontaminationsverfahren. *Infection* **7**, 240-246

MARTENS, W., PHILIPP, W. BÖHM, R. (2000): Seuchenhygienische Bewertung von Anaerobverfahren unter besonderer Berücksichtigung der landwirtschaftlichen Kofermentation. In: WIEMER, K., KERN, M. (Hrsg.): Bio-und Restabfallbehandlung IV, biologisch-mechanisch-thermisch, Druckhaus Göttingen, Witzenhausen-Institut für Abfall, Umwelt und Energie GmbH Witzenhausen, 471-483

DE MAN, J. C. (1983): MPN-Tables, Corrected. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 301-305

NISHIDA, S., SEO, N., NAKAGAWA, M. (1969): Sporulation, heat resistance and biological properties of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **17**, 303-309

OECHSNER, H: (1991): Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Entseuchung von Flüssigmist durch aerob- thermophile Stabilisierung. Agr. Wiss. Diss., Univ. Hohenheim

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 non aerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(1)**, 92-97

PHILIPP, W., BÖHM, R. (1997): Hygieneanforderungen an Verfahren der Bioabfallvergärung. In: WIEMER, K., KERN, M.(Hrsg.): Bio- und Restabfallbehandlung. M. I. C.-Baeza- Verlag, Witzenhausen, 313-344

PHILIPP, W., KUHN, E. (1998): Hygiene und Umweltaspekte. In: Kofermentation. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (Hrsg.), Bartningstraße 49, 64289 Darmstadt, 29-40

PHILIPP, W., MARTENS, W., STRAUCH, D. (2000): Hygienische Anforderungen in der biologischen Abfallbehandlung. In: Biotechnologie in der Abfallwirtschaft. CD-Rom der Bauhaus-Universität, Weimar

PHILIPP, W. (2001): persönliche Mitteilung

PLYM-FORSELL, L. (1983): Survival of Salmonella bacteria and Ascaris suum eggs in a thermophilic biogas plant. In: STRAUCH, D. (Ed.): „Hygienic problems of animal manures“. Proc. of a joint workshop of expert groups of the commission of the European Communities, German Veterinary Medical Society (DVG) and Food and Agriculture Organization (FAO), Institute of Animal Medicine and Animal Hygiene, Univ. Hohenheim, 35-44

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

REY, C. R., WALKER, H. W., ROHRBAUGH, P. I. (1975): The influence of temperature on growth, sporulation and heat resistance of spores of six strains of *Clostridium perfringens*. J. Milk Food techn. **38**, 461-465

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

RÜCKERT, V. (1991): Mikrobiologische Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Flüssigmistbehandlung. Agr. Wiss. Diss., Univ. Hohenheim

SAIER, M. (1987): Untersuchungen zum Verhalten human-und tierpathogener thermostabiler Viren bei der Pasteurisierung von Klärschlamm. Agr. Wiss. Diss., Univ. Hohenheim

SCHLEGEL, H. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. Gustav Thieme Verlag, Stuttgart

SCHNEPEL, C. (1997): Hygienische Aspekte bei der getrennten Abfallsammlung. In: THOME-KOZMIENSKY, K. J., SCHERER, P. A. (Hrsg.): Getrennte Wertstoffeffassung und Biokompostierung. EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik GmbH, Berlin, 135-161

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

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., Univ. Gießen

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

STELZER, W., JAKOB, J., SCHULZE, E., MOCHMANN, H. (1991): Untersuchungen zum Vorkommen und Überleben von *Campylobacter* im Klärschlamm. Zentralbl. Mikrobiol. **146**, 17-23

STOCKINGER, H. (1985): Die vergleichende experimentelle Prüfung verschiedener Desinfektionsmittel auf Sporozidie im Modellversuch mit Sporen pathogener und apathogener Clostridienarten. Vet. med. Diss. Univ. Gießen

STRAUCH, D. (1991): Survival of Pathogenic Microorganisms and Parasites in Excreta, Manure and Sewage Sludge. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **10**, 813-846

STRAUCH, D., MENKE, G. (1992): Die Relevanz der Hygienes Diskussion bei der Sammlung und Kompostierung von Bioabfällen. In: WIEMER, K., KERN, M. (Hrsg.): Gütesicherung und Vermarktung von Bioabfallkompost, M.I.C.-Baeza-Verlag, Witzenhausen, Abfall-Wirtschaft; **9**, 259-285

STRAUCH, D. (1991): Wirtschaftsdünger als Vektor für Infektionserreger. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **98**, 265-268

STRAUCH, D., BALLARINI, G. (1994): Hygienic Aspects of the Production and Agricultural Use of Animal Wastes. Z. Vet. Med. B. **41**, 176-228

STRAUCH, D. (1997): Hygieneaspekte bei der Nutzung landwirtschaftlicher Biogasanlagen zur Kofermentation (Teil I) Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, **1**, 61-69

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

WEILAND, P. (1997): Potentiale und Vorschriften bei der Cofermentation. In: Tagungsband der sechsten Biogastagung an der Bauernschule Hohenlohe, 7.-10. Januar 1997, 74592 Kirchberg an der Jagst- Weckelweiler

WEILAND, P. (1999): Übersicht über angewendete Anaerobverfahren zur biologischen Abfallbehandlung. In: Biologische Abfallbehandlung. Erste Erfahrungen mit der Bioabfall-Verordnung in Deutschland. 7. Hohenheimer Seminar, **Bd. 1**, 83-94

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

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

WILSON, W.J., BLAIR, E. M. (1924): The application of a sulphite-glucose-iron-agar medium to the quantitative extinction of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. J. Path. Bact. **27**, 119

7 Anhang

7.1 Puffer und Lösungen

Alle Standardchemikalien wurden von der Fa. Merck, D-64271 Darmstadt bezogen.

◆ Versen-Trypsin-Lösung

(pH-Wert: 7,0)

▶ NaCl	80,00 g
▶ KCl	2,00 g
▶ KH ₂ PO ₄	2,00 g
▶ Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	23,10 g
▶ MgSO ₄ x7H ₂ O	1,00 g
▶ CaCl ₂ x2H ₂ O	1,32 g
▶ Trypsin 1:250 ⁶⁵	12,50 g
▶ Versen (Titriplex III) ⁶⁶	12,50 g
▶ Streptomycin Sulfat	0,50 g
▶ Penicillin G	0,50 g
▶ Aqua dest.	ad 1000,00 ml

der pH-Wert wird mit 1 M NaOH eingestellt

◆ Phosphate-buffered- saline (PBS)

pH-Wert: 7,5

▶ NaCl	8,00 g
▶ KCL	0,20 g
▶ H ₂ PO ₄	0,12 g
▶ Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	0,91 g
▶ Aqua dest.	ad 1000,00 ml

⁶⁵ BECTON DICKINSON Deutschland GmbH, ehemals DIFCO, D-69006 Heidelberg, Art.Nr. 0152-15-9

⁶⁶ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr.1.08418.0100

der pH-Wert wird mit 1 M NaOH eingestellt

◆ **Beef-Extrakt-Lösung**

pH-Wert: 8,5

▶ 4 % Fleischextrakt, trocken granuliert⁶⁷

▶ 0,5 M NaCl

der pH-Wert wird mit 1 M NaOH eingestellt

◆ **Phosphat/Beladungs-Puffer**

pH-Wert: 6,0

▶ KH_2PO_4 : 9,073 g/l

88,9 Teile

▶ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 11,87 g/l

11,1 Teile

⁶⁷ Merck, D-64271 Darmstadt, Art. Nr. 1.03979.0500

7.2 Abkürzungen

Aqua dest	destilliertes Wasser
BA	Bioabfälle (aus der braunen bzw. grünen Tonne)
BPV	Bovines Parvovirus
Camp	<i>Campylobacter jejuni</i>
Clost	<i>Clostridium perfringens</i>
cPE	cytopathischer Effekt
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische E.coli
FKS	<i>Streptococcus faecium</i>
G	Rindergülle
Gemisch	Substrat einer Praxisanlage (nicht näher zu bestimmen)
IN	unbehandelter Input einer Biogasanlage
KBE	Koloniebildende Einheiten
KID ₅₀	Dosis, die 50% der Kultur infiziert
KT	Keimträger = Prüfkörper
KT	Keimträger, bezeichnet 1-3, entspricht den Parallelen
meso	mesophile Behandlung bei 33-35 °C
mR/oR	mit bzw. ohne Rampe (=Aufheizphase beim Pasteurisieren)
n.n.	nicht (mehr) nachweisbar
NP	Nachpasteurisierung
OUT	behandelter Output einer Biogasanlage
past	Erhitzung des Substrates auf 70 bzw. 90 °C für eine Stunde
PC-Folie	Polycarbonat-Folie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
pos	qualitativ nachweisbar (aber nicht zählbar)
PW	Preßwasser, flüssige Outputphase bei Praxisanlagen
Salm	<i>Salmonella senftenberg</i>
SR	Speisereste und Großküchenabfälle
thermo	thermophile Behandlung bei 53-55 °C
VP	Vorpasteurisierung
WB	Wasserbad (=Laborversuch)

Teil 2 B:

Lufthygienische Untersuchungen in einer Praxisanlage mit Feststoffseparierung („Biogasanlage B“)

von

Dipl.-Ing. agr. Renate Haumacher

Dr. W. Philipp

Dr. W. Martens

Prof. Dr. R. Böhm

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Bioaerosole	2
2.2	Luftgetragene Mikroorganismen	3
2.2.1	Bakterien	3
2.2.1.1	Anaerobe Sporenbildner	4
2.2.1.1.1	<i>Clostridium perfringens</i>	4
2.2.2	Schimmelpilze	4
2.2.2.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5
2.2.3	Thermophile Aktinomycceten	5
2.3	Keimquellen und Keimemissionen in Abfallbehandlungsanlagen	6
2.4	Luftkeimgehalte in verschiedenen Bereichen	7
2.5	Verfahren zum Nachweis luftgetragener Mikroorganismen in der Luft	8
3	Material und Methoden	9
3.1	Beschreibung der Biogasanlage „B“	9
3.2	Beschreibung der Meßorte	9
3.3	Beschreibung der Meßmethode	11
3.3.1	Verwendete Luftkeimsammelgeräte	11
3.3.1.1	MD-8-Sammelkopf	11
3.3.1.2	PGP-Sammler	11
3.3.2	Aufarbeitung der Proben im Labor	12
3.3.3	Meßwertermittlung	14
4	Ergebnisse	15
5	Diskussion	25
6	Schlußfolgerungen	30
7	Zusammenfassung	31
8	Literaturverzeichnis	32
	Anhang	

1 Einleitung

Die biologische Abfallbehandlung hat in den letzten Jahren eine breite Anwendung erfahren. Dabei werden für die natürlich vorkommenden Mikroorganismen Lebensbedingungen geschaffen, bei denen sie ihre Stoffwechsellleistungen effizient erbringen. Neben dem Vorteil, daß Nährstoffe wieder in einen natürlichen Stoffkreislauf zurückgeführt werden, kann die zielgerichtete Tätigkeit aber auch die Freisetzung von Mikroorganismen in das direkte Umfeld bedeuten. Deshalb ist in der Umgebungsluft biologischer Abfallbehandlungsanlagen mit einer erhöhten Belastung von Staub, Gerüchen und Mikroorganismen zu rechnen. Diese werden aus den verschiedenen Anlagenbereichen, je nach Wetterlage, Jahreszeit und Beschaffenheit des In- und Outputmaterials, freigesetzt und in weite Entfernungen verfrachtet.

Inzwischen liegen zahlreiche Untersuchungen zur Emission von Mikroorganismen aus Abfallbehandlungsanlagen vor (BRITZIUS, 1982; GÖTTLICH et al., 1994; SCHMIDT, 1994; PFIRRMANN, 1994; SIGSGAARD et al., 1994; SCHAPPLER-SCHEELE, 1996; BÖHM et al., 1996; DANNENBERG et al., 1998). Insbesondere im Bereich der Kompostierung wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Daten erhoben (FACK & PHILIPP 1994; KUTZNER & KEMPF, 1994; BÖHM et al., 1997; FACK, 1998; GERBL-RIEGER et al., 1998; EIKMANN et al., 1999; GÖTTLICH et al., 1999; HOFMANN et al., 1999; KÜHNER et al., 2001). Dagegen sind nur sehr wenige Messungen zum Luftkeimgehalt in und in der Umgebung von Anaerobanlagen durchgeführt worden (GERBL-RIEGER et al., 1998 und BÖHM et al., 1999). Um nun diese beiden biotechnologischen Verfahren (Kompostierung, Vergärung) vergleichen und bewerten zu können, müssen noch grundlegende Daten zum Emissionsverhalten in diesen Anlagen erfaßt werden. Dabei sollen nach Möglichkeit Keime untersucht werden, die einerseits arbeitsmedizinisch relevant und andererseits repräsentativ für Anaerobanlagen sind.

Ziel dieser Untersuchungen war die Erfassung der Keimgehalte in der Umgebungsluft verschiedener Funktionsbereiche in einer Anaerobanlage mit Feststoffseparierung, um prüfen zu können, ob sich Unterschiede zur Emissionssituation im Vergleich zu Kompostierungsanlagen ergeben, die vom Substrat und von der Jahreszeit abhängen.

2 Literatur

2.1 Bioaerosole

Als Bioaerosole werden luftgetragene Partikel mit wesentlichen Anteilen von Stoffen menschlicher, tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft bezeichnet (BÖHM, 1998). Bioaerosole stellen nach SCHAPPLER-SCHEELE & MISSEL (1999) eine in der Luft befindliche Mischung feinst verteilter, fester oder flüssiger Partikel dar. Sie enthalten Bakterien, Pilze, Algen, Viren, Zellbestandteile und/oder mikrobielle Produkte wie Endotoxine, Mykotoxine und Glukane. Bedingt durch ihr geringes Eigengewicht sind Bioaerosole bzw. ihre Bestandteile, oftmals noch in weiter Entfernung von ihrem Freisetzungsort nachweisbar (EIKMANN & HOFMANN, 1999).

Generell ist die Luft aufgrund des geringen Nährstoffangebotes sowie der geringen Feuchte nicht als Lebensraum für die Mikroorganismen geeignet. Spezielle Keime können jedoch durch die Ausbildung von resistenteren Lebensformen (Sporen) längere Zeit in der Luft überdauern. Ihnen dient die Luft als Medium des Transportes von Nährboden zu Nährboden (KÜHNER et al., 2001).

In Abfallbehandlungsanlagen können nach BÖHM et al. (1998) folgende Komponenten in Bioaerosolen auftreten:

- Bakterien
 - Endotoxine
 - Exotoxine
 - Enzyme und andere Stoffwechselprodukte
- Pilze
 - Glucane
 - Mykotoxine
 - Enzyme und andere Stoffwechselprodukte
- Viren.

Bestandteile gesundheitsgefährdender Aerosole beim Umgang mit Bioabfall sind nach STALDER (1993):

- pathogene Bakterien (z. B. Salmonellen)
- Schimmelpilze (z. B. *Aspergillus fumigatus*)
- Aktinomyzeten (z. B. *Saccharopolyspora rectivirgula*).

