



Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Physiologisches Institut,
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

**Niedersächsisches Ministerium
für Ernährung, Landwirtschaft,
Verbraucherschutz und Landesentwicklung
Calenberger Str. 2
30169 Hannover**

Physiologisches Institut

Leiter:

Prof. Dr. Gerhard Breves
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel. +49 511 856-7271

Fax +49 511 856-7687

gerhard.breves@tiho-hannover.de

Ihre Nachricht vom | Ihr Zeichen

Meine Nachricht vom | Mein Zeichen

Datum

Hannover, 13.03.2012

Abschlussbericht zu

**Einschätzung des Risikopotenzials der Biogastechnologie in
mikrobiologischer Hinsicht**

Hintergrund und Ziel der Studie

In den letzten Jahren sind Biogasanlagen zunehmend Gegenstand des seuchenhygienischen Interesses geworden. Ursache hierfür ist die mögliche Anreicherung pathogener Clostridien und insbesondere von Neurotoxin bildenden *Clostridium botulinum*-Stämmen in den Gärrückständen der Biogasanlagen. Zu diesem vor allem in der Öffentlichkeit und in den Medien intensiv diskutierten Thema liegen nur wenige Publikationen in anerkannten wissenschaftlichen Zeitschriften vor, in denen Studienergebnisse zu dieser Thematik dargestellt werden

Bei den Biogasanlagen handelt es sich um Systeme zum Abbau organischer Substanzen unter Bildung von Biogas zur Energiegewinnung. Die Gärrückstände werden auf landwirtschaftlichen Nutzflächen verbracht. Sie sind somit Bestandteil des natürlichen Kreislaufs der Natur. In den Biogasanlagen wird ein breites Spektrum organischer Substanzen verarbeitet. Dazu gehören Einstreu/Gülle von verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben, Futterpflanzen, Getreide- und Getreideprodukte, Küchenabfälle, verdorbene Lebensmittel sowie andere Reststoffe aus der Lebensmittelverarbeitung. Allein von verdorbenen Lebensmitteln werden ca. 500.000 t jährlich in Biogasanlagen entsorgt und damit zur Biogaserzeugung genutzt.

Zu Versachlichung der Diskussion in der Öffentlichkeit und zur Verbesserung bzw. Erweiterung des wissenschaftlichen Kenntnisstandes war es daher Ziel der Studie, an einer repräsentativen Stichprobe von Gärsubstraten und Gärresten aus in Niedersachsen betriebenen Biogasanlagen den Nachweis von pathogenen Clostridien und des Botulinum-Toxins zu führen. Diese Untersuchungen sollten die Grundlage schaffen, um das Gefährdungspotenzial der Biogastechnologie aus belastbaren Daten abzuschätzen. Angesichts der gegenwärtigen intensiven Diskussionen zum generellen mikrobiologischen Risikopotenzial sollten über die Clostridienbestimmungen hinaus im Probenmaterial Bestimmungen zum Gesamtkeimgehalt (Aerobier und Anaerobier) sowie zu weiteren pathogenen Indikatorkeimen (z. B. Salmonellen) vorgenommen werden.

Auswahl der Biogasanlagen und Probengewinnung

In die Studie wurden insgesamt 15 Biogasanlagen einbezogen, von denen jeweils 5 Anlagen aus Ackerbauregionen, aus Milchviehregionen und aus Veredelungsregionen stammten. Die Auswahl der Anlagen sowie die Probengewinnung erfolgten über Mitarbeiter/Mitarbeiterinnen des Kompetenzzentrums Niedersachsen 3N. Von jeder Anlage wurden jeweils an aufeinanderfolgenden Tagen 4 Proben der Gärsubstrate (Rohstoffe) und 3 Proben der Gärreste (Gärrückstände) entnommen (Probenmenge jeweils ca. 500g) und bis zum Versand an das Untersuchungslabor bei 4°C gelagert. Nach Entnahme aller Proben erfolgte der Versand an das RIPAC-LABOR, Potsdam, zur mikrobiologischen und toxikologischen Untersuchung. Der Produktionstyp der geprüften Anlagen sowie die eingesetzten Gärsubstrate sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1 Anlagentyp und Substrateinsatz

| Anlagentyp | Input |
|------------|---|
| A1 | 100% Mais |
| A2 | 100% Mais |
| A3 | 100% NaWaRo |
| A4 | 100% Mais |
| A5 | 100% NaWaRo |
| B1 | 70% Rindergülle, Futterreste |
| B2 | 30% Rindergülle, Rest Mais |
| B3 | >80% Graseinsatz, Rest Rindergülle |
| B4 | >70% Rinderfestmist, Kuh- & Schweinegülle, Rest Mais |
| B5 | mind. 30% Rindergülle, Rest Mais |
| C1 | 70% Mais, ZR, 30% Schweinegülle |
| C2 | 70% Mais, 30% Sauen- Ferkel & Mastschweinegülle |
| C3 | 50% Mais, Rest Grünroggen, Zuckerhirse, Schweinegülle |
| C4 | 70% Mais, 30% Mastschweinegülle, teilw. HTK |
| C5 | 70% Mais, 30% Gülle |

Untersuchungsmethodik

Anzüchtungsverfahren

Das Untersuchungsschema ist unter besonderer Berücksichtigung von *Cl. botulinum* aus Abbildung 1 ersichtlich.

Von jeder Probe wurde eine Bestimmung der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahl vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Proben in 10er Potenzen bis 10^{-8} verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe sind vier Columbia-Blutagarplatten mit 7,5% Schafblutzusatz mit je 0,2 ml beimpft und je zwei Platten 48 Stunden bei 30°C für die aerobe Gesamtkeimzahlbestimmung bzw. 96 Stunden bei 37°C für die anaerobe Gesamtkeimzahlbestimmung bebrütet worden.

Außerdem wurde von jeder Verdünnungsstufe zum direkten Nachweis von Enterobakterien (EHEC, Salmonellen, u.a.) eine Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agarplatte nach Gassner, eine Brillantgrün-Phenolrotagarplatte und zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen eine Sabouraud-Dextroseagarplatte mit Zusatz von Chloramphenicol beimpft, 48h bei 37°C bzw. 96 h bei 30°C bebrütet. Da *Clostridium perfringens*- Sporen nicht bzw. nur selten auf Anaerobierplatten wachsen ist von jeder Verdünnungsstufe zusätzlich 1

mal in eine Leber-Leber-Bouillon (Leberstücke mit Leberbrühe) beimpft und anschließend 24 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet worden. Außerdem wurde von jeder Verdünnungsstufe ein 1ml Anreicherungsmedium in verflüssigten Hochschicht-Eisensulfitagar nach Angelotti gegeben und 48h bei 37°C bebrütet, wobei *Clostridia* spp. eine Schwarzfärbung verursachten.

Ablesen der Platten und Isolierung relevanter Keime

Entsprechend den bei Keimzahlbestimmungen üblichen Untersuchungsmethoden erfolgte die Auszählung der Kolonien nur von den Platten, auf denen der Keimgehalt $\geq 10 \leq 100$ KBE/Platte betrug. Da von jeder Verdünnungsstufe zwei Platten beimpft worden sind, ist von den beiden Platten der algebraische Mittelwert gebildet worden.

Zum Zweck des Ablesens wurde die Mikroflora der Oberflächenkulturen mit dem Auflichtmikroskop bei 3-15 facher Vergrößerung durchmustert. Dabei wurden die Kolonien auf der Grundlage der jahrzehntelangen diagnostischen Erfahrung des ablesenden Tierarztes beurteilt. Die verschiedenen Kolonietypen wurden gezählt, so dass sie auch quantitativ bewertet werden konnten. Von den vorherrschenden typischen Kolonien der physiologischen Umweltmikroflora, von Kolonien bekannter hygienisch relevanter Indikatorkeime (z.B. Enterokokken, *E. coli* u.a.), von Kolonien verdächtiger pathogener Erreger sowie neuartiger unbekannter Keime wurden Reinkulturen auf Columbiablutagar abgeimpft. Die Bebrütung erfolgte 48-96 h bei 37°C unter anaeroben bzw. mikroaerophilen Bedingungen je nach den Anzuchtungsbedingungen der Primärplatten.

Abbildung 2 zeigt das Prinzip der Ablesung, Bewertung, Auszählung und Differenzierung verdächtiger Kolonien der Probe B2S1 einer anaerob bebrüteten Columbiablutagarplatte der Verdünnungsstufe 1:10 und aus Abbildung 3 sind die Kolonien der Columbiablutagarplatte der mikroaerophil bebrüteten Columbiablutagarplatte der Verdünnungsstufe 1:10⁶ der Probe B1S4 und die Dendrogramme der isolierten Stämme ersichtlich.

