

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 Tierkörperenteile, 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.