Grundsätzlich können Mikroorganismen in der Luft auch als Einzelkeime vorliegen. Meist sind sie aber an Staubpartikel gebunden oder sie bilden Keimaggregate. Bakterien tendieren in ihrer natürlichen Umgebung wie in Wasser, Boden oder auf lebenden und toten Geweben dazu, in Kolonien zu wachsen. Dementsprechend erscheinen sie auch im Aerosol meist als Aggregate oder Mikrokolonien, die an andere Materialien gebunden sind. Im Aerosolzustand können sie als vegetative Zellen und als Sporen vorliegen. Dabei ist bei den verschiedenen Keimarten von unterschiedlichen Größenverteilungen auszugehen:

- Bakterien und Bakteriensporen umfassen einen weiten Größenbereich und sind zwischen 0,5 und 10 µm groß
- Pilzsporen sind 1 - 30 µm groß
- Viren haben eine durchschnittliche Größe von etwa 0,02 - 0,26 µm (BÖHM et al., 1998).

2.2 Luftgetragene Mikroorganismen

Die in der freien Natur vorkommenden aerogen verfrachteten Mikroorganismen reflektieren einen großen Teil von Keimen, die im Boden, im Wasser und in oder auf Lebewesen vorkommen. Es ist nicht möglich diese Mischung aus Bakterien, Pilzsporen und Viren einer einzelnen Meßtechnik und Analysenmethode zu erfassen. Es liegt deshalb nahe, sich bei den Untersuchungen von Umweltproben auf sogenannte Indikatororganismen zu beschränken (FACK, 1998).

Eine systematische Untersuchung über die Eignung bestimmter Kulturmedien und Kulturbedingungen für die Erfassung gesundheitlich relevanter Mikroorganismen bzw. Indikatororganismen steht für den Bereich der Abfallwirtschaft noch aus. Speziell im Bereich des Arbeitsschutzes gibt es Bestrebungen zu standardisierten Verfahren (Richtlinien), die sich nach Inkrafttreten der Biostoffverordnung auf diese gründen (KÄMPFER et al., 1999). Zu diesem Zweck wurden die Technischen Regeln TRBA 430 (ANONYM, 2001a) und TRBA 405 (ANONYM, 2001b) entwickelt. Auch gibt es derzeit keine arbeitsmedizinisch-epidemiologisch begründeten Grenzwerte für Bioaerosole in der Luft am Arbeitsplatz. Es liegen jedoch Empfehlungen für Konzentrationsbereiche luftgetragener biologischer Agenzien am Arbeitsplatz vor (ANONYM, 1994; ANONYM, 1995, ANONYM, 1997). Mit der Veröffentlichung der TRBA 211 (ANONYM, 2001c) gilt erstmals ein Technischer Kontrollwert (TKW) bei der Überprüfung der Funktion und Wirksamkeit von technischen Schutzmaßnahmen in biologischen Abfallbehandlungsanlagen. Dieser TKW ist festgelegt auf $5,0 \times 10^4$ KBE/m³ Atemluft als Summenwert für mesophile Schimmelpilze und gilt nur in Sortierkabinen, Kabinen und Steuerständen. Für Bakterien bzw. spezifische Krankheitserreger gibt es keine Richtwerte, Technischen Kontrollwerte.

2.2.1 Bakterien

Mit der Gesamtbakterienzahl werden alle in einem bestimmten Temperaturbereich auf einem Standardnährboden mit Fungizidzusatz wachsenden Bakterien erfaßt. In der Regel liegt der zur Anzucht gewählte Temperaturbereich bei 37 °C (BÖHM et al., 1998). Nahezu bei allen Luftkeimmessungen wurde die Gesamtbakterienzahl, in der Literatur meist als Gesamtkeimzahl bezeichnet, bestimmt (MARTENS et al., 1998). Sie gibt nach BÖHM et al. (1999) einen ersten Überblick über die hygienische Situation an der Meßstelle.

2.2.1.1 Anaerobe Sporenbildner

Zu den anaeroben, grampositiven, sporenbildenden Stäbchenbakterien zählen Clostridien. Sie gehören zu den normalen Darmbewohnern, sind aber auch als Gärungs- und Fäulniserreger im Freiland weit verbreitet (PULVERER, 1993). Der Erdboden ist ihr natürlicher Lebensraum. Sie kommen in allen Böden der Welt vor, in großer Zahl im Kulturboden, geringer Zahl im Wüstensand. Sie sind in den oberflächlichen Bodenschichten am Abbau der organischen Materie beteiligt (ROLLE & MAYR, 1993). Auch im Meer- und Seewasser, Staub und an der Kleidung sind sie zu finden (SCHALLEHN, 1994).

Einige dieser Clostridien rufen beim Menschen schwere Infektionen bzw. Intoxikationen hervor wie Gasbrand, Wundstarrkrampf und Botulismus (PULVERER, 1993). Die Gattung *Clostridium* umfaßt 82 Arten. Die pathogenen Clostridien bilden die stärksten überhaupt bekannten biologischen Gifte (ROLLE & MAYR, 1993).

2.2.1.1.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens ist ein unbewegliches, bekapseltes, sporenbildendes, grampositives Stäbchenbakterium, das ovale Sporen in subterminaler Lagerung ohne Auftreibung des Zelleibes bildet (HOF, 2000). Die Sporen können in der Außenwelt sehr lange überleben (PULVERER, 1993). Die Sporenresistenz der einzelnen Stämme gegen strömenden Wasserdampf ist unterschiedlich, sie kann einige Minuten bis zu 4 Stunden betragen. Differenziert werden die Stämme nach ihren Toxintypen, bekannt sind 13 Toxine (ROLLE & MAYR, 1993). Es werden fünf verschiedene *Clostridium perfringens*-Typen unterschieden: Typ A, B, C, D und E, die vor allem Erkrankungen bei Tieren hervorrufen, zwei Typen sind auch für den Menschen von Bedeutung: Typ A als Erreger des Gasbrandes und von Nahrungsmittelvergiftungen und Typ C als Erreger von nekrotischer Enteritis (SCHALLEHN, 1994).

2.2.2 Schimmelpilze

Der Begriff Schimmelpilze läßt sich nicht genau definieren und abgrenzen, was seine Ursache darin hat, daß er aus der mikrobiologischen Praxis stammt (REISS, 1986). Nach MEINHOF und MÜLLER (1992) werden als Schimmelpilze im allgemeinen Mikromyzeten bezeichnet, die mit den Massen ihres Luftmyzels und der an ihm gebildeten Sporen mehr oder weniger offensichtlich organische Materie besiedeln, die dann als verschimmelt bezeichnet werden kann. Die Identifizierung der Schimmelpilze erfolgt allein aufgrund morphologischer Kriterien, biochemische Reaktionen stehen nicht zur Verfügung (SEELIGER & SCHÜTT-GEROWITT, 1994). Schimmelpilze sind überwiegend ubiquitär und in erster Linie im Erdboden zu finden (REISS, 1986). Es gibt kaum einen Standort im Bereich der Erdoberfläche, an dem Arten von *Aspergillus* und *Penicillium* nicht anzutreffen sind (ROLLE & MAYR, 1993). Schimmelpilze wachsen in einem relativ weiten Temperaturbereich, vornehmlich zwischen 0 und 45 °C. Die Optimaltemperatur

beträgt bei der Mehrzahl der Mikromyceten 25 °C (GEDEK, 1980). Der optimale pH-Bereich liegt für Schimmelpilze bei 4,5 bis 6,5 (REISS, 1986).

Nur sehr wenige Arten aus der großen Gruppe der Schimmelpilze kommen als Krankheitserreger in Betracht. Sie gehören vor allem zur Gattung *Aspergillus* (SEELIGER & SCHÜTTGEROWITT, 1994). Seit langem sind Schimmelpilze als Ursache von Allergien des Respirationstraktes bekannt (STALDER, 1994). Über 80 Pilzgattungen und -arten sind mit einer klinisch relevanten Respirationsallergie assoziiert worden (HELBING et al., 1994). Die Mindestmenge an Pilzsporen, die eine allergische Reaktion auslöst, schwankt zwischen 100 und etwa 3.000 (REISS, 1986).

2.2.2.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus gehört zur Gruppe der thermotoleranten oder auch als fakultativ thermophil bezeichneten Pilze (GEDEK, 1980). *Aspergillus fumigatus* besitzt die Fähigkeit in einem Temperaturbereich von 12 bis 53 °C zu wachsen, wobei das optimale Wachstum bei ungefähr 40 °C erfolgt (JOSEPH, 1983). Nach REISS (1986) liegt der optimale pH-Wert für das Myzelwachstum bei 6 - 7. *Aspergillus fumigatus* wächst grün, später graugrün bis rauchgrau (MEINHOF, 1992). Die Sporen von *Aspergillus fumigatus* haben eine Größe von 2,5 - 3,5 µm (GEDEK, 1980). Unter ungünstigen Lebensbedingungen kann *Aspergillus fumigatus* Toxine produzieren (GRÜNER, 1995).

Aspergillus fumigatus ist an Umsetzungen von organischer Materie in der freien Natur (Kompostierung) beteiligt (GEDEK, 1980). Dort kann er bis zu 80 % der Gesamtpilzflora ausmachen (STAIB, 1980).

Aspergillus spp. sind seit Jahrzehnten bekannte Aeroallergene, die praktisch das ganze Jahr hindurch sowohl in der Atmosphäre wie auch innerhalb von Gebäuden nachgewiesen werden können (HELBING et al., 1994).

2.2.3 Thermophile Aktinomyzeten

Nach traditioneller Definition sind Aktinomyzeten –"Strahlenpilze"– grampositive Fadenbakterien, die dazu neigen, in verzweigten Geflechten zu wachsen. Ihre Ähnlichkeit mit echten Pilzen ist nur oberflächlich und beschränkt sich auf das myzeliale Wachstumsverhalten sowie auf die Fähigkeit vieler Arten, sich mit Hilfe von Dispersionssporen zu vermehren und zu verbreiten (SCHAAL, 1994).

Thermophile Aktinomyzeten vermehren sich nach KEMPF und KUTZNER (1994) besonders bei Selbsterwärmungsprozessen in Abfällen.

Nach STALDER (1994) stellen sie vor allem als Allergenquellen eine Gesundheitsgefährdung dar. Einige thermophile Aktinomyzeten können eine allergische Lungenerkrankung, die sog. „exogen-allergische Alveolitis“ (EAA) hervorrufen. Die Symptome ähneln denen verschiedener Grippe- und Lungeninfektionen, so daß die Erkrankung oft falsch diagnostiziert wird. Das akute

Stadium der Krankheit tritt bei sensibilisierten Personen jeweils wenige Stunden nach Exposition gegenüber Aerosolen mit hohen Aktinomycetenkeimgehalten in Form von Erkältungssymptomen, Fieberschüben und Atemnot auf; die chronische Erkrankung kann u. U. sogar zum Tod führen (KEMPF und KUTZNER, 1994). Thermophile Aktinomyceten werden v. a. in der Landwirtschaft bzw. bei der Verarbeitung von landwirtschaftlichen Produkten und im Bereich der Müllentsorgung nachgewiesen (KUTZNER und KEMPF, 1994; BÖHM et al., 1997; HAAS et al., 1999).

2.3 Keimquellen und Keimemissionen in Abfallbehandlungsanlagen

Nach EIKMANN et al. (1999) ist der Einsatz biotechnischer Verfahren zur Behandlung von organischen Abfällen immer mit einem mikrobiellen Umsatz des gesamten Materials verbunden. Dieser findet nach BÖHM et al. (1998) in Abfallbehandlungsanlagen in besonders konzentrierter Form statt. Sowohl organische Abfälle aus dem industriellen Bereich als auch solche, die aus Haushalt und Gewerbe stammen, enthalten Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten unterschiedlicher Art und in wechselnden Mengen, die geeignet sind, die Gesundheit von Mensch, Tier und Pflanze zu schädigen oder menschliche, tierische und pflanzliche Strukturen zu besiedeln bzw. die Umwelt zu belasten.

Das Artenspektrum der Mikroflora ist zunächst vom eingetragenen Sammelgut abhängig. Das Einbringen spezifischer pathogener Bakterien, z. B. mit Küchenabfällen oder etwa mit Material der persönlichen Hygiene oder mit Fäkalien von Haustieren, hängt darüber hinaus von der epidemiologischen Situation ab (STALDER, 1993).

Nach BÖHM (1998) ist im Bereich der Sammlung und Bearbeitung von Abfällen mit verschiedenen primären und sekundären Keimquellen zu rechnen. Als primäre Keimquellen gelten das Sammelgut und das Endprodukt (z. B. Kompost) als sekundäre Keimquellen fungieren der Mensch, Maschinen und die Abluft.

An Arbeitsplätzen in der Abfallwirtschaft kommt es infolge der mikrobiellen Besiedlung der Abfälle dauerhaft oder intermittierend zu Belastungen der Luft mit Mikroorganismen (HERR et al., 1999).

In Kompostwerken werden Mikroorganismen bei der Verarbeitung von trockenen Materialien bedingt durch Maschinen und starker Staubentwicklung aufgewirbelt und in der Umgebungsluft innerhalb und außerhalb der Kompostierungsanlagen verbreitet. Dabei können Keimbelastungen von $> 10^6$ KBE/m³ Luft und Pilzkonzentrationen bis zu 10^7 KBE/m³ Luft gemessen werden (PHILIPP, 1996).

Sind die Keime in den luftgetragenen Zustand übergegangen, treten eine Reihe von Einflußfaktoren auf, die sowohl das physikalische als auch das biologische Geschehen betreffen. Weder in noch außerhalb von Gebäuden breiten sich Keimwolken ungehindert und gleichmäßig aus, mechanische Hindernisse, thermisch oder anderweitig bedingte Luftströmungen zerstören und verändern die Struktur des Aerosols. Zudem findet im freien Gelände ein ständiger Austausch von Keimen zwischen Wasser, Boden und Luft statt. Das mikrobielle Aerosol ändert sich mit der

Zeit nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ, weil Bakterien im luftgetragenen Zustand unterschiedlich schnell inaktiviert werden. Die meisten emittierenden Keime werden außerhalb von Abfallbehandlungsanlagen in einer Entfernung zwischen 100 und 200 m zur Keimquelle abgeschieden bzw. im luftgetragenen Zustand inaktiviert. Allerdings kann es unter besonderen meteorologischen Bedingungen in seltenen Fällen auch zur Verfrachtung über größere Distanzen kommen (BÖHM et al., 1998).

2.4 Luftkeimgehalte in verschiedenen Bereichen

In der Literatur liegen zahlreiche Untersuchungen zum Luftkeimgehalt in verschiedenen Bereichen vor. Vor allem in der Landwirtschaft und im Bereich der Abfallentsorgung, insbesondere bei der Kompostierung, sowie in der Lebensmittelindustrie und im Krankenhausbereich wurden lufthygienische Untersuchungen durchgeführt, um mögliche Folgen, wie Berufskrankheiten oder Einflüsse des Luftkeimgehaltes auf die Produktqualität und die Gesundheit der Menschen erklären bzw. abschätzen zu können. In den Tabellen 1 und 2 sind einige Beispiele aufgeführt.