Zum Zweck des Nachweises von Salmonellen wurden 25ml Untersuchungsmaterial im Verhältnis von 1:10 in ein Voranreicherungsmedium (gepufferte Peptonbouillon) gegeben, über Nacht 18-24h bei 37°C angereichert und danach in Kaliumtetrathionatbouillon (1ml KTA-Bouillon Verhältnis 1:10) sowie Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RV, 1ml Verhältnis 1:100) verimpft, über Nacht bei 37°C bebrütet und ausschließlich fraktioniert auf Brillantgrünphenolrotagar (BGP-Agar) und XLD-Agar ausgestrichen. Außerdem wurde aus der ersten Anreicherungsstufe 1 ml in je ein Röhrchen KTA-Bouillon oder ein frisches RV-Medium im Verhältnis 1:10 bzw. 1:100 gegeben, über Nacht angereichert und dann Subkulturen wie bei der ersten Anreicherung auf BGP-Agar und XLD-Agar fraktioniert angelegt. Diese sogenannte „fraktionierte Anreicherung“ wurde 5mal über 5 Tage fortgeführt.

Differenzierung der isolierten Kulturen

Die Differenzierung der isolierten Stämme erfolgte auf der Grundlage phänotypischer und morphologischer (Färbung nach Gram) Eigenschaften, Prüfung der Beweglichkeit im „hängenden Tropfen“ sowie konventioneller Verfahren zur Prüfung des biochemischen Leistungsvermögens und mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie (**Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry**). Für die Durchführung der Differenzierung mittels MALDI-TOF- Verfahren stand ein SHIMADZU-AXIMA-Confidence-Gerät zur Verfügung. Von jeder Probe wurden 5-42 Stämme je nach Keimspektrum mittels MALDI-Verfahren differenziert, wobei auch ausgewählte Stämme von bereits mittels konventioneller Verfahren identifizierter Kulturen einer Überprüfung mit dem MALDI-Verfahren unterzogen worden sind.

Von *Clostridium perfringens*- Stämmen wurde wegen der spezifischen phänotypischen Wuchsform in der Regel keine Bestätigung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie vorgenommen. Die Stämme wurden unmittelbar nach Öffnung der Anaerobiertöpfe in Leber-Bouillon verimpft, 8-12 h bei 37°C bebrütet, anschließend zur Prüfung des Toxinbildungsvermögens im Verhältnis 1:1 in MALTOSE- Kalb-Fleischbouillon nach Nishida und Nakagawara verimpft und 18h bei 37°C bebrütet. Danach wurde der α - Toxintiter in einem Eigelbmedium mit Zusatz von 50% 2%iger CaCl_2 -Lösung (Lezithovitellin-Test) im Verdünnungsverfahren bestimmt.

Die Feststellung der Toxingene α , β_1 -, β_2 -, ϵ - und j-Toxin von *Clostridium perfringens* und die Bestimmung der Toxintypen A-E erfolgte mittels PCR nach Meer und Songer (1997). Zusätzlich wurde eine Untersuchung auf β_2 - Toxin (cpb2) und netB-Toxingen ebenfalls mittels PCR nach Gibert et al. (1997) und Keyburn et al. (2008) vorgenommen.

Nachweis Neurotoxin bildender *Clostridium botulinum* Stämme

Zwecks Nachweis Neurotoxin bildender *Clostridium botulinum*- Stämme wurden von jeder Rohstoff- und Gärrückstandsprobe ca. 0,5g Untersuchungsmaterial in ein die Toxinbildung von *Clostridium botulinum* förderndes Spezialmedium (cooked meat-medium) verimpft und 7 Tage anaerob bei 30°C und bei 37°C bebrütet. Danach ist der Überstand keimfrei bei >2000 g abzentrifugiert und im Mäuseletalitäts- und Neutralisationstest hinsichtlich des Vorkommens von spezifischen Neurotoxinen der *Clostridium botulinum*-Typen A-F geprüft worden.

Von *Clostridium botulinum*- verdächtigen Kulturen sowie von *Clostridium barati* und *Clostridium butyricum*, bei denen unter bestimmten Bedingungen die Aufnahme von Toxinplasmiden von *Clostridium botulinum* und Neurotoxinbildung von *Clostridium botulinum* Typ E und F in der internationalen Literatur beschrieben worden ist, wurde eine mögliche Neurotoxinbildung durch Verimpfung in Cooked-meat-Medium seine anaerobe Bebrütung 7

Tage bei 28°C und 37°C und anschließende Prüfung der s Mediums auf Neurotoxine von *Clostridium botulinum* im Mäuse-Bioassay ausgeschlossen.

Nachweis von Salmonellen

Die Differenzierung Salmonellen-verdächtiger Stämme erfolgte mittels MALDI-TOF-Verfahren, konventionellen biochemischen Methoden und mit spezifischen serologischen Agglutinationsverfahren mit spezifischen O und H-Seren von Salmonellen entsprechend dem Differenzierungssystem nach Kauffmann & White.

Nachweis sonstiger pathogener Erreger

Zusätzlich wurden mit spezifischen routinediagnostischen Untersuchungsmethoden spezielle Untersuchungen zum Nachweis von pathogenen *E. coli*- Stämmen einschließlich EHEC, Riemezellen, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Yersinien, Listerien, Staphylokokken, *Ornithobacterium rhinotracheale*, Hefen und Schimmelpilze u.a. spezifisch pathogenen Erregern von Tierseuchen und Infektionskrankheiten durchgeführt.

Ergebnisse

Gesamtkeimzahlen in Rohstoff- und Gärrestproben In der Tabelle 2 sind die aeroben/mikroaerophilen und anaeroben Gesamtkeimgehalte der 105 Rohstoff- und Gärrestproben für jeden Anlagentyp zusammengefasst.

Tabelle 2: Bestimmung der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen

| KBE/g | durchschnittliche Gesamtkeimzahl | | | | | |
|--------------|----------------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | aerob | anaerob | anaerob | anaerob | gesamt | gesamt |
| | Rohstoffe | Gärreste | Rohstoffe | Gärreste | Rohstoffe | Gärreste |
| Alle Anlagen | 1,35E+07 | 1,63E+07 | 1,00E+07 | 2,74E+06 | 1,18E+07 | 9,51E+06 |
| Anlage A | 1,46E+07 | 1,8E+07 | 1,89E+07 | 3,3E+06 | 1,68E+07 | 1,08E+07 |
| Anlage B | 1,63E+07 | 2,3E+07 | 5,50E+06 | 2,8E+06 | 1,09E+07 | 1,31E+07 |
| Anlage C | 9,72E+06 | 7,2E+06 | 5,60E+06 | 2,1E+06 | 7,66E+06 | 4,65E+06 |

Abbildung 4 zeigt eine säulengrafische Auswertung des aeroben/mikroaerophilen Gesamtkeimgehaltes der Rohstoffproben der 15 geprüften Biogasanlagen und in Abbildung 5 sind die aeroben/mikroaerophilen bakteriellen Konzentrationen der Gärrestproben dargestellt.

Besonders hohe aerob/mikroaerophil wachsende Keimgehalte wiesen die Rohstoffproben A3/S3, B2/S2 und C3/S2 auf. Bei den Gärückstandsproben ließen die Proben B1/R2, A4/R2 und B3/R3 signifikante erhöhte Keimgehalte erkennen. Die Konzentration der

Anaerobiermikroflora der Rohstoffproben ist in Abbildung 6 und die der Gärrückstandsproben in Abbildung 7 ersichtlich.

Die höchsten Konzentrationen von Anaerobiern von $>10^3$ KBE/g bis 5×10^8 KBE/g gelangten in den Rohstoffproben der Biogasanlagen A4 und A5 zur Feststellung (Abb. 6).

Abbildung 8 vergleicht die aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen der Rohstoffproben und Abbildung 9 die der Gärrestproben. Die Befunde suggerieren eine Dominanz der aerob/mikroaerophilen bakteriellen Mikroflora in allen 3 Anlagentypen, sowohl in den Rohstoffproben als auch in den Gärrückstandsproben.

In der Abbildung 10 werden die aeroben und die anaeroben Gesamtkeimzahlen der Rohstoffe und Gärrückstände der Biogasanlagen A, B und C vergleichend gegenüber gestellt. Die Proben der Gärrückstände der Anlagen A und B weisen bei der aeroben/mikroaerophilen Mikroflora um 0,5 – 2,0 Zehnerpotenzen höhere Gesamtkeimgehalte als in den dazugehörigen Rohstoffproben auf, während bei den Anlagen der Gruppe C die Mikroflora der Rohstoffe höhere Konzentrationen als bei den Gärrückständen erkennen ließ. Die Befunde beweisen den überragenden Einfluss der Rohstoffe und Vergärungstechnologie auf die Zusammensetzung und Konzentration der Mikroflora in den Gärrückständen.

Im Gegensatz zur Dominanz der aerob/mikroaerophilen Mikroflora in den Gärresten der Anlagen A und B überwog bei der anaeroben Mikroflora der Keimgehalt der Rohstoffe und der Gärreste nicht nur in den Anlagen A und B, sondern auch in den Anlagen der Gruppe C (Abbildung 10). Wenn man die aeroben/mikroaerophilen und anaeroben Keimgehalte der Rohstoffproben der Anlagen A, B und C addiert und mit der Summe der Keime der Gärreste vergleicht, weist die Anlage A signifikant höhere Keimgehalte bei den Rohstoffen auf, während bei den Anlagen der Gruppe B und C die Gärreste und Rohstoffe weitgehend übereinstimmen (Abbildung 11).

Insgesamt ergaben sich hinsichtlich des Clostridiengehaltes zwischen Rohstoffen und Gärrückständen signifikant höhere Konzentration in den Rohstoffen, dass heißt die Biogasvergärung verhinderte eine relevante Anreicherung seuchenhygienisch relevanter Clostridien (Abbildung 12).