Tab. 1: Gesamtpilzzahlen in verschiedenen Bereichen nach Literaturangaben

Bereich	KBE/m ³ Luft	Autor
Außenluft	71	HESSE et al. (1992)
Außenluft	2.300 - 11.000	COLE et al. (1994)
Stadt	39 - 65.539	LEVETIN et al. (1995)
Wohnung	28 bis > 35.000	HUNTER und LEA (1994)
Kompostanlage	bis 7.900.000	FACK und PHILIPP (1994)
Mülldeponie	15.000	BÖHM et al. (1996)
Schweinstall	20.000	DONHAM (1991)
Fleischwarenbetrieb	bis 17.000	RAHNER und WIENAND (1995)

Tab. 2: Gesamtkeimgehalte in verschiedenen Bereichen nach Literaturangaben

Bereich	KBE/m ³ Luft	Autor
Botanischer Garten	230 - 4 300	FACK und PHILIPP (1994)
Außenluft	210 - 760	COLE et al. (1994)
Abwasserreinigungsanlage	25.000	WANNER (1975)
Werksgelände (Müllheizkraftwerk)	2.420	SCHMIDT (1994)
Mülldeponie	84.000	BÖHM et al. (1996)
Schweinstall	1.400.000	DONHAM (1991)
Fleischwarenbetrieb	bis 17.000	RAHNER und WIENAND (1995)

2.5 Verfahren zum Nachweis luftgetragener Mikroorganismen in der Luft

Zur Sammlung und zum Nachweis luftgetragener Mikroorganismen wurden eine Vielzahl von verschiedenen Geräten entwickelt und beschrieben. Die dabei zur Partikelabscheidung führenden Kräfte hängen in unterschiedlicher Weise von den Partikeleigenschaften (Größe, Dichte, Form, elektrische Ladung und Oberflächenbeschaffenheit) ab, aber auch vom Strömungsfeld des Trägergases. Man unterscheidet die gängigen Sammelprinzipien:

- Filtration
- Impingement
- Zentrifugation bzw. Abscheidung der Partikel in rotierenden Strömungsfeldern (Zyklon)
- Impaktion und
- Sedimentation

Bei der Filtrationssammlung wird eine definierte Luftmenge durch ein Schwebstoff-Filter gezogen, auf bzw. in welchem die Abscheidung der mitgeführten Partikel durch Diffusion, Trägheitsabscheidung (Impaktion) und ggf. elektrische Kräfte erfolgt.

Der Begriff Impingement wird im Zusammenhang mit der Abscheidung luftgetragener Partikel in Flüssigkeiten gebraucht. Die Sammeleffizienz hängt in charakteristischer Weise von den Eigenschaften der Sammelflüssigkeit und von der Partikeloberfläche ab. So werden beispielsweise nicht benetzbare Teilchen mit großer Wahrscheinlichkeit, eingeschlossen in Gasblasen, wieder als Sekundäraerosole aus der Sammelflüssigkeit ausgetragen.

Bei Zentrifugalsammlern und Zyklonen wird der Luftstrom in eine Kreisbahn gezwungen, wobei die mitgeführten Partikel aufgrund der Zentrifugalkraft (Trägheitsabscheidung) aus dem Luftstrom entfernt und abgeschieden werden.

Bei Impaktoren werden mittels Schlitz- bzw. Lochdüsen definierte Staupunktströmungen erzeugt, in welchem hinreichend träge Partikel die Stromlinien des Trägergases verlassen und auf entsprechenden Prallplatten abgeschieden werden. Kaskaden aus mehreren Impaktorstufen mit unterschiedlichen „cut-off“-Durchmessern ermöglichen eine Partikelfraktionierung nach aerodynamischen Größenklassen. Mittels virtueller Impaktoren bzw. Zyklonen gelingt die Überführung gasgetragener Partikel aus einem großen in ein kleines Gasvolumen. Solche partikelgröbenselektiven Anreicherungssysteme sind, den eigentlichen Luftkeimsammlern vorgeschaltet, zur Vergrößerung des Konzentrationsbereichs einsetzbar.

Im Gegensatz zu den vorstehenden Verfahren, die Partikel aus einem im Sammelgerät erzeugten, definierten Luftstrom abscheiden (aktive Sammlung), handelt es sich bei der Sedimentation um ein passives Sammelverfahren. In der Regel kann bei diesem Verfahren kein Bezug zwischen der pro Zeit und Flächeneinheit, z. B. auf einer offenen Nähragarplatte, abgeschiedenen Mikroorganismenzahl und dem Luftstrom hergestellt werden (GÖTTLICH et al., 1999).

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung der Biogasanlage „B“

Bei der Biogasanlage „B“ handelt es sich um eine einstufige Naßvergärungsanlage. Bei diesem Verfahren der Biogasgewinnung wird Bioabfall in wässrige Lösung gebracht und zusammen mit Speiseresten aus Großküchen vergoren.

Der getrennt gesammelte Bioabfall wird zunächst in einer geschlossenen Halle abgeladen und von dort per Radlader direkt über ein Förderband in die Aufbereitungshalle transportiert, wo die vollautomatische Störstoffaussortierung erfolgt. Danach wird der Bioabfall in einem Pulper mit Prozeßwasser vermischt und intensiv verrührt. Die daraus entstandene dickflüssige Pulpe wird dann in die eigentliche Biogasanlage (3 Fermenter) weitergeleitet und mesophil vergoren.

Die Speisereste werden in einer eigenen Halle angeliefert. Nach der Zerkleinerung der Speisereste werden diese in einer Hygienisierungsanlage auf über 70 °C erhitzt. Nach mindestens 1 Stunde werden die pasteurisierten Speisereste mit der Bioabfallpulpe vermischt und in die Fermenter weitergeleitet.

Nach der Vergärung (ca. 20 Tage) wird das flüssige Gärsubstrat separiert, wobei die Feststoffe zusammen mit Grüngut kompostiert und vermarktet werden, und die flüssige Phase wieder für die Aufarbeitung des Bioabfalls im Pulper verwendet bzw. in einer Abwassergrube zwischengelagert und anschließend in der Kläranlage entsorgt wird.

Die Anlage ist vollständig eingehaust und die Hallenluft wird über einen Biofilter abgeführt.

3.2 Beschreibung der Meßorte

Die lufthygienischen Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Terminen und an unterschiedlichen Probenahmestellen durchgeführt. Dabei wurden nicht nur die Keimemissionen an verschiedenen Orten der Anlage erfaßt, sondern auch die an Arbeitsplätzen. Die erste Untersuchung fand im Sommer 1999 und die beiden anderen Untersuchungen im Herbst 2000 statt. Die Termine wurden so gewählt, um einen möglichen Einfluß der Jahreszeit auf die Luftkeimkonzentrationen berücksichtigen zu können.

Vor Beginn der Messungen wurden mit Hilfe eines Foggers die Luftbewegungen innerhalb der Anlage sichtbar gemacht und daraufhin die genauen Standorte für die Probenahme festgelegt.

Im Sommer 1999 wurde an folgenden Probenahmestellen gemessen:

- Bioabfallanlieferungshalle
- Speiseabfallanlieferungshalle
- Aufbereitungshalle an zwei verschiedenen Standorten
 - A: Sandfang
 - B: Störstoff-Austrag
- Austrag der Gärfeststoffe sowie Umsetzen / Verladen der Feststoffe; Radlader und Radladerfahrer

- Abwassergrube
- Biofilter
- Hintergrund (Lee, 20 m)
- Shreddern von Strukturmaterial für die Kompostierung der Gärfeststoffe; Radlader und Radladerfahrer

Im Herbst 2000 wurde an folgenden Probenahmestellen gemessen:

- Aufbereitungshalle an zwei verschiedenen Standorten
 - A: Sandfang
 - B: Störstoff-Austrag
- Austrag der Gärfeststoffe
- Hintergrund (Lee, 20 m)

Die Luftkeimsammelgeräte wurden so aufgestellt, daß sich die Sammelköpfe in 1,50 m Höhe befanden.

In Abbildung 1 sind die Meßorte in Biogasanlage „B“ dargestellt.

Während der Messungen wurden die Temperatur, Luftfeuchtigkeit und die Windgeschwindigkeit erfaßt.

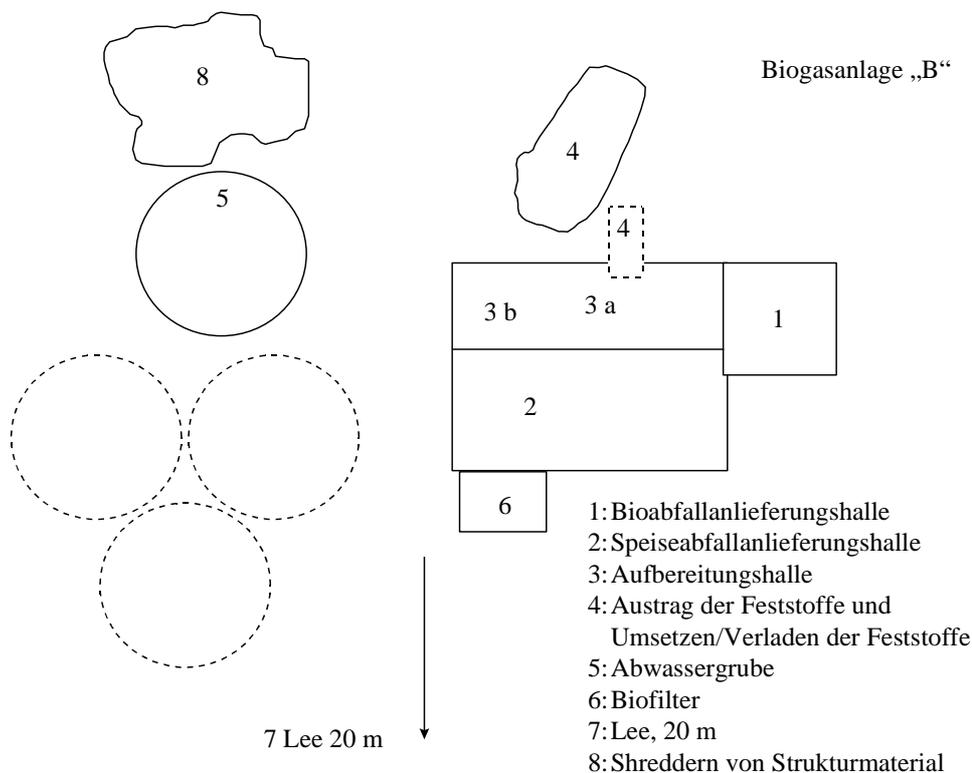


Abb. 1: Meßorte für die Luftkeimuntersuchungen in der Biogasanlage „B“

3.3 Beschreibung der Meßmethode

3.3.1 Verwendete Luftkeimsammelgeräte

3.3.1.1 MD-8-Sammelkopf

Das Gerät arbeitet nach der Filtrationsmethode. Dabei wird die Luft direkt durch ein Filter gesaugt, auf dem die in der Luft enthaltenen Partikel abgeschieden werden. Das Filter hat einen Durchmesser von 80 mm und wird vom Hersteller geliefert. In den vorliegenden Untersuchungen wurden Gelatinefilter und Cellulosenitratfilter verwendet. Mit den Gelatinefiltern wurden die Gesamtbakterienzahl, Gesamtschimmelpilzzahl, *Aspergillus fumigatus*, thermotolerante Schimmelpilze und thermophile Actinomyceten sowie die anaerobe Gesamtbakterienzahl, die Anzahl anaerober Sporenbildner und *Clostridium perfringens* bestimmt. Mit den Cellulosenitratfiltern erfolgte die Ermittlung der anaeroben Gesamtbakterienzahl im direkten Verfahren. Durch eine separate Pumpe wird die Luft mit dazwischen geschaltetem Rotameter angesaugt, wobei der Luftdurchsatz variabel ist. Bei den Messungen wurden 300 l Luft bei einer Durchflußmenge von 30 l/min und einer Probenahmezeit von 10 min bzw. 150 l Luft bei einer Probenahmezeit von 5 min gezogen. Anschließend wurden die Gelatinefilter in 20 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und bis zur Verarbeitung im Labor kühl gelagert. Die Cellulosenitratfilter wurden vor Ort auf Blut-Glucose-Agar aufgelegt und anschließend kühl gelagert.

Im Herbst 2000 erfolgte die Probenahme in geringfügig abgewandelter Form. Die Bestimmung der aeroben bzw. anaeroben Bakterienflora erfolgte nicht aus derselben Probe, sondern aus parallel gezogenen Proben. Die Proben (Gelatinefilter) wurden jeweils in 15 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und bis zur Verarbeitung im Labor kühl gelagert, wobei die Proben für den Nachweis der anaeroben Gesamtbakterienzahl, anaerober Sporenbildner und *Clostridium perfringens* unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertöpfe) kühl gelagert wurden. Auch die Proben für den direkten Nachweis anaerober Gesamtbakterien mit Cellulosenitratfiltern bzw. Gelatinefiltern wurden unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertöpfe) zwischengelagert und sofort nach Rückkehr ins Labor zur anaeroben Inkubation gegeben.

3.3.1.2 PGP-Sammler

Ein Gerät, das speziell für den Einsatz an der Person im Rahmen von Messungen, die dem Arbeitsschutz dienen, konzipiert ist, ist der PGP-Sammler unter Verwendung des Gesamtstaubkopfes GSP, der mit Filtern von 37 mm Durchmesser bestückt wird. Der Sammelkopf ist für einen Volumenstrom von 3,5 l/min ausgelegt, die dazugehörige Pumpe ist auf Fördermengen von 0,75 - 4,5 l/min einstellbar. Bei den Messungen wurde der PGP-Sammler 5, 10 und 60 Minuten betrieben. Ebenso wie bei den Messungen mit dem MD-8-Sammelkopf wurden Gelatine- und Cellulosenitratfilter verwendet. Dieses Gerät wurde nur bei der Messung im Sommer 1999 eingesetzt.

3.3.2 Aufarbeitung der Proben im Labor

Die Luftproben wurden innerhalb von max. 24 h nach der Probenahme aufgearbeitet. Die Aufarbeitung richtete sich nach der Standardvorschrift TRBA 430 (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe) (ANONYM, 2001a), nach deren Methodik auch die Meßwertbildung erfolgte. Zu Beginn der Probenaufarbeitung wurde den Luftproben Tween 80 (0,01 % Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten geschüttelt und danach noch einmal 4 Minuten auf dem Vortex. Ausgehend von dieser Lösung wurde mit 1 ml dieser Lösung eine dekadische Verdünnungsreihe in 9 ml physiologischer Kochsalzlösung (mit Tween 80) angelegt und nach dem KOCH'schen Oberflächenverfahren die verschiedenen Nährmedien beimpft. Dazu wurden aus jeder Verdünnungsstufe sowie aus der Ausgangslösung jeweils 0,1 ml auf je 3 parallel angelegte Agarplatten pipettiert und mit einem ausgeglühten Drahtspatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Zusätzlich wurde im doppelten Ansatz jeweils 1 ml der Ausgangslösung auf je drei Nähragarplatten ausgespatelt. Die Inkubation der Nährmedien erfolgte entsprechend der untersuchten Keime (vgl. Tabelle 3). Die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und anschließend auf 1 m³ Luft umgerechnet.

Sommer 1999:

Für die Ermittlung der Anzahl anaerob wachsender Sporenbildnern wurden ca. 4 ml der Ausgangslösung bei 60 °C 15 Minuten erhitzt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung angelegt und Blut-Glucose-Agarplatten nach dem KOCH'schen Oberflächenverfahren beimpft und im Anaerobiertopf bei 37 °C 4 d inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung aller gewachsenen Kolonien.

Clostridium perfringens wurde qualitativ bestimmt. Dazu wurden 5 ml der Ausgangslösung in 45 ml Kochfleischbouillon überimpft und anschließend 4-5 d bei 37 °C im Anaerobiertopf bebrütet. Danach erfolgte der Ausstrich der Kulturen auf Blut-Glucose-Agar und die anaerobe Inkubation bei 37 °C 24 h. Von verdächtigen Kolonien (grünliches Wachstum und Hämolyse) wurden Reinkulturen auf Blut-Glucose angefertigt und anaerob bei 37 °C 24 h bebrütet. Anschließend wurden die Reinkulturen mittels API 20 A weiter differenziert.