Keimspektrum und seine Nachweishäufigkeit

Abbildung 16A zeigt das Spektrum der 15 häufigsten aeroben/mikroaerophilen *Bacteria spp.*, die in den 105 Rohstoff – und Gärrückstandsproben der drei Anlagentypen A, B und C nachgewiesen werden konnten.

Im Vordergrund standen *Bacillus spp.*, auf die 31% aller Isolate entfielen, davon *Bacillus licheniformis* (8%), *Bacillus cereus*-Gruppe (4%) und sonstige *Bacillus spp.* (19%). Danach folgte *Streptococcus/Enterococcus spp.* (25%). Besonders häufig gelangte *Streptococcus bovis/equinus* zur Feststellung, der in allen Proben nachgewiesen werden konnte (14%). Auf *Enterococcus spp.* entfielen 6% und sonstige *Streptococcus spp.* die keiner spezifischen Spezies zugeordnet wurden, waren mit 5% beteiligt. Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, dass bei den Bakteriendifferenzierungen insgesamt 6 der häufig nachweisbaren aerob/mikroaerophilen wachsende *Bacteria spp.* auftraten, von denen in der Datenbank unseres MALDI-Systems, das zur Zeit immerhin die Identifizierung von mehr als 2000 *Bacteria spp.* erlaubt, keine spezifischen Angaben vorlagen.

Es handelte sich um *Bacteria spp.* folgender Bezeichnungen:

| | | |
|----------------------------|-----|-------|
| Unbekannter Erreger Nr. 0 | 12% | } 36% |
| Unbekannter Erreger Nr. 17 | 8% | |
| Unbekannter Erreger Nr. 32 | 6% | |
| Unbekannter Erreger Nr. 10 | 5% | |
| Unbekannter Erreger Nr. 20 | 3% | |
| Unbekannter Erreger Nr. 13 | 2% | |

Eine detaillierte Übersicht der in Rohstoffen und Biogasgärrückstände der Anlagen A, B und C festgestellten Bakterienarten zeigen die Abbildungen 13 A, B und C.

Clostridia spp.

Insgesamt gelang in den Rohstoffen und Gärresten der Biogasanlagen der Nachweis von 13 bekannten *Clostridien spp.* Die Abbildung 14 zeigt das Spektrum und die Häufigkeit des Nachweises der verschiedenen *Clostridia spp.* in den Rohstoffproben und aus Abbildung 15 ist ihre Verbreitung in den Gärrückstandsproben ersichtlich. Die Clostridienarten *Clostridium perfringens*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, die o.g. neue *Clostridia spp.*, *Clostridium barati*, *Clostridium tertium*, *Clostridium sordellii* und *Clostridium glycolicum* wurden sowohl in den Rohstoffen (Abbildung 14), als auch in den Gärrückständen (Abbildung 15) festgestellt, während der Nachweis von *Clostridium limosum*, *Clostridium septicum* und der lediglich der Gattung *Clostridium* ohne Speziesbestimmung zuordenbaren Clostridien ausschließlich in den Rohstoffen gelang (Abbildung 14). Hinzu kommt eine neue spezifische *Clostridium spp.*, die

sowohl in den Rohstoffen (4%), als auch in den Gärrückständen (7%) festgestellt wurde, und mit dem MALDI-System keiner bekannten Spezies zugeordnet werden konnte. Außerdem entfielen 2% der Isolate auf nicht identifizierbare *Clostridia spp.*, bei denen im MALDI-System lediglich die Zuordnung der Gattung Clostridium gelang.

Die folgende Tabelle 4 vergleicht die Nachweisraten der *Costridia spp.* in Rohstoffen und Gärrückständen:

Tabelle 4: Vergleich des Spektrums und der Nachweisraten der *Clostridia spp.* in Rohstoff- und Gärrückstandsproben in Prozent

| Spezies | Rohstoffe in % | Gärrückstände in % |
|----------------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Clostridium perfringens</i> | 47 | 42 |
| <i>Clostridium bifermentans</i> | 16 | 19 |
| <i>Clostridium barati</i> | 8 | 3 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 8 | 10 |
| <i>Clostridium sporogenes</i> | 4 | 9 |
| Neue <i>Clostridia spp.</i> | 4 | 7 |
| <i>Clostridium tertium</i> | 4 | 1 |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 3 | 7 |
| <i>Clostridium sordellii</i> | 1 | 1 |
| <i>Clostridium glycolicum</i> | 1 | 1 |
| <i>Clostridium limosum</i> | 1 | - |
| <i>Clostridium septicum</i> | 1 | - |
| Sonstige <i>Clostridia spp.</i> | 2 | - |

Abbildung 16 vergleicht die prozentuale Häufigkeit der verschiedenen Clostridia in Gärrückständen und Rohstoffen der Biogasanlagen A, B und C.

Quantitative Bestimmung der *Clostridia spp.*

In Tabelle 5 ist das Spektrum und die Konzentration der *Clostridia spp.* in den Rohstoff- und Gärrückstandsproben detailliert für jede einzelne Probe aufgelistet.

Abbildung 17 vergleicht die Gesamtkeimzahlen der verschiedenen Clostridia in Rohstoff- und Gärrückstandsproben, wobei die Rohstoffe mit Ausnahme von *Clostridium butyricum* und *Clostridium sordellii* bei allen anderen Clostridia spp. (*Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium baratii*) etwas höhere Clostridiengehalte aufweisen als die Gärrückstände. Die Tendenz bestätigte sich bei allen getesteten Anlagentypen A, B und C (Abbildung 18). Die Keimgehalte der in den Rohstoff- und Gärrestproben in unterschiedlicher Häufigkeit und wechselnder Konzentration verbreiteten Clostridienarten wird bei *Clostridium perfringens* in den Rohstoffproben in Abbildung 19 und in den Gärresten in Abbildungen 20 grafisch dargestellt.

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen die Konzentration von *Clostridium bifermentans* in den positiven Rohstoff- und Gärrückstandsproben, in den Abbildungen 23 und 24 sind die Keimgehalte von *Clostridium butyricum* in den Rohstoff- und Gärrückstandsproben dargestellt. Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die entsprechenden Befunde von *Clostridium sporogenes*, Abbildungen 27 und 28 von *Clostridium baratii* und Abbildung 29 von *Clostridium sordelii*.

Toxinprüfung von *Clostridium perfringens* Stämmen

Insgesamt wurden 69 *Clostridium perfringens* Stämme hinsichtlich des Toxinbildungsvermögens untersucht, davon 41 Isolate aus Rohstoffproben und 28 von Gärresten angezüchtete Stämme. Die meisten Isolate stammten aus Rohstoffen und Gärresten der Schweinegülle verarbeitenden Biogasanlagen der Gruppe C (33 Kulturen), wobei aus Proben mit Auftreten von *Clostridium perfringens* – Stämmen und mit uneinheitlicher Koloniemorphologie bzw. abweichende Hämolysezonen auch mehrere Stämme hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögens geprüft worden sind. Die α -Toxinbildung (Lezithinase C) wurde qualitativ und quantitativ im Lezithovittelase-Test (LV) geprüft. Zur Feststellung der Toxinplasmide von β_1 und β_2 , netB, ϵ - und j-Toxin, die ein stabiles Toxinbildungsvermögen gewährleisten, gelangte die Multiplex-PCR zur Anwendung. Alle 69 *Clostridium perfringens*- Stämme konnten dem Toxintyp A zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der Toxin/Plasmidprüfung sind geordnet nach Rohstoff- und Gärrückstands-Stämmen der Biogasanlagen A, B und C in Tabelle 6 summarisch dargestellt.

Die aus den Biogasanlagen der Gruppe A isolierten 4 *Clostridium perfringens*- Stämme, die fast ausschließlich pflanzliche Rohstoffe verarbeiteten, wiesen nur ein geringgradiges α -Toxinbildungsvermögen [≤ 8 Naglereinheiten (NE) pro ml Rohtoxin] auf. Bei 2 von 4 Isolaten gelang der Nachweis des β_2 Toxingens. Im Gegensatz hierzu wiesen 14 der 28 aus Rohstoff- und Gärrückstandsproben isolierten *Clostridium perfringens*- Stämme der Anlagen B, die vor allem Rindergülle vergären, ein mittel- (16-32 NE/ml) bzw. hochgradiges (≥ 64 NE/ml) α -Toxinbildungsvermögen auf (50%). Die Untersuchung auf das β_2 -Toxingen ergab bei diesen Stämmen ausschließlich negative Befunde, was für eine geringe ätiologische Bedeutung dieser Toxinfraktion beim Rind spricht. Im Gegensatz zu den Isolaten der Anlagen A und B waren 11 von 33 *Clostridium perfringens*- Stämmen aus Rohstoff- und Gärrückstandsproben der Anlage des Typs C, die vorwiegend Schweinegülle vergärten, β_2 -Toxingen positiv, 6 Stämme zeichneten sich durch mittel- bis hochgradiges α -Toxinbildungsvermögen aus.