Die Blut-Glucose-Agarplatten mit den Cellulosenitratfiltern wurden direkt nach der Rückkehr vom Meßort in Anaerobiertöpfe gebracht und bei 37 °C 4 d bebrütet. Danach erfolgte die Zählung der Kolonien und die Umrechnung auf 1 m³ Luft.

Herbst 2000:

Für die Ermittlung der Anzahl anaerob wachsender Sporenbildnern wurden ca. 5 ml der Ausgangslösung bei 80 °C 15 Minuten erhitzt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung angelegt und die Blut-Glucose-Agarplatten mit Actidion nach dem KOCH'schen Oberflächenverfahren beimpft und im Anaerobierzelt bei 39 °C 7 d inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung aller gewachsenen Kolonien und die Umrechnung auf 1 m³ Luft.

Clostridium perfringens wurde qualitativ bestimmt. Dazu wurden 5 ml der Ausgangslösung in 45 ml Fluid-Thioglycollate-(FTG)-Bouillon überimpft und anschließend 4-5 d bei 39 °C im Anaerobierzelt bebrütet. Danach erfolgte der Ausstrich der Kulturen auf TSC-Agar und die anaerobe Inkubation bei 39 °C 48 h. Von verdächtigen Kolonien (schwarzes Wachstum) wurden Reinkulturen auf Blut-Glucose-Agar bzw. TSC-Agar angefertigt und anaerob bei 39 °C 24 h bebrütet. Anschließend wurden die Reinkulturen mittels API 20 A weiter differenziert.

Die Blut-Glucose-Platten mit den Cellulosenitratfiltern bzw. Gelatinefiltern wurden direkt nach der Rückkehr vom Meßort aus den Anaerobiertöpfen in das Anaerobierzelt gebracht und 7 d bei 39 °C bebrütet. Danach erfolgte die Zählung der Kolonien und die Umrechnung auf 1 m³ Luft.

In den Tabellen 3 und 4 sind die Nährmedien, die Bebrütungstemperaturen und -zeiten der untersuchten Keime während der Untersuchungen im Sommer 1999 und Herbst 2000 dargestellt.

Tab. 3: Nährmedien, Bebrütungstemperatur und -zeit der untersuchten Keime während der Untersuchungen im Sommer 1999

Untersuchte Keime	Nährmedium	Bebrütungs- temperatur	Bebrütungs- zeit
Gesamtbakterienzahl	Caso-Agar mit Actidion	30 °C	7 d
Gesamtschimmelpilzzahl	DG-18 mit Chloramphenicol	25 °C	7 d
thermotolerante Schimmelpilze	DG-18 mit Chloramphenicol	43 °C	3 d
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DG-18 mit Chloramphenicol	43 °C	3 d
thermophile Actinomyceten	Glycerin-Arginin-Agar mit Actidion	50 °C	14 d
anaerobe Gesamtbakterienzahl	Blut-Glucose-Agar	37 °C	4 d
anaerobe Sporenbildner	Blut-Glucose-Agar	37 °C	4 d
<i>Clostridium perfringens</i>	Kochfleischbouillon, Blut-Glucose-Agar	37 °C 37 °C	4 -5 d 1 d

Tab. 4: Nährmedien, Bebrütungstemperatur und -zeit der untersuchten Keime während der Untersuchungen im Herbst 2000

Untersuchte Keime	Nährmedium	Bebrütungs- temperatur	Bebrütungs- zeit
Gesamtbakterienzahl	Caso-Agar mit Actidion	30 °C	7 d
Gesamtschimmelpilzzahl	DG-18 mit Chloramphenicol	25 °C	7 d
thermotolerante Schimmelpilze	DG-18 mit Chloramphenicol	43 °C	3 d
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DG-18 mit Chloramphenicol	43 °C	3 d
thermophile Actinomyceten	Glycerin-Arginin-Agar mit Actidion	50 °C	14 d

anaerobe Gesamtbakterienzahl	Blut-Glucose-Agar mit Actidion	39 °C	7 d
anaerobe Sporenbildner	Blut-Glucose-Agar mit Actidion	39 °C	7 d
<i>Clostridium perfringens</i>	FTG-Bouillon,	39 °C	4 -5 d
	TSC-Agar	39 °C	2 d

3.3.3 Meßwertermittlung

Aus den jeweiligen Koloniezahlen aller Platten der auswertbaren Verdünnungsstufe wurde der Mittelwert gebildet. Falls möglich wurden nur Platten berücksichtigt, auf denen zwischen 5 - 150 Kolonien gewachsen sind. Die Berechnung des Ergebnisses in koloniebildende Einheiten pro m³ Luft (KBE/m³ Luft) erfolgt gemäß folgender Formel:

$$\text{KBE/m}^3 \text{ Luft} = x * y * 1000 \text{ l} / (\text{V} * \text{t} * \text{d})$$

- x: Mittelwert der Anzahl an Kolonien
- y: Ausgangslösung in ml (einschließlich Tween)
- V: Luftrate des Sammlers in l/min
- t: Probenahmezeit in Minuten
- d: Verdünnungsstufe

Die unteren Nachweisgrenzen der verwendeten Nachweisverfahren sind abhängig von der Meßzeit, dem Luftvolumenstrom und der Probenaufarbeitung bzw. von der Menge an physiologischer Kochsalzlösung, in der die Gelatinefilter aufgelöst wurden. Diese wiederum richtete sich nach der Anzahl der parallel aus der Probe zu bestimmenden Keimgruppen.

4 Ergebnisse

Die Werte der Außenluft (Hintergrund) bewegten sich zwischen nicht nachweisbar und 10^3 KBE/m³ Luft. Die Gesamtbakterienzahlen erreichten Werte von $1,8 \times 10^2$ bis $5,9 \times 10^3$ KBE/m³ Luft. Die Schimmelpilzkonzentrationen bewegten sich zwischen $1,0 \times 10^2$ und $9,5 \times 10^2$ KBE/m³ Luft. Thermotolerante Schimmelpilze und *Aspergillus fumigatus* sowie thermophile Actinomyceten wurden in der Außenluft in nur sehr geringer Anzahl festgestellt. Die Werte erreichten maximal $5,5 \times 10^2$ KBE/m³ Luft. Die anaerobe Gesamtbakterienzahl und die Werte für anaerobe Sporenbildner schwankten zwischen nicht nachweisbar und $5,5 \times 10^2$ KBE/m³ Luft.

Im Sommer 1999 wurden speziell Funktionsbereiche mit reger Arbeitstätigkeit untersucht. Dabei zeigte sich, daß die höchsten Werte in den Bereichen Bioabfall-, Speiseabfallanlieferung, Aufbereitungshalle, Radlader, Shreddern und Feststoffe verladen, gemessen werden. Die Gesamtbakterienzahlen erreichten dabei Werte zwischen $5,4 \times 10^3$ in der Kabine des Radladers (Radladerfahrer) und maximal $9,9 \times 10^5$ KBE/m³ Luft am Radlader beim Verladen der Feststoffe. Im Vergleich zu den Hintergrund-Werten lagen die Gesamtbakterienzahlen in Bereichen mit reger Arbeitstätigkeit um 2 bis 3 Zehnerpotenzen höher. Die höchsten Gesamtschimmelpilzzahlen wurden beim Shreddern mit $1,1 \times 10^5$ KBE/m³ Luft und in der Aufbereitungshalle am Sandfang mit $4,0 \times 10^5$ KBE/m³ Luft ermittelt. Ansonsten schwankten die Werte zwischen 10^2 und 10^4 KBE/m³ Luft. Die Gehalte an *Aspergillus fumigatus* bewegten sich zwischen nicht nachweisbar und maximal $6,8 \times 10^3$ KBE/m³ Luft in der Speiseabfallanlieferungshalle. Der höchste Wert für thermotolerante Schimmelpilze wurde beim Shreddern mit $7,8 \times 10^4$ KBE/m³ Luft gemessen. An den anderen Meßpunkten konnten Werte zwischen 10^1 und 10^3 nachgewiesen werden. Thermophile Actinomyceten wurden im Sommer 1999 in der Aufbereitungshalle und beim Feststoffe verladen nicht nachgewiesen, während bei den Messungen im Herbst 2000 Werte bis zu $2,2 \times 10^4$ KBE/m³ Luft in der Aufbereitungshalle ermittelt wurden. Anaerobe Bakterien und anaerobe Sporenbildner konnten an allen Standorten nachgewiesen werden. Die Keimgehalte erreichten dabei Werte zwischen $1,0 \times 10^1$ und $4,6 \times 10^5$ KBE/m³ Luft an anaeroben Bakterien und bis zu $5,0 \times 10^4$ KBE/m³ Luft an anaeroben Sporenbildnern. Der höchsten Gehalte wurden am Austrag der Feststoffe gemessen. Allerdings konnten ebenso hohe Gehalte beim Abkippen von Speiseabfällen festgestellt werden. *Clostridium perfringens* konnte in einer von insgesamt 46 untersuchten Proben nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Nachweisrate von 2,17 %.

An den Probenahmestandorten, die sich im Außenbereich der Biogasanlage (Sickerwasserbehälter, Biofilter) befanden, wurden Keimgehalte ermittelt, die im Vergleich zu den Hintergrund-Werten um 1-2 Zehnerpotenzen höher waren.

Die ermittelten Keimgehalte lagen im allgemeinen um 2 bis 3 Zehnerpotenzen über denen der Hintergrund-Belastung, z. T. wurden auch Werte gemessen, die bis zu 4, 5 Zehnerpotenzen über den Hintergrund-Werten lagen.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 bis 8 dargestellt. Die Abbildungen 2 bis 6 zeigen die durchschnittlich ermittelten Werte.

In Tabelle 8 werden die Ergebnisse der direkten Methode (vgl. TRBA 430 (ANONYM, 2001a)) zum Nachweis der anaeroben Gesamtbakterienzahl vergleichend dargestellt. Hier zeigt sich, daß mit Gelatinefilter tendenziell höhere Keimgehalte nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Werten, die mit der indirekten Methode ermittelt wurden, liegen sie in der gleichen Größenordnung.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zum Keimgehalt verschiedener Substrate der Biogasanlage „B“ dargestellt. Die höchsten Gesamtbakterienzahlen wurden im Gemisch aus Bioabfall und Speiseresten mit 10^7 bis 10^8 KBE/g ermittelt. Der Gehalt an *Clostridium perfringens* schwankte zwischen 10^1 und 10^4 KBE/g. Die Konzentrationen an thermophilen Actinomyceten im Gemisch erreichten Werte zwischen 10^3 und 10^4 KBE/g. In den Feststoffen wurden Gesamtbakterienzahlen nachgewiesen werden, die um eine Zehnerpotenz niedriger waren als im Ausgangssubstrat der Vergärung. Der Gehalt an *Clostridium perfringens* wies ebenso hohe Werte auf wie, das Gemisch aus Bioabfall und Speiseresten und das Prozeßwasser. Der Gehalt an thermophilen Actinomyceten in den Feststoffen schwankte zwischen 10^4 und 10^5 KBE/g und im Prozeßwasser zwischen 10^3 und 10^5 KBE/g. Die Gesamtbakterienzahlen des Prozeßwassers erreichten Werte von 10^7 KBE/g auf.

Tab. 5: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Sommer 1999 (KBE/m³ Luft)

Probe		GBZ	GSPZ	Af	TSP	ACT	anaerobe GBZ (direkt)	anaerobe Sporenbildner	Cp
Bioabfall-anlieferungshalle	mit Arbeit	2,7 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁴	4,9 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴	n. n.	8,0 x 10 ²	2,0 x 10 ³	n. n.
	ohne Arbeit	2,9 x 10 ⁴	9,5 x 10 ³	1,0 x 10 ³	7,7 x 10 ³	1,7 x 10 ³	5,4 x 10 ²	4,6 x 10 ³	n. n.
Speiseabfall-anlieferungshalle	ohne Arbeit	1,1 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	6,8 x 10 ³	1,3 x 10 ⁴	n. n.	1,8 x 10 ³	1,7 x 10 ³	n. n.
	ohne Arbeit	1,1 x 10 ⁴	2,9 x 10 ²	n. n.	5,7 x 10 ²	7,7 x 10 ³	3,4 x 10 ²	1,7 x 10 ³	n. n.
	Abkippen LKW	1,2 x 10 ⁴	8,3 x 10 ³	n. n.	3,4 x 10 ³	n. n.	3,0 x 10 ³	1,7 x 10 ³	n. n.
	Abkippen LKW	1,3 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁴	n. n.	5,7 x 10 ²	n. n.	>1,1 x 10 ⁴	3,1 x 10 ³	n. n.
Shreddern	Shredder	2,5 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	n. n.	1,2 x 10 ³	8,7 x 10 ²	1,3 x 10 ¹	4,5 x 10 ³	n. n.
	Shredder	1,5 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³	n. n.	6,7 x 10 ²	3,3 x 10 ¹	n. n.	2,1 x 10 ³	n. n.
	Radlader	1,0 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	n. n.	7,8 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	1,6 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴	n. n.
	Radladerfahrer	1,1 x 10 ⁵	1,6 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,9 x 10 ³	2,9 x 10 ²	4,0 x 10 ²	8,3 x 10 ³	n. n.
Sickerwasserbehäl-		2,3 x 10 ²	2,3 x 10 ³	n. n.	n. n.	n. n.	6,7 x 10 ⁰	n. n.	n. n.
		3,0 x 10 ²	2,0 x 10 ³	n. n.	n. n.	n. n.	1,0 x 10 ¹	6,7 x 10 ¹	n. n.
Biofilter		4,2 x 10 ³	3,4 x 10 ³	n. n.	3,3 x 10 ¹	n. n.	4,3 x 10 ¹	n. n.	n. n.
		6,0 x 10 ³	3,6 x 10 ³	3,3 x 10 ¹	3,3 x 10 ¹	6,7 x 10 ¹	5,0 x 10 ¹	3,7 x 10 ²	n. n.
Hintergrund (Lee)		1,8 x 10 ²	9,5 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	3,3 x 10 ⁰	4,3 x 10 ²	n. n.
		4,3 x 10 ²	7,7 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	3,3 x 10 ⁰	5,3 x 10 ²	n. n.

GBZ: Gesamtbakterienzahl

GSPZ: Gesamtschimmelpilzzahl

Af: *Aspergillus fumigatus*

ACT: thermophile Actinomyceten

TSP: thermotolerante Schimmelpilze

Cp: *Clostridium perfringens*

n. n.: nicht nachweisbar

Fortsetzung der

Tab. 5: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Sommer 1999 (KBE/m³ Luft)

Probe	GBZ	GSPZ	Af	TSP	ACT	anaerobe GBZ (direkt)	anaerobe Sporenbildner	Cp
Aufbereitungshalle (A)	2.0 x 10 ³	8.6 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	8.6 x 10 ²	4.6 x 10 ³	n. n.
Sandfang	1,8 x 10 ⁴	4,9 x 10 ³	8,6 x 10 ²	3,1 x 10 ³	n. n.	1,4 x 10 ³	5,7 x 10 ²	n. n.
Aufbereitungshalle (B)	1,4 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	4,5 x 10 ³	n. n.	3,7 x 10 ²	1,4 x 10 ³	n. n.
Störstoffaustrag	1,7 x 10 ⁴	7,1 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,8 x 10 ³	n. n.	9,1 x 10 ²	5,1 x 10 ³	n. n.
Feststoffe verladen;	Miete	5,9 x 10 ³	2,3 x 10 ³	5,9 x 10 ⁴	n. n.	2,3 x 10 ¹	1,7 x 10 ³	n. n.
	Radlader	9,9 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	3,5 x 10 ³	n. n.	1,6 x 10 ³	1,7 x 10 ⁴	n. n.
	Radladerfahrer	5,4 x 10 ³	8,6 x 10 ²	n. n.	8,0 x 10 ²	n. n.	1,1 x 10 ³	2,0 x 10 ³
Hintergrund (Lee)	1,8 x 10 ²	9,5 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	3,3 x 10 ⁰	4,3 x 10 ²	n. n.
	4,3 x 10 ²	7,7 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	3,3 x 10 ⁰	5,3 x 10 ²	n. n.