Neurotoxin von *Clostridium botulinum*

Die kulturelle Untersuchung auf *Clostridium botulinum* ergab mit den oben beschriebenen Untersuchungsmethoden ausschließlich negative Befunde, das heißt, es konnte aus keiner Probe weder in der anaeroben Direktkultur noch im Anreicherungsverfahren *Clostridium botulinum* angezüchtet werden.

Die Anreicherung von Neurotoxin durch Verimpfung der Rohstoff- und Gärrückstandsproben in ein die Toxinbildung von *Clostridium botulinum* fördernde Spezialmedium (Cooked meat-Medium) ergab ebenfalls ausschließlich negative Befunde im Mäusebioassay, wobei unspezifische Toxinkonzentrationen von < 10 Dlm (Dosis letalis minima für ca. 25g schwere Mäuse) als negativ bewertet wurden (siehe Tabelle 7).

Die nachträglich durchgeführte Prüfung der isolierten *Clostridium baratii* und *Clostridium butyricum*- Stämme auf Neurotoxinbildung von *Clostridium botulinum* durch Verimpfung dieser Kulturen in cooked meat-medium und ihre anaerobe Bebrütung 7 Tage bei 37°C mit nachfolgender Prüfung der Kulturüberstände auf Neurotoxin von *Clostridium botulinum* wurde ebenfalls bei allen Stämmen mit negativem Ergebnis abgeschlossen.

Salmonellen

Die Untersuchung auf Salmonellen mittels Direktkultur auf Wasserblau-Metachromgelbagar nach Gassner, Brillantgrünphenolrotagar und XCD-Agar sowie nach einfacher Anreicherung in KTA-Bouillon bei 105 Rohstoff- und Gärrückstandsproben wurde mit negativem Ergebnis abgeschlossen. Nach mindestens 3fach fraktionierter Anreicherung wurden in 3 Anlagen positive Befunde festgestellt. Es handelte sich um folgende Proben (siehe Tabelle 8):

Tabelle 8: Übersicht der Salmonellenergebnisse

| Nr. | Anlage | Untersuchungsmaterial | Spezies/Gruppe |
|-----|--------|-----------------------------------|--|
| 4 | A1 | 100% Mais | <i>Salmonella</i> spp. Gruppe C |
| 15 | A2 | Rohstoff NaWaRo | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| 16 | A3 | Rohstoff NaWaRo | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| 21 | A3 | Gärrest NaWaRo | <i>Salmonella montevideo</i> (4. Anreicherung) |
| 57 | B4 | Rohstoff Rindermist/Schweinegülle | <i>Salmonella montevideo</i> |

Bis zur 3. Anreicherung erwiesen sich alle Gärrückstände als Salmonellen negativ. Daher wurden die Gärrückstände nachträglich noch einer hochempfindlichen 4. und 5. Anreicherung unterzogen.

Der Nachweis von Salmonellen gelang dabei nur in einer Gärrückstandsprobe in der 4. Anreicherungsstufe (Probe Nr. 21, Anlage A3). Die übrigen Gärrestproben ergaben auch bei 5fach Anreicherung ausschließlich negative Befunde (siehe Tabelle 8).

Sonstige Erreger von Infektionskrankheiten

Nachweis pathogener Erreger

Neben der Analyse von pathogenen Clostridien wurde mit den Standardkultivierungsbedingungen auch auf bekannte pathogene Erreger untersucht. Folgende pathogene Erreger wurden gefunden bzw. sind geprüft worden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht des Vorkommens pathogener Erreger in Gärresten

| Erreger | Häufigkeit | Anlage | Ätiologische Bewertung |
|--|-----------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| <i>Acinetobacter ursingii</i> | 1 | C2-S1 | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Acinetobacter Iwoffii</i> | 1 | C4-R1 | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | 14 | Alle Anlagen | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Enterococcus cecorum</i> | 5 | Anlagen A und C | S2 Erreger – Septikämie beim Geflügel |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | B5-S2 | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 3 | Alle Anlagen | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | Kein Nachweis | | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Escherichia coli</i> | 12 | Alle Anlagen | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Escherichia coli</i> EHEC | Kein Nachweis | | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Listeria spp.</i> | Kein Nachweis ¹⁾ | | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> | Kein Nachweis | | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 14 | Alle Anlagen | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 2 | Alle Anlagen | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Riemerella spp.</i> | 2 | Anlage B | S2 Erreger – veterinär-pathogen |
| <i>Salmonella enterica</i> Serotyp <i>S. montevideo</i> | 1 | Anlage A3 (Gärrest) | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Kein Nachweis | | S2 Erreger - klinisch relevant |
| <i>Streptococcus bovis/equinus</i> | 105 | Jede Anlage | S2 Erreger – veterinär-pathogen |
| <i>Taylorella equigenitalis</i> | 1 | A1 R3 | S2 Erreger – veterinär-pathogen |
| <i>Yersinien spp.</i> | Kein Nachweis ¹⁾ | | S2 Erreger - klinisch relevant |

¹⁾ es erfolgte keine selektive Kultivierung

Die Untersuchung auf humane EHEC- Stämme (Enterohämorrhagische *E. coli*) ergab sowohl mittels Anzucht auf selektiven Bruttonährböden, als auch nach Anreicherung in Peptonbouillon mit nachfolgender Prüfung mittels PCR ausschließlich negative Ergebnisse. Bei der Differenzierung einer Bakterienkultur, die aus Probe A1R3 isoliert wurde, ergab die Differenzierung im MALDI-System *Taylorella equigenitalis* dem Erreger von Genitalinfektionen und sporadischen Aborten bei Pferden.

Zusammenfassung

1. Die qualitative und quantitative bakteriologische Untersuchung von 105 Rohstoff- und Gärrestproben aus 15 Biogasanlagen Niedersachsens der drei unterschiedlichen Anlagentypen A, B und C ergab sowohl in den Rohstoffproben als auch in den Gärresten ein breit gefächertes Keimspektrum mit einem geringgradigen Übergewicht der aerob/mikroaerophilen Mikroflora.

2. Das Spektrum der in den Rohstoffen und in den Gärrückständen nachgewiesenen *Bacteria spp.* stimmt weitgehend überein, d.h. dass die in den Gärrückständen auftretende Mikroflora weitgehend vom Keimspektrum der Rohstoffe bestimmt wird.

3. Die Häufigkeit der 15 häufigsten mittels MALDI-System identifizierten *Bacteria spp./Gattungen* nahm in folgender Reihenfolge ab (Abb. 16A):

| | | |
|------------------------------------|---|------|
| Sonstige <i>Bacillus spp.</i> | - | 16 % |
| <i>Clostridium perfringens</i> | - | 12 % |
| <i>Streptococcus bovis/equinus</i> | - | 12 % |
| Sonstige unbekannte Erreger | - | 10 % |
| <i>Micrococcus spp.</i> | - | 7 % |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | - | 7 % |
| Unbekannter Erreger Nr. 97 | - | 7 % |
| <i>Enterococcus spp.</i> | - | 5 % |
| Unbekannter Erreger Nr. 32 | - | 5 % |
| Unbekannter Erreger Nr. 10 | - | 5 % |
| Sonstige <i>Sc. spp.</i> | - | 4 % |
| <i>Clostridium bifermentans</i> | - | 3 % |
| <i>Bacillus cereus</i> -group | - | 3 % |
| Unbekannter Erreger Nr. 13 | - | 2 % |
| Unbekannter Erreger Nr. 20 | - | 2 % |

4. Die Gärrückstände wiesen durchweg um 0,5 bis 2,5 Zehnerpotenzen niedrigere Keimzahlen als die Rohstoffe auf, unabhängig vom Anlagentyp.

5. In allen 3 Anlagentypen erreichte der Clostridiengehalt der Gärrückstände nicht den in den Rohstoffen nachgewiesenen Keimgehalt, d.h. bei der Fermentation in den Biogasanlagen wird die Clostridienvermehrung nicht spezifisch begünstigt.

6. Bei der Identifizierung der *Clostridia spp.* gelangten 13 verschiedene *Clostridia spp.* zur Feststellung, wobei 10 Spezies sowohl in den Rohstoffen als auch in den Gärrückständen festgestellt wurden (Tabelle 4).

Die Befunde beweisen die regelmäßige Passagierung der Clostridien von den Rohstoffen zu den Gärrückständen.

7. Die Untersuchung der 105 Rohstoff- und Gärrückstandsproben aus den o. g. 15 Biogasanlagen Niedersachsens auf Neurotoxin bildende *Clostridium botulinum*- Stämme ergab sowohl in den Rohstoffproben als auch in den Gärrückstandsproben ausschließlich negative Ergebnisse. Die kulturellen Anzuchtversuche von *Clostridium botulinum* sind ebenfalls mit negativem Ergebnis abgeschlossen.

8. Die Prüfung der *Clostridium butyricum* und *Clostridium baratii*- Stämme, von denen Botulinum Toxinbildung (Typ E, Typ F) gelegentlich beschrieben worden ist, ergab bei allen isolierten Kulturen atoxische Isolate.

9. EHEC, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* u.a. spezifische pathogene Erreger von Infektionskrankheiten konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

10. Die Untersuchung der Gärrückstandsproben auf Salmonellen mittels hochempfindlicher 3-fach fraktionierter Anreicherung in KTA-Bouillon und im Medium nach Rappaport verlief negativ. Die nachträglich durchgeführte Untersuchung der Gärrückstandsproben auf Salmonellen mittels extrem empfindlicher 5-fach fraktionierter Anreicherung ergab in der vierten Anreicherung in einer Probe der Anlage (A3) den Nachweis von *S. montevideo*.