GBZ: Gesamtbakterienzahl

GSPZ: Gesamtschimmelpilzzahl

Af: *Aspergillus fumigatus*

ACT: thermophile Actinomyceten

TSP: thermotolerante Schimmelpilze

Cp: *Clostridium perfringens*

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. 6: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Herbst 2000 (19.10.2000) (KBE/m³ Luft)

Meßort	GBZ	GSPZ	TSP	Af	ACT	anaerobe GBZ	anaerobe Sporenbildner	Cp
Aufbereitungshalle (A) (Sandfang)	2,9 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,0 x 10 ²	1,5 x 10 ²	n. n.	1,3 x 10 ³	5,0 x 10 ²	+
	2,3 x 10 ³	8,5 x 10 ²	1,5 x 10 ²	5,0 x 10 ¹	n. n.	9,5 x 10 ²	2,5 x 10 ²	n. n.
	5,0 x 10 ³	3,8 x 10 ²	7,5 x 10 ¹	2,5 x 10 ¹	n. n.	2,4 x 10 ⁴	9,5 x 10 ²	n. n.
Aufbereitungshalle (B) (Störstoffaustrag)	2,7 x 10 ³	2,3 x 10 ³	7,0 x 10 ²	5,5 x 10 ²	1,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	3,5 x 10 ²	n. n.
	1,4 x 10 ³	2,3 x 10 ³	1,7 x 10 ³	1,7 x 10 ³	n. n.	1,4 x 10 ³	4,5 x 10 ²	n. n.
	1,6 x 10 ³	1,9 x 10 ³	5,8 x 10 ²	4,3 x 10 ²	2,3 x 10 ²	8,5 x 10 ²	5,3 x 10 ²	n. n.
Austrag Feststoffe	2,5 x 10 ²	7,5 x 10 ²	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	n. n.	7,5 x 10 ²	2,5 x 10 ²	n. n.
	3,0 x 10 ²	6,0 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	3,0 x 10 ²	3,5 x 10 ²	n. n.
	1,5 x 10 ²	4,4 x 10 ³	1,0 x 10 ²	7,5 x 10 ¹	n. n.	5,3 x 10 ²	2,5 x 10 ²	n. n.
Hintergrund	1,5 x 10 ³	1,0 x 10 ²	5,5 x 10 ²	1,5 x 10 ²	n. n.	1,5 x 10 ²	5,5 x 10 ²	n. n.
	5,9 x 10 ³	6,0 x 10 ²	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	1,5 x 10 ²	n. n.

GBZ: Gesamtbakterienzahl

GSPZ: Gesamtschimmelpilzzahl

Af: *Aspergillus fumigatus*

ACT: thermophile Actinomyceten

TSP: thermotolerante Schimmelpilze

Cp: *Clostridium perfringens*

n. n.: nicht nachweisbar

+: nachweisbar in 50 l Luft

Tab. 7: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Herbst 2000 (16.11.2000)
(KBE/m³ Luft)

Meßort	GBZ	GSPZ	TSP	Af	ACT	anaerobe GBZ	anaerobe Sporenbildner	Cp
Aufbereitungshalle (A) (Sandfang)	4,4 x 10 ³	3,9 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	7,5 x 10 ¹	7,9 x 10 ³	1,1 x 10 ⁵	5,5 x 10 ²	n. n.
	1,1 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁴	7,5 x 10 ¹	2,5 x 10 ¹	6,9 x 10 ³	6,3 x 10 ²	3,5 x 10 ²	n. n.
	3,8 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ²	5,0 x 10 ¹	2,2 x 10 ⁴	7,5 x 10 ²	3,5 x 10 ²	n. n.
Aufbereitungshalle (B) (Störstoffaustrag)	2,6 x 10 ⁴	5,7 x 10 ³	3,5 x 10 ²	2,8 x 10 ²	1,2 x 10 ³	7,3 x 10 ³	4,0 x 10 ²	n. n.
	9,3 x 10 ²	6,8 x 10 ²	8,5 x 10 ²	8,5 x 10 ²	n. n.	9,5 x 10 ²	5,0 x 10 ¹	n. n.
	5,6 x 10 ³	6,4 x 10 ³	1,2 x 10 ³	8,5 x 10 ²	6,5 x 10 ²	1,6 x 10 ³	2,0 x 10 ²	n. n.
Austrag (C) Feststoffe	2,5 x 10 ⁴	3,3 x 10 ²	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	1,8 x 10 ³	2,8 x 10 ²	n. n.
	3,5 x 10 ⁴	2,3 x 10 ²	n. n.	n. n.	3,0 x 10 ²	3,7 x 10 ³	6,3 x 10 ²	n. n.
	2,4 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	1,5 x 10 ²	4,7 x 10 ³	4,6 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	n. n.
Hintergrund	2,3 x 10 ²	1,0 x 10 ²	2,8 x 10 ²	7,5 x 10 ¹	2,5 x 10 ¹	n. n.	n. n.	n. n.
	3,3 x 10 ²	2,3 x 10 ²	2,8 x 10 ²	7,5 x 10 ¹	n. n.	n. n.	2,5 x 10 ¹	n. n.
	5,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	n. n.	n. n.				

GBZ: Gesamtbakterienzahl

GSPZ: Gesamtschimmelpilzzahl

Af: *Aspergillus fumigatus*

ACT: thermophile Actinomyceten

TSP: thermotolerante Schimmelpilze

Cp: *Clostridium perfringens*

n. n.: nicht nachweisbar

Tab. 8: Anaerobe Gesamtbakterienzahlen in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen und Sammelmedien im Herbst 2000 (KBE/m³ Luft)

Meßort	anaerobe GBZ (Cellulose-Nitratfilter)	anaerobe GBZ (Cellulose-Nitratfilter)	anaerobe GBZ (Gelatine-Filter)
	19.10.2000	16.11.2000	16.11.2000
Aufbereitungshalle (A) (Sandfang)	3,3 x 10 ²	6,0 x 10 ¹	6,7 x 10 ²
	2,3 x 10 ²	1,1 x 10 ²	6,0 x 10 ²
	n. d.	1,0 x 10 ²	4,7 x 10 ²
Aufbereitungshalle (B) (Störstoffaus-	1,6 x 10 ²	1,6 x 10 ²	1,0 x 10 ³
	8,3 x 10 ¹	7,0 x 10 ¹	1,1 x 10 ³
	n. d.	3,7 x 10 ²	2,1 x 10 ²
Austrag (C) Feststoffe	6,7 x 10 ¹	5,3 x 10 ¹	1,1 x 10 ²
	6,7 x 10 ⁰	2,0 x 10 ¹	6,0 x 10 ¹
	n. d.	4,7 x 10 ¹	6,0 x 10 ¹
Hintergrund	1,3 x 10 ²	3,3 x 10 ⁰	1,0 x 10 ¹
	5,3 x 10 ¹	3,3 x 10 ¹	n. n.
	n. d.	6,7 x 10 ⁰	n. d.

GBZ: Gesamtbakterienzahl

n. n.: nicht nachweisbar

n. d. nicht durchgeführt

Tab. 9: Keimgehalte in verschiedenen Substraten in der Biogasanlage „B“ im Herbst 2000 (KBE/g Substrat) (nach KNIE et al., 2001; verändert)

Probe	GBZ		ACT		Cp	
	19.10.00	16.11.00	19.10.00	16.11.00	19.10.00	16.11.00
Gemisch aus Bioabfall und Speiseresten	5,8 x 10 ⁸	8,6 x 10 ⁷	6,2 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	9,3 x 10 ³
	7,4 x 10 ⁸	4,7 x 10 ⁸	n. d.	n. d.	2,0 x 10 ²	9,3 x 10 ¹
	3,4 x 10 ⁸	5,8 x 10 ⁸	n. d.	n. d.	2,4 x 10 ⁴	4,3 x 10 ²
Störstoffe	n. d.	n. d.	6,8 x 10 ³	4,8 x 10 ²	n. d.	n. d.
	n. d.	n. d.	4,7 x 10 ³	1,0 x 10 ⁴	n. d.	n. d.
Feststoffe	1,7 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁴	2,1 x 10 ²	2,3 x 10 ⁴
	3,2 x 10 ⁷	3,7 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁴	4,3 x 10 ²	1,5 x 10 ⁴
	9,6 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁵	9,2 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	7,4 x 10 ¹
Prozeßwasser	9,4 x 10 ⁷	4,3 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	2,1 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴
	2,8 x 10 ⁷	6,3 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	2,3 x 10 ¹
	1,5 x 10 ⁷	n. d.	6,8 x 10 ⁴	7,0 x 10 ³	2,3 x 10 ⁴	n. d.

GBZ: Gesamtbakterienzahl

Cp: *Clostridium perfringens*

ACT: thermophile Actinomyceten

n. d.: nicht durchgeführt

Sommer 1999

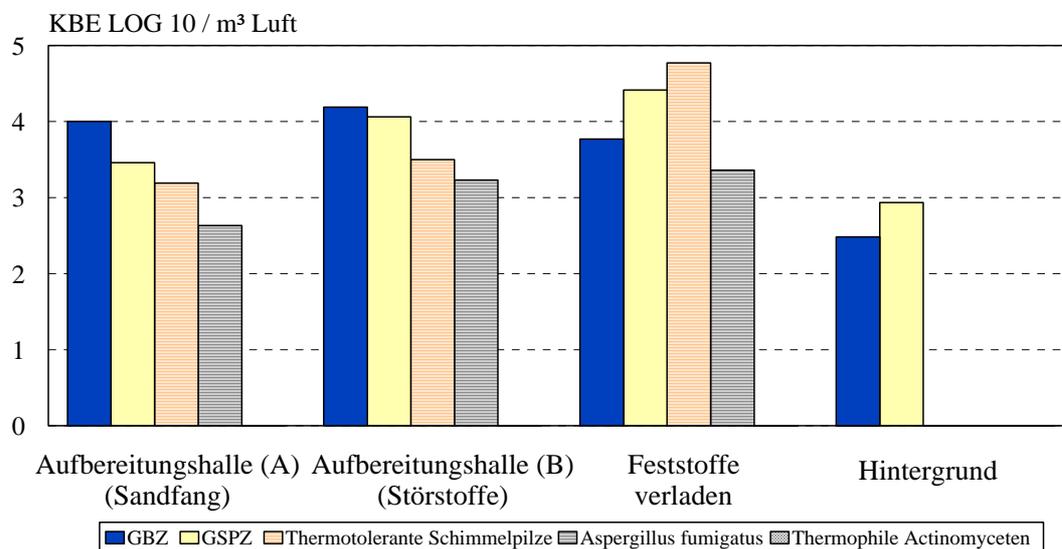


Abb. 2: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Sommer 1999

Herbst 2000

19.10.2000

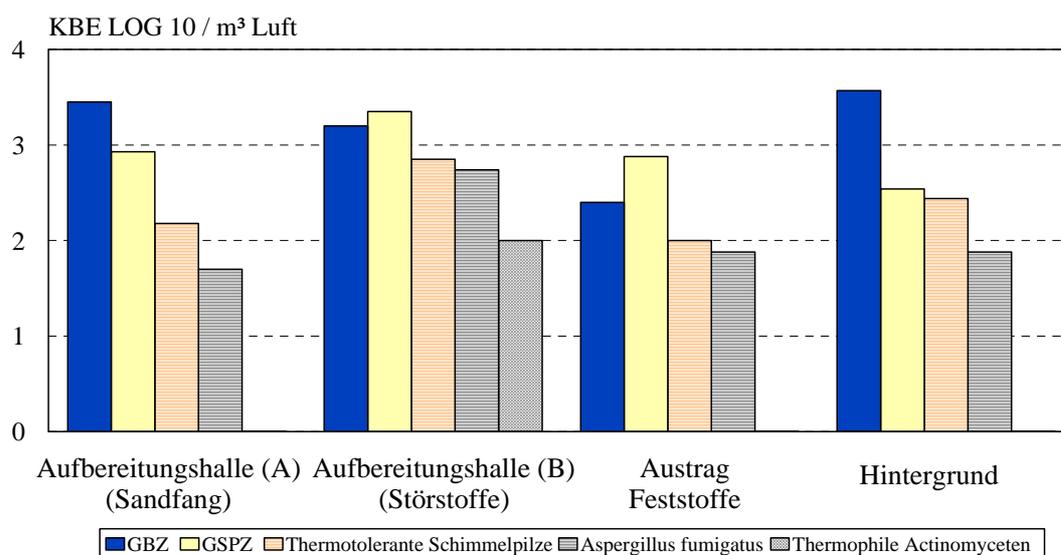


Abb. 3: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Herbst 2000 (19.10.2000)

Herbst 2000

16.11.2000

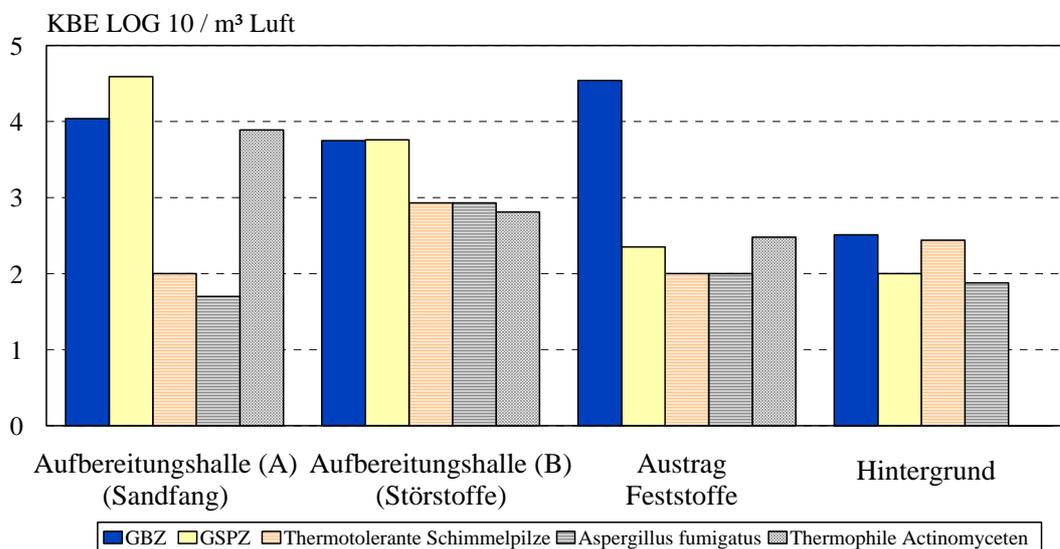


Abb. 4: Keimgehalte in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen im Herbst 2000 (16.11.2000)