11. Bei der Prüfung der Toxinbildung der *Clostridium perfringens*- Stämme wurde vor allem in den Anlagen der Gruppe C, die Schweinegülle verarbeiten, ein gehäuftes Vorkommen spezifisch für Schweine pathogener *Clostridium perfringens* Typ A – Stämme mit β_2 – Toxigenen und erhöhter α – Toxinbildung festgestellt.

12. Die Untersuchungsergebnisse in den Biogasanlagen zeigen, dass zwar mit der bakteriellen Passagierung zu rechnen ist, **ohne** dass durch den Vergärungsprozess eine signifikante Anreicherung in den Gärrückständen eintrat.

Abschließende Bewertung der Studie

In der Phase der Planung und Entwicklung dieses Projektes stand die Frage im Mittelpunkt, ob durch den Betrieb von Biogasanlagen ein erhöhtes Risikopotenzial für den Austrag von *Clostridium botulinum*, des Botulinum-Toxins sowie weiterer pathogener Mikroorganismen besteht. Diese Fragestellung sollte an einer repräsentativen Anzahl von Gärsubstraten bzw. Gärresten von in Niedersachsen betriebenen Biogasanlagen untersucht werden, wobei auf der Grundlage der eingesetzten Gärsubstrate zwischen Anlagen in Ackerbau-, Milchvieh- und Veredelungsregionen differenziert werden sollte. Aus den erhobenen Befunden ist zu schließen, dass mit der Ausbringung der Gärreste kein Risikopotenzial hinsichtlich der hier untersuchten Mikroorganismen besteht und dass die Keimdichte in den Gärresten eher geringer als in den Gärsubstraten ist. Daraus ist zu schließen, dass durch den Fermentationsprozess keine Anreicherung von Mikroorganismen sondern eine Hygienisierung der Gärreste zu erwarten ist. Angesichts des begrenzten Umfanges der Gesamtstichprobe sollten zur weiteren Sicherung der Datenlage künftig eine größere Anzahl von Anlagen untersucht werden, wobei insbesondere Anlagen mit Verarbeitung von Geflügelrohstoffen in die Untersuchungen einbezogen werden sollten.

Die hohe Biodiversität der am Fermentationsprozess beteiligten Mikroorganismen und ihre Beeinflussung durch die eingesetzten Gärsubstrate ist ein weiterer wichtiger Befund dieser Studie. Dieser Befund ist zugleich Grundlage für die Empfehlung, in bestimmten Zeitabständen die Gärsubstrate und Gärreste sowie insbesondere die bei Beginn des Fermentationsprozesses eingesetzten Starterkulturen einer mikrobiologischen Untersuchung zu unterziehen, um auf diesem Wege Sicherheit hinsichtlich des möglichen Risikopotenzials zu erreichen.

Abbildung 1 – Untersuchungsschema unter besonderer Berücksichtigung des Nachweises von Clostridium botulinum - Neurotoxin