Anaerobe Gesamtbakterienzahl

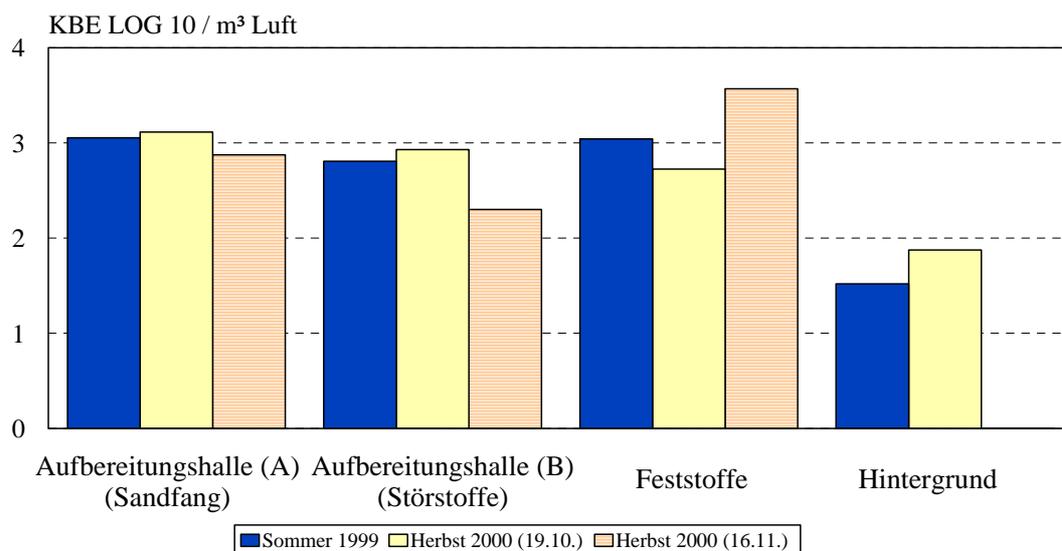


Abb. 5: Durchschnittliche Gehalte an anaeroben Bakterien in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen

Anaerobe Sporenbildner

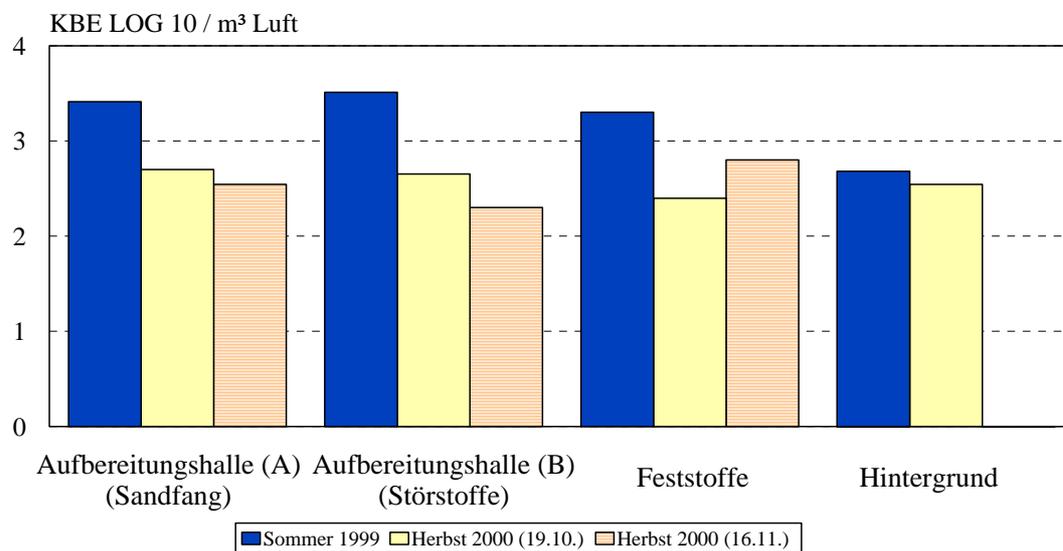


Abb. 6: Durchschnittliche Gehalte an anaeroben Sporenbildnern in der Luft der Biogasanlage „B“ in Abhängigkeit von verschiedenen Probenahmestellen

5 Diskussion

In einer Praxisanlage, in der Bioabfälle zusammen mit Speiseresten vergoren, die Gärreststoffe separiert und anschließend kompostiert werden, wurden Untersuchungen zum Keimgehalt der Umgebungsluft verschiedener Funktionsbereiche durchgeführt. Dabei galt es festzustellen, ob Unterschiede im Keimgehalt der Luft in den verschiedenen Bereichen im Vergleich zu Kompostierungsanlagen bestehen, bzw. ob das Gärsubstrat (Feststoffe) die Emissionssituation beeinflusst und/oder ob die Jahreszeit einen Einfluß hat.

Zunächst muß angeführt werden, daß die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Luftkeimgehalte die lufthygienische Situation zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellen.

Bei den Messungen in den verschiedenen Funktionsbereichen der Anaerobanlage zeigte sich, wie erwartet, daß die Keimgehalte der Luft an den unterschiedlichen Standorten am höchsten waren, als Material bewegt wurde, und daß im allgemeinen die Keimgehalte an den verschiedenen Standorten um 2 bis 4 Zehnerpotenzen über den Hintergrund-Werten (Außenluft) lagen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch FANTA et al. (1999). Die Autoren führten Messungen zur Ausbreitung von luftgetragenen Mikroorganismen aus verschiedenen Kompostierungs- und Vergärungsanlagen durch. Nach Untersuchungen von KÜHNER et al. (2001) kommt es bei Materialbewegungsvorgängen zu einer verstärkten Freisetzung von luftgetragenen Keimen, die um das 10 bis 10000-fache erhöht sein können.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die höchsten Werte in den Bereichen Bioabfall- und Speiseabfallanlieferung sowie in der Aufbereitungshalle gemessen. Auch nach HOPPENHEIDT et al. (1999) werden die höchsten Konzentrationen luftgetragener Mikroorganismen in diesen Bereichen gemessen. Die Autoren wiesen in der Speiseabfallanlieferung Bakterienzahlen nach, die um das 369-fache höher lagen als der Hintergrund-Wert. Im Bereich des Pulpers und der Zentrifuge (Aufbereitungshalle) konnten die Autoren Gesamtpilzzahlen ermitteln, die um das 481-fache höher waren als der entsprechende Hintergrund-Wert.

Insgesamt sind die vorliegenden Untersuchungsergebnisse vergleichbar mit Werten, wie sie von verschiedenen Autoren bei Untersuchungen in Kompostierungsanlagen ermittelt wurden (SCHMIDT, 1994; FACK, 1998; MISSEL et al., 1998; FANTA et al., 1999; FOLMSBEE & STREVETT, 1999).

So konnte SCHMIDT (1994) im Bereich der Bioabfallanlieferung Gesamtbakterienzahlen von $1,0 \times 10^5$ KBE/m³ Luft nachweisen. Die von FACK (1998) in der Anlieferung ermittelten Schimmelpilzkonzentrationen lagen zwischen $4,3 \times 10^4$ KBE/m³ Luft und $8,1 \times 10^5$ KBE/m³ Luft, und die Werte für *Aspergillus fumigatus* lagen zwischen 10^4 KBE/m³ Luft und 10^5 KBE/m³ Luft. Nach FANTA et al. (1999) werden im Anlieferungsbereich durchschnittliche Gehalte an thermophilen Actinomyceten von $2,0 \times 10^4$ KBE/m³ Luft festgestellt. Dies ist jedoch nicht weiter erstaunlich, da sich der Bereich der Bioabfallanlieferung in einer Anaerobanlage nicht wesentlich vom Anlieferungsbereich einer Kompostierungsanlage unterscheidet, und es sich beim Substrat Bioabfall um das gleiche inhomogene Inputmaterial handelt, das auch in Kompostierungsanlagen verarbeitet wird.

Auffällig ist, daß bei den Messungen im Sommer 1999 keine thermophilen Actinomyceten in der Luft in der Aufbereitungshalle nachgewiesen wurden, während im Herbst 2000 thermophile Actinomyceten mit einem Gehalt von bis zu $2,2 \times 10^4$ KBE/m³ Luft ermittelt werden konnten. Dies liegt möglicherweise daran, daß sich im Herbst 2000 in der Bioabfallanlieferungshalle ein Berg von Bioabfall angesammelt hat, der aufgrund von Reparaturarbeiten in der Anlage nicht schnell genug verarbeitet werden konnte. Dadurch kam es zu Erwärmungsprozessen im Bioabfall und somit zu einer optimalen Entwicklung (Vermehrung) der thermophilen Actinomyceten, die schließlich durch Arbeiten mit dem Radlader (Beschickung des Förderbandes mit Bioabfall) freigesetzt wurden und durch den Luftstrom in die Aufbereitungshalle gelangten. Nach HOPPENHEIDT et al. (1999) werden in der Bioabfallanlieferung Actinomyceten-Gehalte festgestellt, die um das 27-fache und in der Speiseabfallanlieferung um das 339-fache höher sind als der Hintergrund-Wert.

Die ermittelten Luftkeimgehalte des Biofilters liegen in der gleichen Größenordnung wie sie von GERBL-RIEGER et al. (1998) bei Messungen zur Ausbreitung luftgetragener Keime aus Kompostwerken und Anaerobanlagen gemessen wurden. Danach emittieren aus Biofiltern 10^3 KBE/m³ Luft an Bakterien und 10^3 Schimmelpilzsporen/m³ Luft. In den vorliegenden Untersuchungen sind die Luftkeimgehalte, die aus dem Biofilter emittieren, um ca. 2-3 Zehnerpotenzen niedriger im Vergleich zu den Luftkeimemissionen in den Hallen (Anlieferung von Bioabfall und Speiseabfall und Aufbereitung) und um ca. 1 Zehnerpotenz höher als die Hintergrund-Werte. Diese Ergebnisse werden von FANTA et al. (1999) und MARTENS et al. (2001) bestätigt. Somit lassen sich durch den Einsatz eines Biofilters erhöhte Keimemissionen vermindern. Nach MARTENS et al. (2001) werden Bakterien um ca. 70 bis 95 % reduziert. Das Rückhaltevermögen von Biofiltern kann nach SEEDORF & HARTUNG (1999) recht unterschiedlich sein. Dies hängt nach Ansicht der Autoren von seinem Pflegezustand, der Feuchtigkeit des Filtermaterials und auch dem Luftdurchsatz ab. Dennoch verläßt eine relativ große Anzahl an Mikroorganismen den Biofilter über die Fortluft. Dies hängt wesentlich damit zusammen, daß das Filtermaterial mit einem weiten Spektrum verschiedener Bakterien, Pilze und Algen besetzt ist.

Anaerobe Bakterien und anaerobe Sporenbildner konnten in allen Bereichen der Anlage nachgewiesen werden. In den Bereichen mit Materialbewegung waren die Werte im Mittel um 2-3 Zehnerpotenzen höher als die Hintergrund-Werte. Etwas erstaunlich war, daß anaerobe Bakterien und anaerobe Sporenbildner auch in den Rohwarenbereichen Bioabfall- und Speiseabfallanlieferung in höheren Konzentrationen nachgewiesen wurden. Dies liegt möglicherweise daran, daß sich in den Biotonnen anaerobe Verhältnisse bilden, insbesondere dann, wenn die Standzeiten verlängert werden. Die Konzentrationen der anaeroben Gesamtbakterienzahl erreichte Werte zwischen nicht nachweisbar und $2,4 \times 10^4$ KBE/m³ Luft und der Gehalt an anaeroben Sporenbildnern schwankte zwischen nicht nachweisbar und $1,7 \times 10^4$ KBE/m³ Luft. Bei einer Messung am Austrag der Gärfeststoffe wurden $4,6 \times 10^5$ anaerobe Gesamtbakterien/m³ Luft und $5,0 \times 10^4$ anaerober Sporenbildner/m³ Luft nachgewiesen. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß separierte Feststoffe bei der Sammlung auf die Filter gespritzt und haften geblieben sind. Nach Untersuchungen von CHAI et al. (1997) werden in Tierställen anaerobe Gesamtbakterienzahlen von $3,2 \times 10^3$ KBE/m³ Luft bis $2,4 \times 10^4$ KBE/m³ Luft ermittelt.

In der Aufbereitungshalle konnte am Sandfang einmal von insgesamt 46 untersuchten Luftproben *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Nachweisrate von 2,17 %. BÖHM et al. (1999) fanden bei Untersuchungen zur Luftkeimemission in verschiedenen Biogasanlagen eine Nachweisrate von 6,25 % für *Clostridium perfringens*. Nach Untersuchungen von CHAI et al. (1997) werden in Tierställen Gehalte an *Clostridium perfringens* von 4 bis 1179 KBE/m³ Luft und in der Außenluft Gehalte von 2 bis 15 KBE/m³ Luft nachgewiesen. Am Meßpunkt „Sandfang“ wird der im angelieferten Bioabfall enthaltene Sand abgeschieden, bevor der im Pulper aufbereitete Bioabfall in die eigentliche Biogasanlage transportiert wird. Welchen Ursprung dieser Keim nun hat, kann nicht abschließend geklärt werden, da sowohl in den Rohmaterialien Bioabfall und Speiseresten, als auch in den Feststoffen und im Prozeßwasser *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden können.

Ob anaerobe Gesamtbakterien bzw. anaerobe Sporenbildner oder *Clostridium perfringens* als Indikator-Keime für die Untersuchungen zur Keimemission und -immission von Anaerobanlagen geeignet sind, müssen erst noch weitere Untersuchungen zeigen. Ob sich daraus auch Möglichkeiten für die Beurteilung gesundheitlicher Risiken von Beschäftigten und für die in der Nähe wohnenden Personen ableiten lassen, wird sich dann erweisen. Schließlich handelt es sich bei den anaeroben Gesamtbakterien und den anaeroben Sporenbildnern um Summenparameter, die keinen Hinweis darauf liefern, ob krankheitsauslösende Keime bzw. deren Bestandteile in der Luft vorhanden sind oder nicht. Als geeignete Indikatoren für Emissionen von Mikroorganismen aus biologischen Abfallbehandlungsanlagen erweisen sich nach NEEF et al. (1999) insbesondere solche, die in Außenluft normalerweise nur in geringen Konzentrationen zu finden sind. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen scheinen anaerobe Gesamtbakterien und anaerobe Sporenbildner geeignete Parameter zu sein, da die Meßwerte in den verschiedenen Funktionsbereichen deutlich über denen des Hintergrundes (Außenluft) lagen. Allerdings wurden auch beim Shreddern von Strukturmaterial (Grüngut) für die Kompostierung der Feststoffe erhöhte Gehalte festgestellt. Bei Untersuchungen zum Luftkeimgehalt in einer kommunalen Kovergärungsanlage fanden HOPPENHEIDT et al. (1999) an Arbeitsplätzen um 1-2 Zehnerpotenzen höhere Gehalte an anaeroben Sporenbildnern. Erhöhte Konzentrationen weisen daher auf bestimmte Emissionsquellen hin (NEEF et al., 1999).

Bedingt durch die Tatsache, daß es sich bei *Clostridium perfringens* um einen bakteriellen Erreger handelt, der hinter den Salmonellen und *Staphylococcus aureus* den 3. Platz einer durch Nahrungsmittel übertragenen Gastroenteritis einnimmt (BÖHM et al., 1999), scheint dieser Parameter für die Beurteilung der Emissionssituation einer Anaerobanlage geeignet zu sein. Außerdem dürfen in einigen europäischen Ländern im Endprodukt der biologischen Abfallbehandlung keine *Clostridium perfringens* enthalten sein (BÖHM, 1999). Inwieweit jedoch ein gewisses Krankheitsrisiko durch aerogene Aufnahme von *Clostridium perfringens* bei Arbeitnehmern in biologischen Abfallbehandlungsanlagen, insbesondere in Anaerobanlagen besteht, kann nur durch umfangreiche Messungen in Verbindung mit arbeitsmedizinischen Untersuchungen geklärt werden. Nach neueren Untersuchungen von BÖHNEL und LUBE (2000) kann nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise der Gebrauch von Bioabfallkompost ein gewisses Krankheitsrisiko darstellt, an Botulismus zu erkranken, zumal in 50 % der untersuchten Kompostproben *Clostridium botulinum*-Bakterien nachgewiesen werden und es außerdem zu einer Anhäufung von Sporen in der Umwelt kommen kann.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint *Clostridium perfringens* nicht als Indikator-Keim sinnvoll zu sein, wenngleich er in der Luft nachgewiesen werden kann. Es ist jedoch nicht möglich, nachzuvollziehen, wo der Keim ursprünglich herkommt. Da *Clostridium perfringens* sowohl in den Rohmaterialien als auch in den Feststoffen und im Prozeßwasser nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 9). Es kann somit keine Aussage getroffen werden, ob es aufgrund des Vergärungsprozesses zu einer Freisetzung kommt, oder aufgrund von anlagenspezifischen Besonderheiten (das Prozeßwasser wird nach der Vergärung wieder für die Aufbereitung des Bioabfalls im Pulper verwendet).

Für die Durchführung von Emissions- und Immissionsmessungen für Bioaerosole gibt es derzeit keine Normen und Richtlinien. Lediglich bei Messungen zum Arbeitsschutz finden die TRBA 405 (ANONYM, 2001b), TRBA 430 (ANONYM, 2001a) und TRBA 211 (ANONYM, 2001c) Anwendung. Die TRBA 405 (ANONYM, 2001b) gibt Empfehlungen für die Bestimmung der Konzentration von Bakterien und Pilzen in der Luft in Arbeitsbereichen und für die Anwendung von technischen Kontrollwerten zur Überprüfung der Wirksamkeit von technischen Schutzmaßnahmen, sowie Empfehlungen zur Vorgehensweise zur Planung und Durchführung von Messungen. In der TRBA 430 (ANONYM, 2001a) wird das Sammelverfahren (Filtration), der Probentransport, der Nachweis (Analyse) des mikrobiologischen Parameters „Schimmelpilze“ und die Interpretation der Ergebnisse geregelt. Es ist jedoch in Abhängigkeit von der Meßaufgabe u. U. möglich, andere Verfahren, wie das Impingement oder die Impaktion für die Messung luftgetragener Schimmelpilze einzusetzen. Insbesondere ist das Messen der Bakterienkonzentration mit dem Filtrationsverfahren nach GÖTTLICH et al. (1999) aufgrund einer nicht ausreichenden Sammeleffizienz kritisch zu beurteilen. Weiter ist zu berücksichtigen, daß der Einsatz von unterschiedlichen Sammelverfahren zur Messung luftgetragener biologischer Arbeitsstoffe zu unterschiedlich starken Schwankungen führen kann. Dies muß dann bei der Interpretation von Meßergebnissen berücksichtigt werden. Deshalb müssen je Meßpunkt genügend Wiederholungen (Proben und Meßtage) durchgeführt werden, um die Schwankungsbreite der Meßwerte möglichst genau zu erfassen. Die Anzahl der Messungen in diesen Untersuchungen reicht für eine abschließende Bewertung zu Keimemissionen aus Biogasanlagen nicht aus. Die TRBA 211 (ANONYM, 2001c) hat zum Ziel, Schutzmaßnahmen in biologischen Abfallbehandlungsanlagen festzulegen, um die Exposition von Beschäftigten gegenüber biologischen Arbeitsstoffen und damit die Gefährdung durch diese zu minimieren. Dazu zählen u. a.:

- der Anlieferungsbereich ist so zu gestalten, daß angeliefertes Material, das nicht sofort verarbeitet wird, baulich getrennt gelagert und über Fördereinrichtungen dem Behandlungsprozeß zugeführt werden kann,
- der Anlieferungsbereich für flüssige Abfälle zur Vergärung ist so zu gestalten, daß eine Aerosolbildung vermieden wird,
- aus dem Anlieferungsbereich sollten keine kontaminierten Luftströmungen in Arbeitsbereiche gelangen,
- wenn die Gefährdung durch luftgetragene biologische Arbeitsstoffe nicht durch bauliche, technische und organisatorische Maßnahmen verringert werden kann, ist geeigneter Atemschutz zur Verfügung zu stellen.

Wie aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen hervorgeht, kann es zu Luftströmungen aus dem Anlieferungsbereich heraus und in die Aufbereitungshalle hinein kommen, die aber keinen

ständigen Arbeitsplatz darstellt (vgl. Tabelle 7, thermophile Actinomyceten, Gesamtschimmelpilzzahl). In der Speiseabfallanlieferung wurde eine hohe Grundbelastung im Vergleich zu den Hintergrund-Werten gemessen, die sich durch das Abkippen von Speiseresten in die Edelstahlwanne nochmals erhöht. Hier könnte durch das Anbringen einer ankoppelbaren Schlauchverbindung, mit einem Deckel über der Edelstahlwanne, die Aerosolbildung vermieden werden.

Der in der TRBA 211 festgelegte Technische Kontrollwert von $5,0 \times 10^4$ mesophilen Schimmelpilzen/m³ Luft wurde insgesamt nur zwei mal überschritten, in der Aufbereitungshalle am Sandfang und am Radlader. Da diese Meßpunkte keine ständigen Arbeitsplätze darstellen, ist von keiner Gefährdung für das Personal auszugehen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß sehr viele Faktoren die Ergebnisse, die bei lufthygienischen Untersuchungen gewonnen wurden, beeinflussen. Zu den wichtigsten gehören das angewandte Sammelverfahren, die Zusammensetzung des Aerosols (Anteil biogener/abiogener Bestandteile), die meteorologischen Verhältnisse und die angewandten Nachweismethoden. Die Summe all dieser Einflußfaktoren führt zu den immer wieder festzustellenden, erheblichen Schwankungen beim Nachweis luftgetragener Mikroorganismen. Diese werden jedoch selbst bei vollständiger Standardisierung der Sammelverfahren und Nachweismethoden nicht vollständig zu beseitigen sein.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte geklärt werden, ob ein möglicher quantitativer Zusammenhang zwischen den verschiedenen Substraten und der Umgebungsluft abgeleitet werden kann. Dabei hat sich gezeigt, daß bei Arbeiten, bei denen Material bewegt wird, die Konzentrationen an Bakterien und Pilzen in der Luft zunehmen. Ferner ergeben sich Hinweise auf einen Einfluß der Jahreszeit auf den Luftkeimgehalt (vgl. Tabelle 5-7, Gesamtbakterienzahl, Gesamtschimmelpilzzahl und *Aspergillus fumigatus*). Auch KÜHNER et al. (2001) kommen zu dem Schluß, daß die Emissionen stark über die Jahreszeit variieren, und sich in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Inputmaterials verändern. Die Frage einer möglichen Gefährdung der Anwohner und der Umwelt durch Keimemissionen aus Biogasanlagen kann nicht abschließend beantwortet werden. Die in den vergangenen Jahren von verschiedenen Autoren durchgeführten Messungen zur Emission und Immission luftgetragener Mikroorganismen aus Kompostierungsanlagen kommen alle zu dem Schluß, daß schon in kurzen Entfernungen zu den Anlagen die Luftkeimgehalte (Bakterien und Pilze) in Konzentrationsbereichen liegen, die sich nur geringfügig von den Werten der Außenluft unterscheiden. Anaerobanlagen haben nach PHILIPP (1999) Vorteile im Emissionsverhalten besonders hinsichtlich einer frachtbezogenen Beurteilung der Emissionen, da wichtige Anlagenteile bzw. Funktionsbereiche eingehaust sind (gasdichte Fermenter). Werden in mesophil betriebenen Biogasanlagen die separierten Feststoffe gemäß den Anforderungen der BioAbfV (ANONYM, 1998) zur Erzeugung eines seuchenhygienisch einwandfreien Endproduktes anschließend in Mieten kompostiert, werden sich die Vorteile der Anaerobanlagen im Emissionsverhalten vermutlich wieder egalisieren. Nach Untersuchungen von HELLER & RABE (2001) führen keimfreisetzende Betriebsaktivitäten in offenen und teil-eingehausten Kompostierungsanlagen zu erhöhten Immissionskonzentrationen im Umfeld der Anlagen.

6 Schlußfolgerungen

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, werden Mikroorganismen, die im Substrat enthalten sind, auch in der Luft nachgewiesen. Deshalb ist in biologischen Abfallbehandlungsanlagen immer mit Keimen in der Umgebungsluft zu rechnen, die vom Substrat in den Aerosolzustand übergegangen sind.

Da sich die Untersuchungen nur auf eine Anlage, die Bioabfälle und Speiseabfälle zu Biogas vergärt, beschränkten, können keine Aussagen über die Emission von luftgetragenen Keimen aus Anlagen getroffen werden, die andere Substrate verarbeiten, wie z. B. Gülle und Bioabfälle oder Gülle und Flotate u. ä. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

Da die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Luftkeimgehalte die lufthygienische Situation zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellen und es immer wieder starke Schwankungen der Emissionen gibt, sind Wiederholungsmessungen dringend erforderlich, die möglichst über das ganze Jahr verteilt, stattfinden sollten.

Die anaerobe Gesamtbakterienzahl und die anaeroben Sporenbildner scheinen geeignete Indikator-Keime für die Beurteilung der Emissionssituation von Biogasanlagen zu sein. Ob sich diese Parameter allerdings auch für die Beurteilung der Immissionen eignen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Methode zum Nachweis von *Clostridium perfringens* sollte optimiert werden. Dabei soll v. a. die Frage geklärt werden, ob durch den anaeroben Probentransport die Nachweisraten von *Clostridium perfringens* zu erhöhen sind.

Um neben infektiösen auch mögliche sensibilisierende und toxischen Wirkungen von biogenen Emissionen zu erfassen, ist nicht nur die Zahl der kultivierbaren Mikroorganismen zu bestimmen, sondern deren Gesamtgehalt (Lebend-tot-Bestimmung) sowie evtl. toxische Metabolite, wie Endotoxine, Exotoxine und Mykotoxine.

Die Standardisierung der Meßmethoden, wie z. B. die angewandten Sammelverfahren und die Aufarbeitung der Proben im Labor, muß weiter voran getrieben werden, damit die Ergebnisse von verschiedenen Untersuchern besser zu vergleichen sind. Dabei sollten auch molekularbiologische Verfahren berücksichtigt werden.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchungen war die Erfassung der Keimgehalte in der Umgebungsluft verschiedener Funktionsbereiche in einer Anaerobanlage mit Feststoffseparierung, um prüfen zu können, ob sich Unterschiede zur Emissionssituation im Vergleich zu Kompostierungsanlagen ergeben, die vom Substrat und von der Jahreszeit abhängen.

Die Messungen erfolgten in der Bioabfall- und Speiseabfallanlieferung, in der Aufbereitungshalle, am Gärfeststoff-Austrag, beim Shreddern von Strukturmaterial, am Biofilter und am Sickerwasserbehälter, wobei hauptsächlich in der Aufbereitungshalle und am Gärfeststoff-Austrag gemessen wurde.

Mit dem Filtrationsverfahren unter der Verwendung des PGP-Sammlers und des MD-8-Sammelkopfes wurden die Gesamtbakterienzahl, Gesamtschimmelpilzzahl, der Gehalt an thermotoleranten Schimmelpilzen, an *Aspergillus fumigatus* und die Anzahl thermophiler Actinomyceten bestimmt. Weiter wurde die anaerobe Gesamtbakterienzahl, der Gehalt an anaeroben Sporenbildnern und *Clostridium perfringens* ermittelt.

Die Keimmessungen der Umgebungsluft der verschiedenen Funktionsbereiche zeigten generell höhere Konzentrationen während den Arbeitsvorgängen mit Materialbewegung. Die Anlieferungsbereiche für Bioabfall und Speiseabfall erreichten Werte, vergleichbar mit den Werten aus Kompostierungsanlagen. Anaerobe Bakterien und anaerobe Sporenbildner konnten in allen Bereichen in höheren Konzentrationen im Vergleich zu den Hintergrund-Werten festgestellt werden. In einer Luftprobe wurde *Clostridium perfringens* nachgewiesen.

Anaerobe Gesamtbakterien und anaerobe Sporenbildner scheinen geeignet zu sein, die Emissionssituation einer Anaerobanlage zu charakterisieren.

Keime, die im Inputmaterial nachzuweisen sind, finden sich auch in der Umgebungsluft der verschiedenen Funktionsbereiche einer Anaerobanlage bei Arbeiten mit Materialbewegung.

8 Literaturverzeichnis

ANONYM (1994): Anforderungen an sichere Arbeitsplätze in Wertstoffsortieranlagen. Erlaß zum Arbeitsschutz des Niedersächsischen Sozialministeriums

ANONYM (1995): Leitlinien des Arbeitsschutzes in Wertstoffsortieranlagen. Länderausschuß für Arbeitsschutz und Sicherheitstechnik (LASI), LV 1, Hessisches Ministerium für Frauen, Arbeit und Sozialordnung, 65187 Wiesbaden

ANONYM (1997): Leitlinien für den Arbeitsschutz in biologischen Abfallbehandlungsanlagen. Länderausschuß für Arbeitsschutz und Sicherheitstechnik (LASI), LV 13, Hessisches Ministerium für Frauen, Arbeit und Sozialordnung, 65187 Wiesbaden

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 (2001a): Verfahren zur Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe TRBA 430, Bundesarbeitsblatt, Nr. 8, 79-83

ANONYM (2001b): Anwendung von Meßverfahren für luftgetragene biologische Arbeitsstoffe. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe TRBA 405, Bundesarbeitsblatt, Nr. 8, 58-61

ANONYM (2001c): Biologische Abfallbehandlungsanlagen: Schutzmaßnahmen. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe TRBA 211, Bundesarbeitsblatt, Nr. 8, 83-89

BÖHM, R. (1998): Grundsätzliche Probleme, die mit der Erfassung von Bioaerosolen und der Interpretation der Meßergebnisse verbunden sind. In: BÖHM, R.; J. UNSHELM (Hrsg.): Bericht der Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, 25. - 26. März, München, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 203-209

BÖHM, R. (1999): Begründung der Hygieneregelungen und vergleichbare Regelungen in anderen Ländern. In: BÖHM, R. (Hrsg.): Bericht des 7. Hohenheimer Seminars: Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfall-Verordnung in Deutschland, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 31-47

BÖHM, R.; ABESSER, A.; R. HAUMACHER; W. MARTENS; W. PHILIPP; (1996): Bericht zu den lufthygienischen Untersuchungen auf der Mülldeponie Würmstal. Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim

BÖHM, R.; R. HAUMACHER; A. ABESSER; W. MARTENS; W. PHILIPP (1997): Bericht zu lufthygienischen Untersuchungen im Kompostwerk Neuburg a. d. Donau. Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim

- BÖHM, R.; W. MARTENS; P. M. BITTIGHOFER (1998): Aktuelle Bewertung der Luftkeimbelastung in Abfallbehandlungsanlagen. M.I.C. Baeza-Verlag, Witzenhausen, 1. Auflage
- BÖHM, R.; A. KNIE; R. HAUMACHER; W. MARTENS; W. PHILIPP (1999): Untersuchungen zur Emission von Keimen aus Biogasanlagen. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben O. Nr. UVM 1005/54687 (98), Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim
- BÖHNEL, H.; K. LUBE (2000): *Clostridium botulinum* and bio-compost. A contribution to the analysis of potential health hazards caused by bio-waste recycling. J. Vet. Med. B **47**, 785-795
- BRITZIUS, E. (1982): Lufthygienische Untersuchungen zur Keimemission von Mülldeponien. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim
- CHAI, T.; W. MÜLLER; B.-A. ZUCKER (1997): Untersuchungen zum Luftkeimgehalt in Tierställen - 1. Mitteilung: Der anaerobe Luftkeimgehalt in einem Kälberstall unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium perfringens*. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **110**, Nr. 1, 1-4
- COLE, E. C.; K. K. FOARDE; K. E. LEESE; D. A. GREEN; D. L. FRANKE; M. A. BERRY (1994): Assessment of fungi in carpeted environments. In: SAMSON, R. A.; B. FLANNIGAN; M. E. FLANNIGAN; A. P. VERHOEFF; O. C. G. ADAN; E. S. HOEKSTRA (Edits.): Health implications of fungi in indoor environments, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, Vol. 2, 103-128
- DANNENBERG, G.; D. FANTA; S. GERBL-RIEGER; R. THELEN; R. SIMON (1998): Luftkeimkonzentrationen in Wertstoffsortieranlagen. In: BÖHM, R.; J. UNSHELM (Hrsg.): Bericht der Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, 25. - 26. März, München, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 103-114
- DONHAM, K. J. (1991): Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. American Journal of Veterinary Research **52**, No. 10, 1723-1730
- EIKMANN, T.; R. HOFMANN (1999): Vorwort. In: EIKMANN, T.; R. HOFMANN (Hrsg.): Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Bd. **30**
- EIKMANN, T.; C. HERR; J. MACH; A. B. FISCHER; F. TILKES; A. ZUR NIEDEN; S. HARPEL; P. KÄMPFER; A. NEEF; A. ALBRECHT; R. H. BÖDEKER (1999): Mikrobiologische Emissionen aus Kompostierungsanlagen und ihre umweltmedizinische Relevanz für die Anwohner. In: EIKMANN, T.; R. HOFMANN (Hrsg.): Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Bd. **30**, 195-209
- FACK, T. (1998): Hygienischer Status in Kompostierungsanlagen im Hinblick auf die Luftkeimsituation. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim

FACK, T.; W. PHILIPP (1994): Ergebnisse lufthygienischer Untersuchungen. In: BÖHM, R. (Hrsg.): Bericht des 5. Hohenheimer Seminars: Nachweis und Bewertung von Keimemissionen bei der Entsorgung von kommunalen Abfällen sowie spezielle Hygieneprobleme der Bioabfallkompostierung. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Gießen, 244-255

FANTA, D.; G. DANNEBERG; S. GERBL-RIEGER; R. THELEN; R. SIMON (1999): Messungen zur Ausbreitung von luftgetragenen Mikroorganismen am Beispiel von fünf biologischen Abfallbehandlungsanlagen. In: EIKMANN, T.; R. HOFMANN (Hrsg.): Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 104, Bd. 30, 627-653

FOLMSBEE, M.; K. A. STREVETT (1999): Bioaerosol concentration at an outdoor composting center. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **49**, No. 5, 554-561

GERBL-RIEGER, S.; D. FANTA; G. DANNEBERG; R. THELEN; R. SIMON (1998): Messungen zur Ausbreitung luftgetragener Keime aus Kompostwerken und Anaerobanlagen. In: BÖHM, R.; J. UNSHELM (Hrsg.): Bericht der Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, 25. - 26. März, München, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 115-148

GÖTTLICH, E.; K.-H. ENGESSER; D. BARDTKE (1994): Emission von Pilzsporen in Müllverarbeitungsanlagen. In: BÖHM, R. (Hrsg.): Bericht des 5. Hohenheimer Seminars: Nachweis und Bewertung von Keimemissionen bei der Entsorgung von kommunalen Abfällen sowie spezielle Hygieneprobleme der Bioabfallkompostierung. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Gießen, 64-75

GÖTTLICH, E.; E.-M. BECK; R. BÖHM; G. DANNEBERG; S. GERBL-RIEGER; R. HOFMANN; A. KOCH; M. KÜHNER; V. KUMMER; K. LIEBL; W. MARTENS; T. MISSEL; A. NEEF; U. PALMGREN; R. RABE; B. SCHILLING; F. TILKES; P. WIESER (1999): Erfassung von luftgetragenen kultivierbaren Mikroorganismen aus Kompostierungsanlagen - Emission und Immission. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* **59**, Nr. 6, 209-217

HELLER, D.; R. RABE (2001): Ausbreitung von Bioaerosolen aus Kompostierungsanlagen unterschiedlicher Bauart. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* **61**, Nr. 6, 245-253

HERR, C.; P. M. BITTIGHOFER; J. BÜNGER; T. EIKMANN; A. B. FISCHER; C. GRÜNER; H. IDEL; A. ZUR NIEDEN; U. PALMGREN; H.-J. SEIDEL; H.-G. VELCOVSKY (1999): Wirkung von mikrobiellen Aerosolen auf den Menschen. In: EIKMANN, T.; R. HOFMANN (Hrsg.): Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Bd. 30, 403-481

HESSE, I. E. A.; W. FLUK; W. PHILIPP; D. STRAUCH (1992): Bakteriologische Untersuchungen an Entsorgungseinrichtungen geschlossener WC-Anlagen in Reisezugwagen. *Forum Städte-Hygiene* **43**, 331-337

HOF, H. (2000): Bakteriologie. In: HOF, H.; R. DÖRRIES; R. L. MÜLLER; (Hrsg.): Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 237-449

HOFMANN, R.; E.-M. BECK; R. BÖHM; G. DANNENBERG; S. GERBL-RIEGER; E. GÖTTLICH; A. KOCH; M. KÜHNER; V. KUMMER; K. LIEBL; W. MARTENS; T. MISSEL; A. NEEF; U. PALMGREN; R. RABE; B. SCHILLING; F. SCHNEIDER; F. TILKES; P. WIESER (1999): Erfassung von luftgetragenen kultivierbaren Mikroorganismen aus Kompostierungsanlagen - Emission und Immission: In: EIKMANN, T.; R. HOFMANN (Hrsg.): Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Bd. **30**, 245-320

HOPPENHEIDT, K.; P. HIRSCH; A. KOTTMAIR; H. NORDSIECK; M. SWEREV; W. MÜCKE (1999): Gemeinsame Vergärung von Bio- und Gewerbeabfall. EP-Entsorgungs-Praxis mit AbfallwirtschaftsJournal **17**, Nr. 6, 13-20

HUNTER, C. A.; R. G. LEA (1994): The airborne fungal population of representative british homes. In: SAMSON, R. A.; B. FLANNIGAN; M. E. FLANNIGAN; A. P. VERHOEFF; O. C. G. ADAN; E. S. HOEKSTRA (Edits.): Health implications of fungi in indoor environments. Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, 141-153

KNIE, A.; W. PHILIPP; W. MARTENS; R. BÖHM (2001): Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikator-Bakterien und -Viren im Anaerob-Prozess. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben UTOX 98009, Untersuchungen zur Seuchen- und Phytohygiene in Anaerobanlagen, Teil 2 A: Untersuchungen zur Inaktivierung von Indikatororganismen in anaeroben Kofermentation-sanlagen, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim

KÜHNER, M.; J. MEZGER; H. HANDL; K. FISCHER; W. MARTENS; R. HAUMACHER (2001): Entwicklung eines neuartigen Meßkonzeptes zur Erfassung und Bewertung der Gesamtemissionssituation für Anlagen der Bioabfallbehandlung. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben AZ 08990, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft, Universität Stuttgart, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim

KUTZNER, H. J.; A. KEMPF (1994): Emission von Actinomyceten-Sporen in Kompostwerken und anderen Müll verarbeitenden Anlagen. In: BÖHM, R. (Hrsg.): Bericht des 5. Hohenheimer Seminars: Nachweis und Bewertung von Keimemissionen bei der Entsorgung von kommunalen Abfällen sowie spezielle Hygieneprobleme der Bioabfallkompostierung. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 76-99

LEVETIN, E.; R. SHAUGHNESSY; E. FISHER; B. LIGMAN; J. HARRISON; T. BRENNAN (1995): Indoor air quality in schools: exposure to fungal allergens. *Aerobiologia* **11**, No. 1, 27-34

MARTENS, W.; A. FESSEL; R. HAUMACHER; K. K. KÖHLER; C. MAYR; W. PHILIPP; R. WITZIGMANN; R. BÖHM (1998): Untersuchungen zu Keimemissionen bei der Sammlung von Restmüll, Bioabfällen und Papier. In: BÖHM, R.; J. UNSHELM (Hrsg.): Bericht der Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, 25. - 26. März, München, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 29-74

MARTENS, W.; M. MARTINEC; R. ZAPIRAIN; M. STARK; E. HARTUNG; U. PALMGREN (2001): Reduction potential of microbial, odour and ammonia emissions from a pig facility by biofilters. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **203**, No. 4, 335-345

MISSEL, T.; J. HARTUNG; B. SCHAPPLER-SCHEELE (1998): Keimbelastung an Arbeitsplätzen von Biokompostieranlagen. In: BÖHM, R.; J. UNSHELM (Hrsg.): Bericht der Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, 25. - 26. März, München, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 75-102

NEEF, A.; A. ALBRECHT; F. TILKES; S. HARPEL; C. HERR; K. LIEBL; T. EIKMANN; P. KÄMPFER (1999): Messungen zur Ausbreitung von luftgetragenen Mikroorganismen im Umfeld von Kompostieranlagen. In: EIKMANN, T.; R. HOFMANN (Hrsg.): Stand von Wissenschaft, Forschung und Technik zu siedlungshygienischen Aspekten der Abfallentsorgung und -verwertung, Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Bd. **30**, 655-664

PFIRRMANN (1994): Untersuchungen zum Vorkommen von luftgetragenen Viren an Arbeitsplätzen in der Müllentsorgung und -verwertung. *Agrarwiss. Diss.*, Universität Hohenheim

PHILIPP, W. (1996): Die Bedeutung kommunaler Rest- und Abfallstoffe bei der Verbreitung bakterieller Zoonosenerreger. In: BÖHM, R. (Hrsg.): Bericht des 6. Hohenheimer Seminars „Vorbeugemaßnahmen bei der Zoonosenbekämpfung“, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Gießen, 68-88

PHILLIP, W. (1999): Zusammenfassender Forschungsreport zum Forschungsvorhaben O. Nr. UVM 1005/54687 (98) „Untersuchungen zur Emission von Keimen aus Biogasanlagen“. Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim

PULVERER, G. (1993): *Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie für Krankenpflegeberufe*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 3. Auflage

RAHNER, A.; W. WIENAND (1995): Luftkeimzahlbestimmung in Lebensmittelbetrieben. *Tierärztl. Umschau* **50**, Nr. 9, 594-601

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

SCHALLEHN, G. (1994): Die Sporenbildner. In: BRANDIS, H.; H. J. EGGERS; W. KÖHLER; G. PULVERER: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 7. Auflage, 522-541

SCHAPPLER-SCHEELE, B. (1996): Arbeitsschutzproblematik bei Kompostierungsanlagen aus gewerbeärztlicher Sicht - Untersuchungen und Ergebnisse von Kompostanlagen. In: 53. Informationsgespräch des ANS in Delmenhorst/Ganderkesee: Hygieneaspekte bei der biologischen Abfallbehandlung. ANS-Heft 32, 93-112

SCHAPPLER-SCHEELE, B.; T. MISSEL (1999): Gefährdungsanalyse von Keimemissionen in Kompostierungsanlagen und arbeitsmedizinische Relevanz für die Praxis - Ergebnisse einer Untersuchung von 42 Kompostierungsanlagen. In: WIEMER, K.; M. KERN (Hrsg.): Bio- und Restabfallbehandlung III, biologisch - mechanisch - thermisch, M.I.C. Baeza-Verlag, Witzhausen, 223-252

SCHMIDT, B. (1994): Bakteriologische Untersuchungen zur Keimemission an Arbeitsplätzen in der Müllentsorgung und -verwertung. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim

SEEDORF, J.; J. HARTUNG (1999): Untersuchungen zum Rückhaltevermögen eines Biofilters und eines Biowäschers für Bioaerosole an zwei Schweineställen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**, Nr. 12, 444-447

SIGSGAARD, T.; P. MALMROS; L. NERSTING; C. PETERSEN (1994): Respiratory disorders and atopy in danish refuse workers. American Journal of Respiratory Critical Care Medicine **149**, 1407-1412

STALDER, K. (1993): Konsequenzen für biologisch-mechanische Aufbereitungssysteme im Rahmen der TA Siedlungsabfall. In: WIEMER, K.; M. KERN (Hrsg.): Biologische Abfallbehandlung, Kompostierung - Anaerobtechnik - Kalte Vorbehandlung, M.I.C. Baeza-Verlag, Witzhausen, 277-287

WANNER, H. U. (1975): Mikrobielle Verunreinigung der Luft durch Belebtschlammbecken. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161, 46-53

Anhang

Verwendete Geräte:

Anaerobiertöpfe: BBL Becton Dickinson, Heidelberg, Art.-Nr. 4360607
Anaerobierdeckel: BBL Becton Dickinson, Heidelberg, Art.-Nr. 4360610
Gesamtstaubsammelkopf PGP und personengetragene Pumpe PPS EX, Modell HFS-513A:
Fa. Ströhlein GmbH & Co., Kaarst, Art.-Nr. L95DOPP5EX
MD-8-Sammelkopf: Fa. Sartorius AG, Göttingen

Verwendete Sammelmedien:

Cellulose-Nitrat-Filter: Fa. Sartorius AG, Göttingen, Art.-Nr. 13004-80-ALN
Cellulose-Nitrat-Filter: Fa. Sartorius AG, Göttingen, Art.-Nr. 11304-37-N
Gelatine-Filter: Fa. Sartorius AG, Göttingen, Art.-Nr. 17528-80-ACD
Gelatine-Filter: Fa. Sartorius AG, Göttingen, Art.-Nr. 12602-37-ALK
Polycarbonat-Filter: Fa. Infiltec GmbH, Speyer, Art.-Nr. 1215623

Verwendete Nährmedien:

Actinomycete Isolation Agar: Fa. Difco Becton Dickinson, Heidelberg, Art.-Nr. 0957-17
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CSA): Fa. Oxoid GmbH, Wesel, Art.-Nr. CM 131
Columbia Agar Basis: Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr. 1.10455
Dichloran-Glycerin-Agar-Base: Fa. Oxoid GmbH, Wesel, Art.-Nr. CM 729
Fluid Thioglycollate Medium, USP (FTG): Fa. Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Art.-Nr. 225630
Kochfleisch-Bouillon: Fa. BBL Becton Dickinson, Heidelberg, Art.-Nr. 4311128
Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (Basis) (TSC): Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr. 1.11972

Sonstige Präparate, Testseren und Chemikalien:

Actidion 98%: Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Art.-Nr. C10,445-0
Anaerob-Indikatorstreifen: Fa. BBL Becton Dickinson, Heidelberg, Art.-Nr. 4370504
Anaerocult[®] A: Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr. 1.13829
Api 20 A: Fa. bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Art.-Nr. 20 300
Chloramphenicol-Lösung 20 %: Fa. cp-pharma, Burgdorf, Reg.-Nr. 89489
Clostridium perfringens Selektiv-Supplement: Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr. 1.00888
Glycerin: Fa. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Art.-Nr. 75332
NaCl, reinst: Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr. 1.06400
Schafblut, defibriniert: Fa. Oxoid GmbH, Wesel, Art.-Nr. SR 0051 C
Tween 80 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat): Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Art.-Nr. 27,436-4