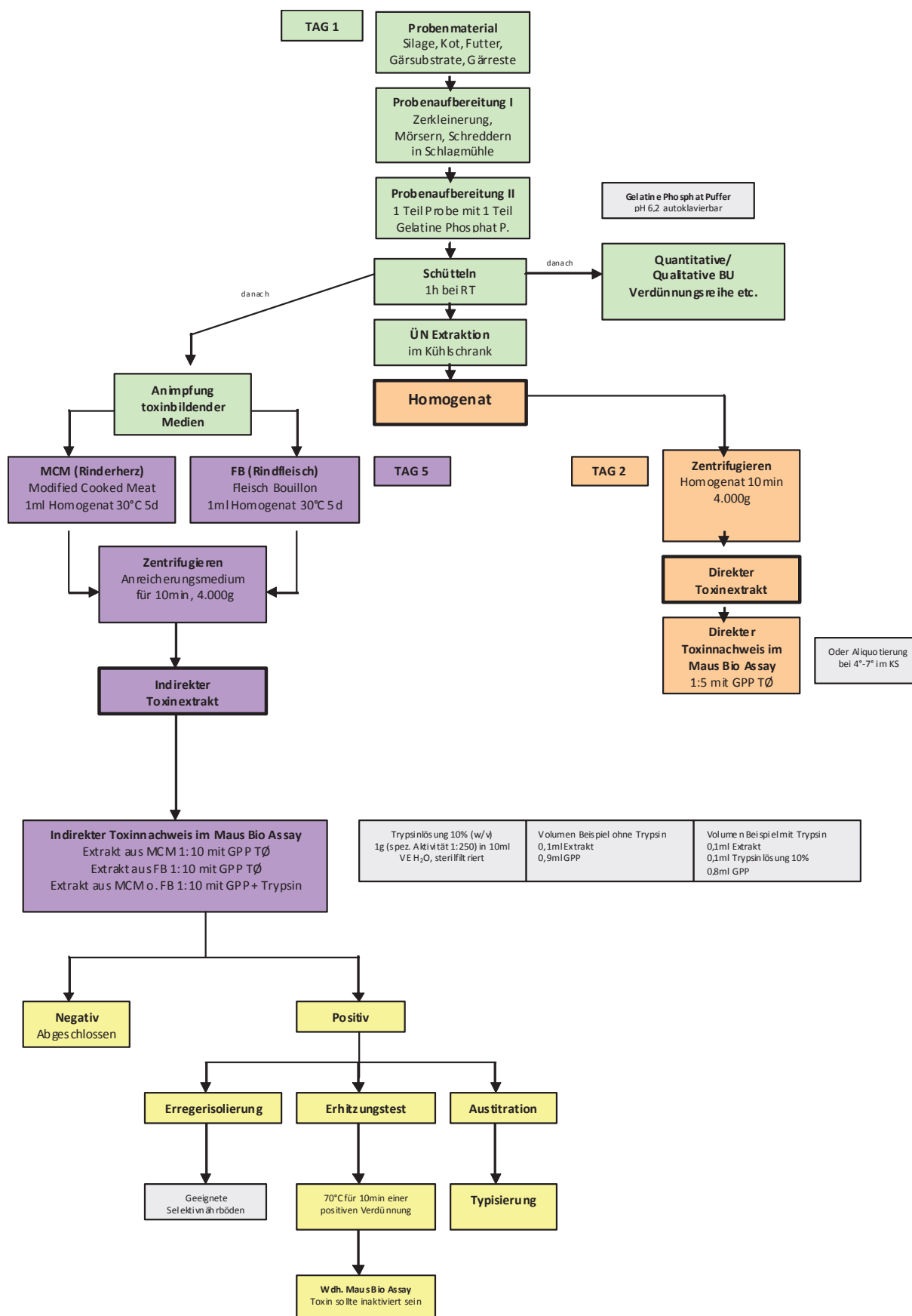


Abbildung 2: Beispiel Diagnostik B2 S1 Verdünnung 10⁵ anaerob

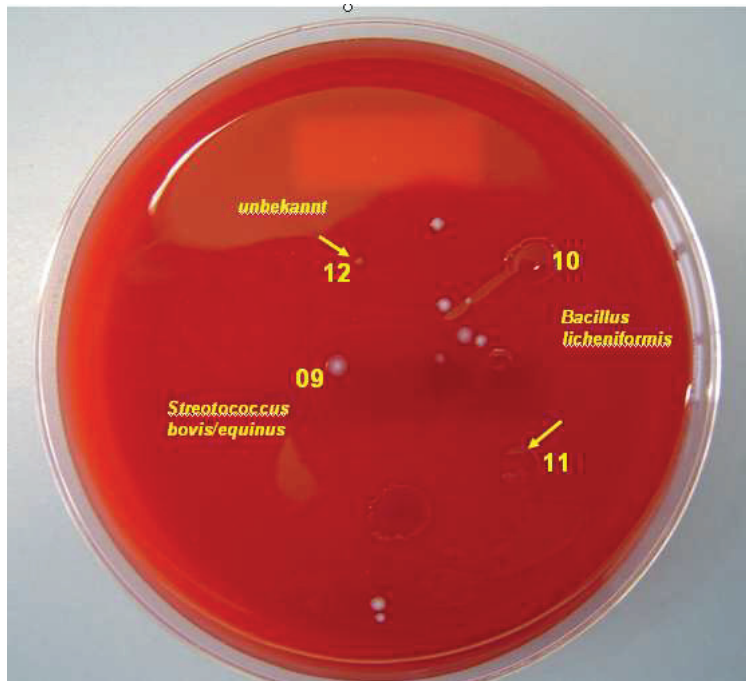


Abbildung 3: Beispiel Diagnostik B1 S4 Verdünnung 10⁶ mikroaerophil

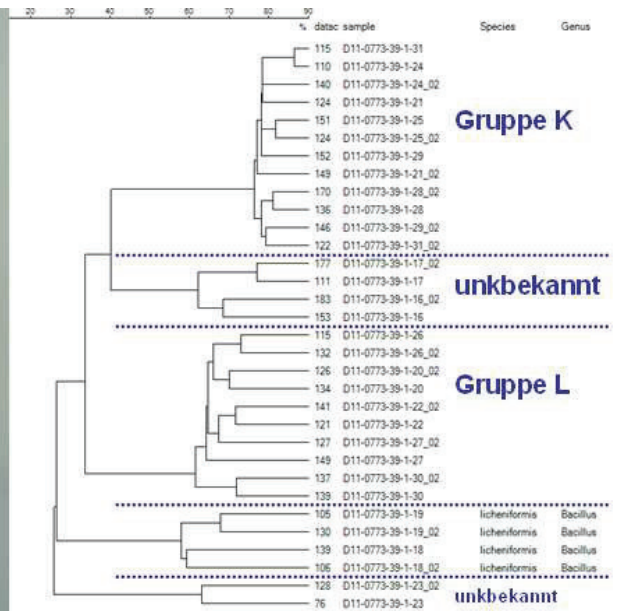
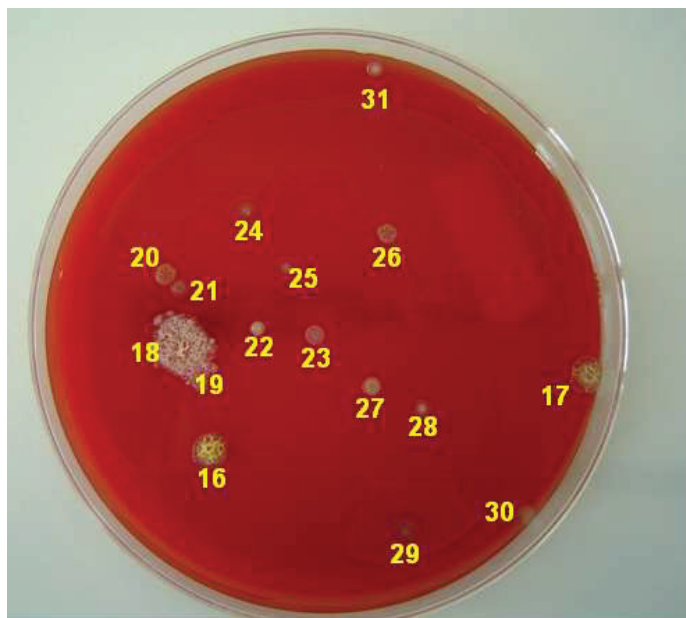


Abbildung 4: Aerobe/mikroaerophile Gesamtkeimzahl der Rohstoffproben von 15 Biogasanlagen

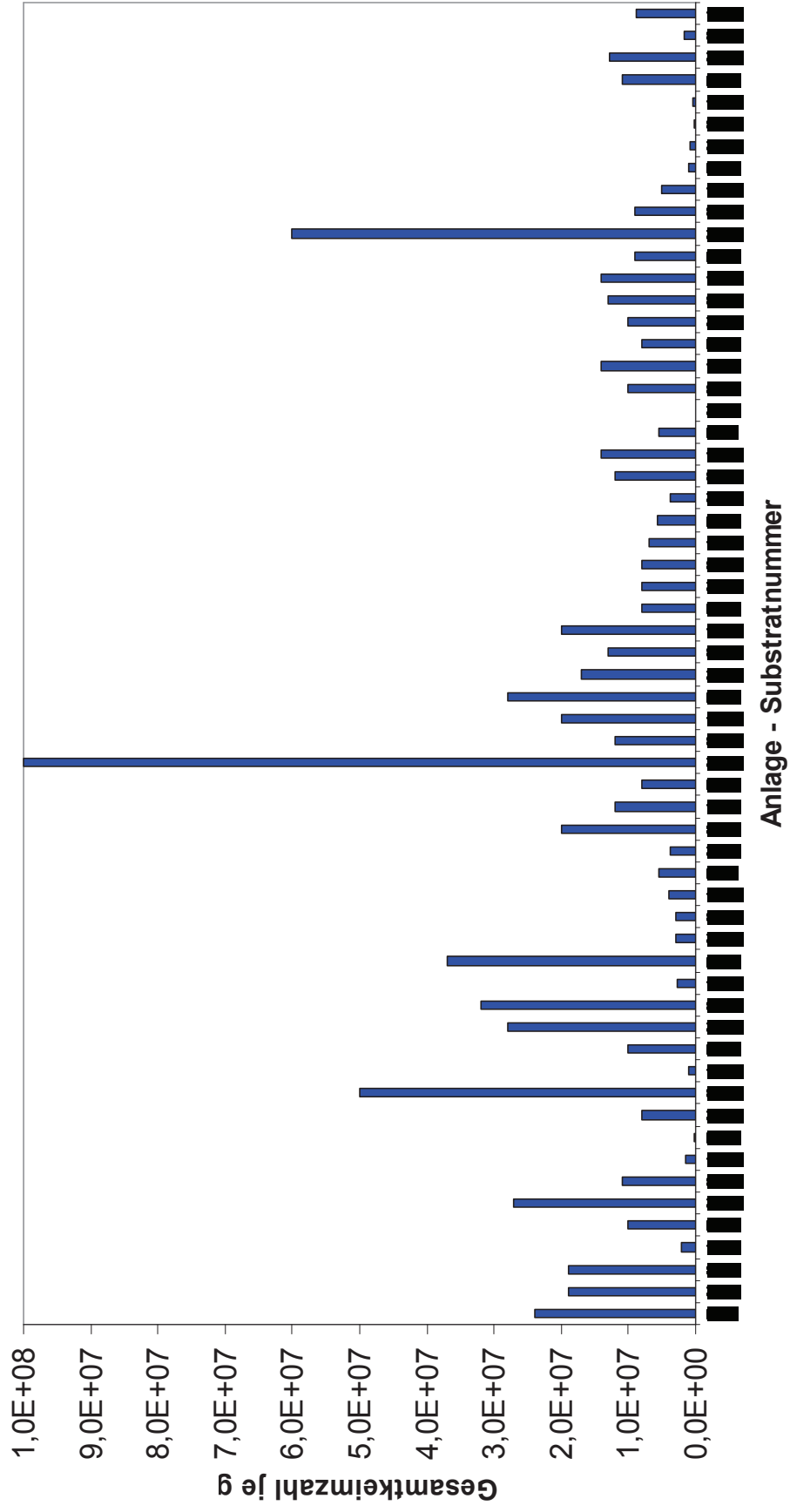


Abbildung 5: Aerobe/mikroaerophile Gesamtkeimzahl der Gärrestproben von 15 Biogasanlagen

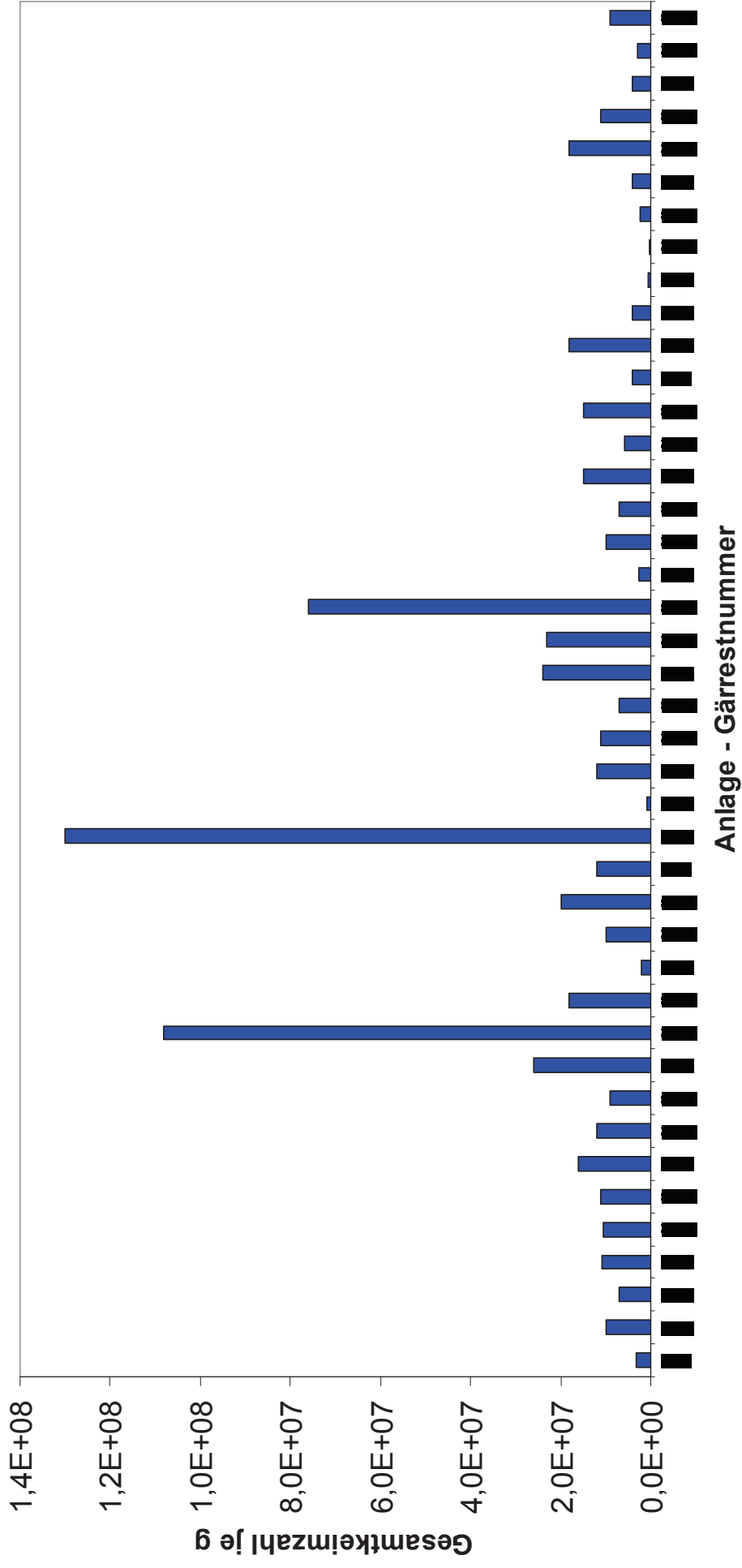


Abbildung 6: Anaerobe Gesamtkeimzahlen der Rohstoffproben

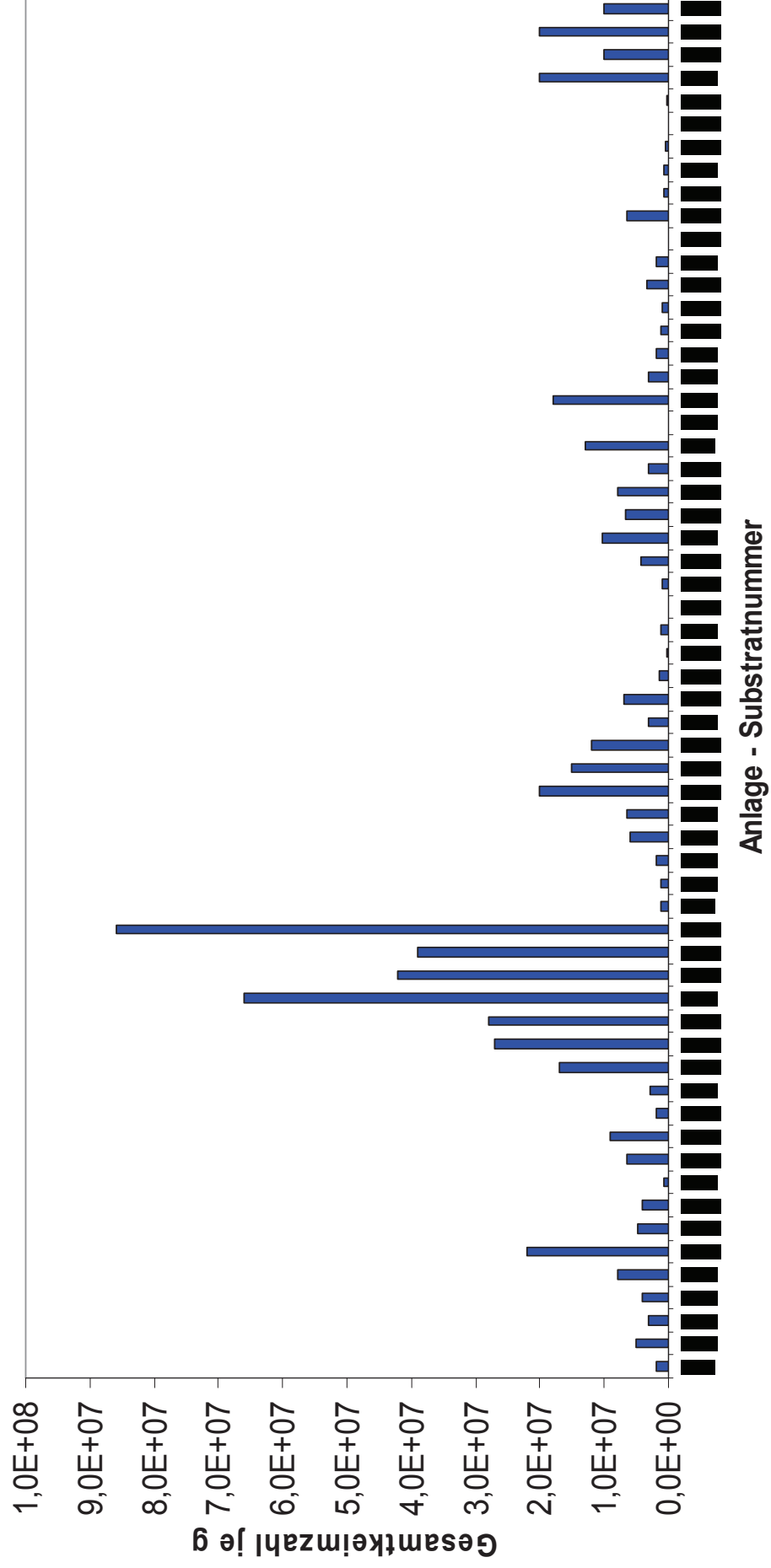


Abbildung 7: Anaerobe Gesamtkeimzahlen der Gärrestproben

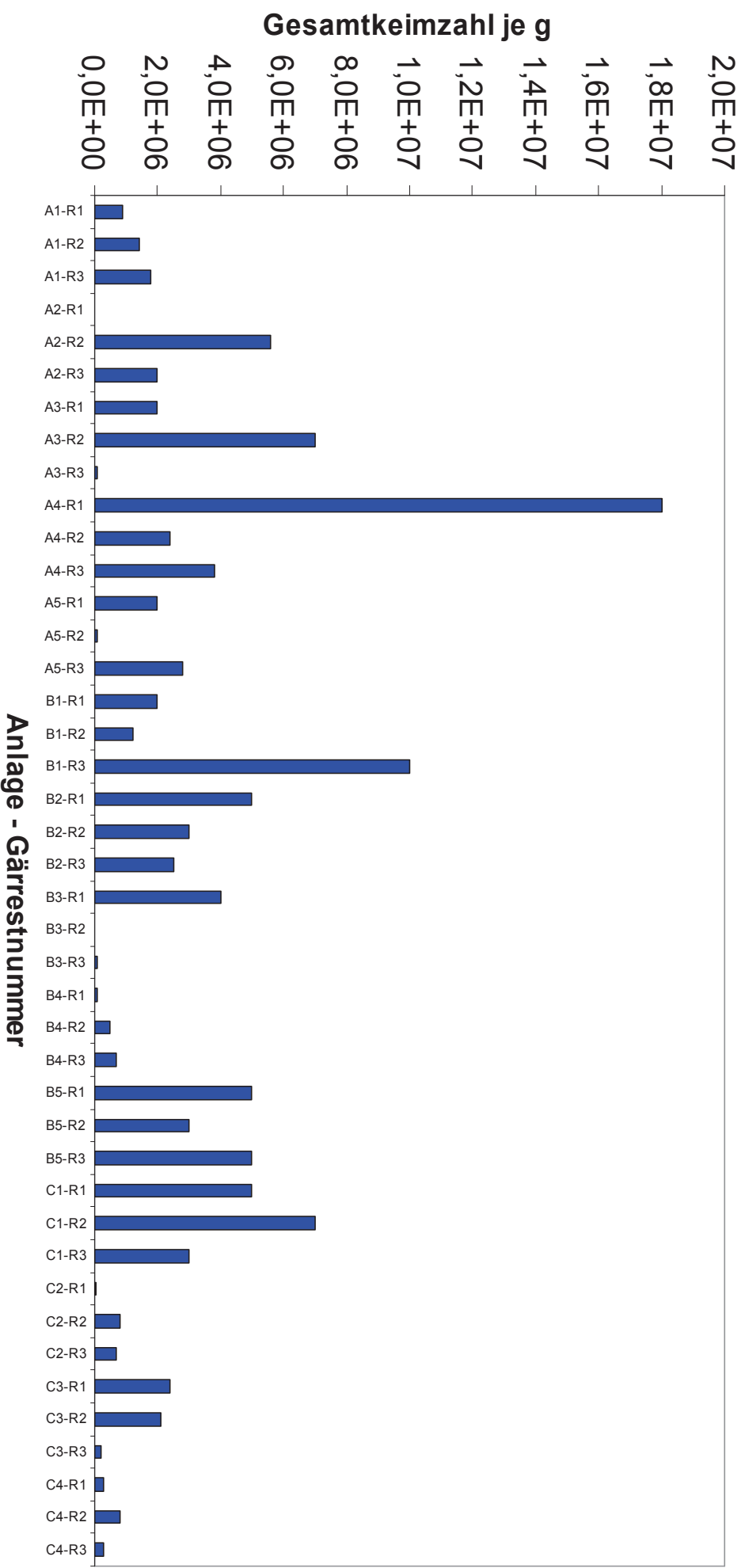


Abbildung 8: Vergleich der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen der Rohstoffproben

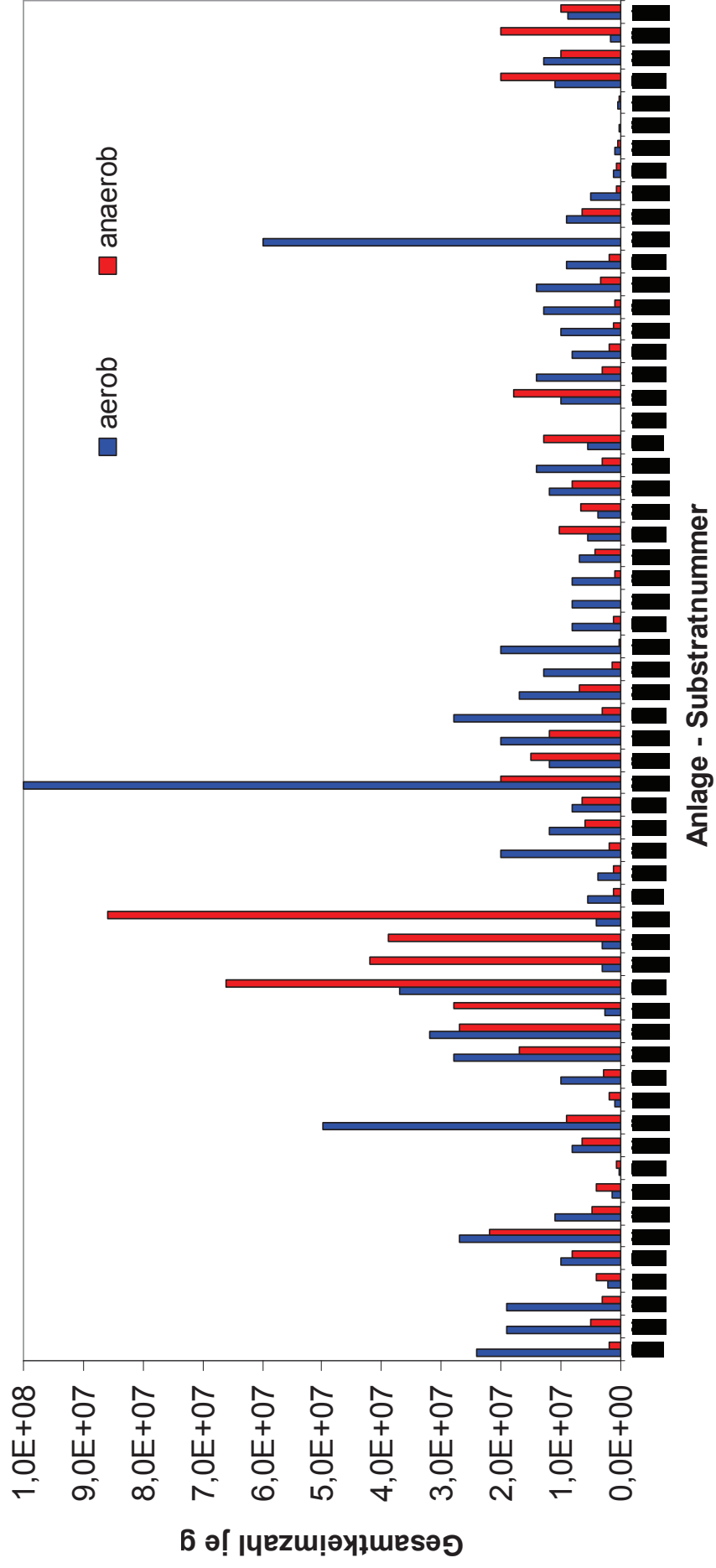


Abbildung 9: Vergleich der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen der Gärrestproben

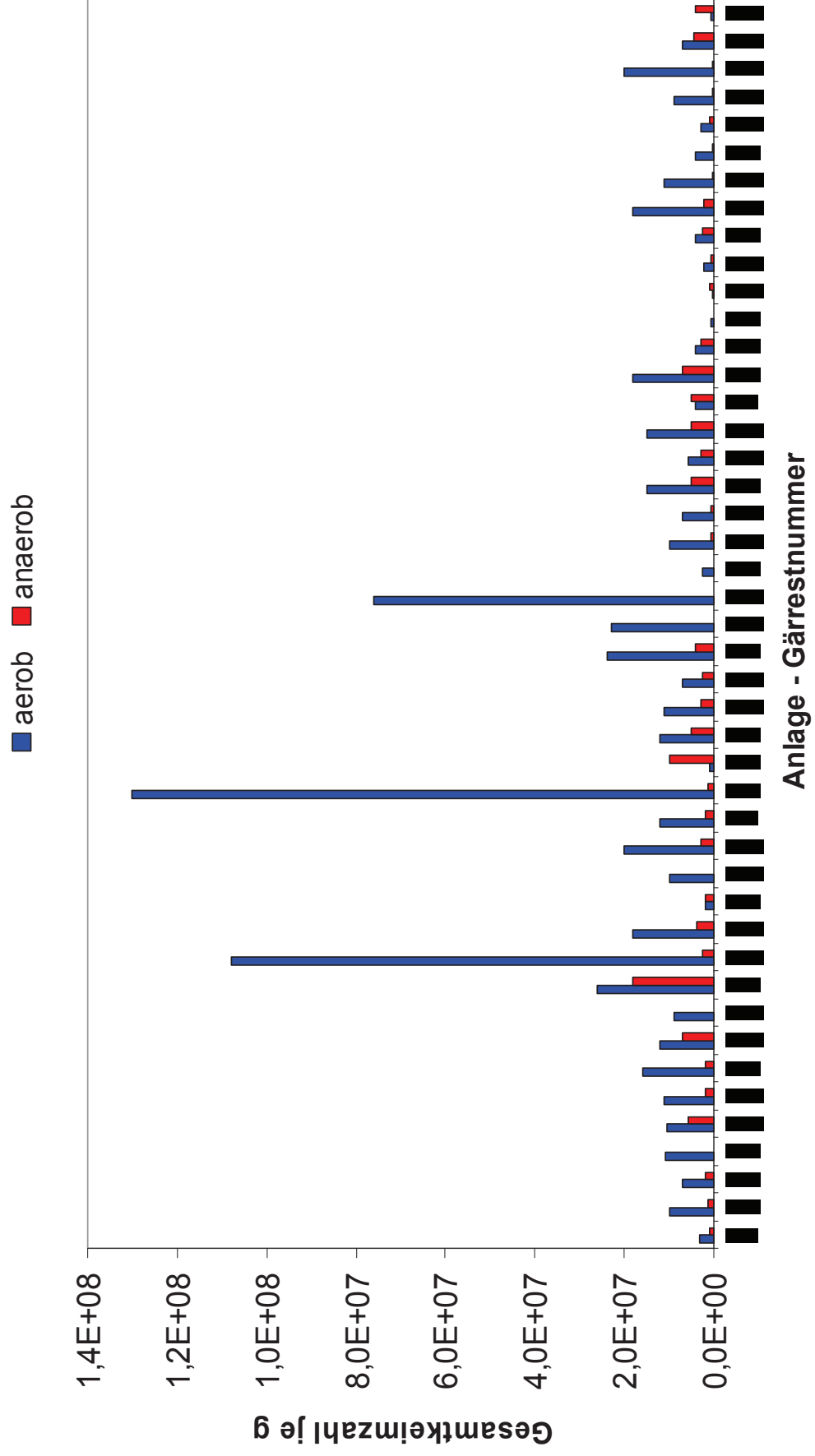


Abbildung 10: Vergleich der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen

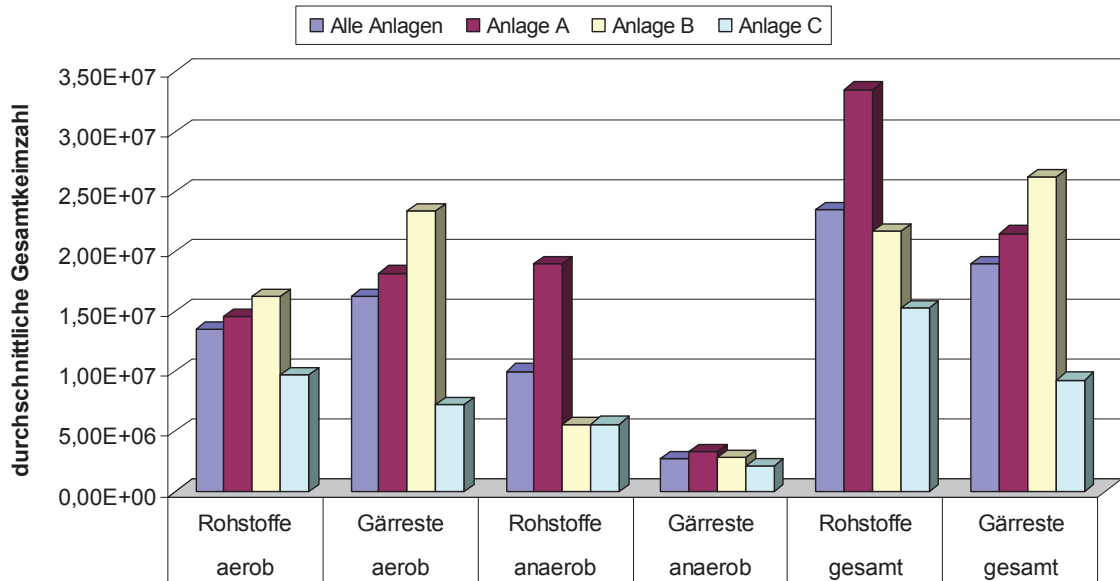


Abbildung 11: Vergleich der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen insgesamt in den Biogasanlagen A, B und C

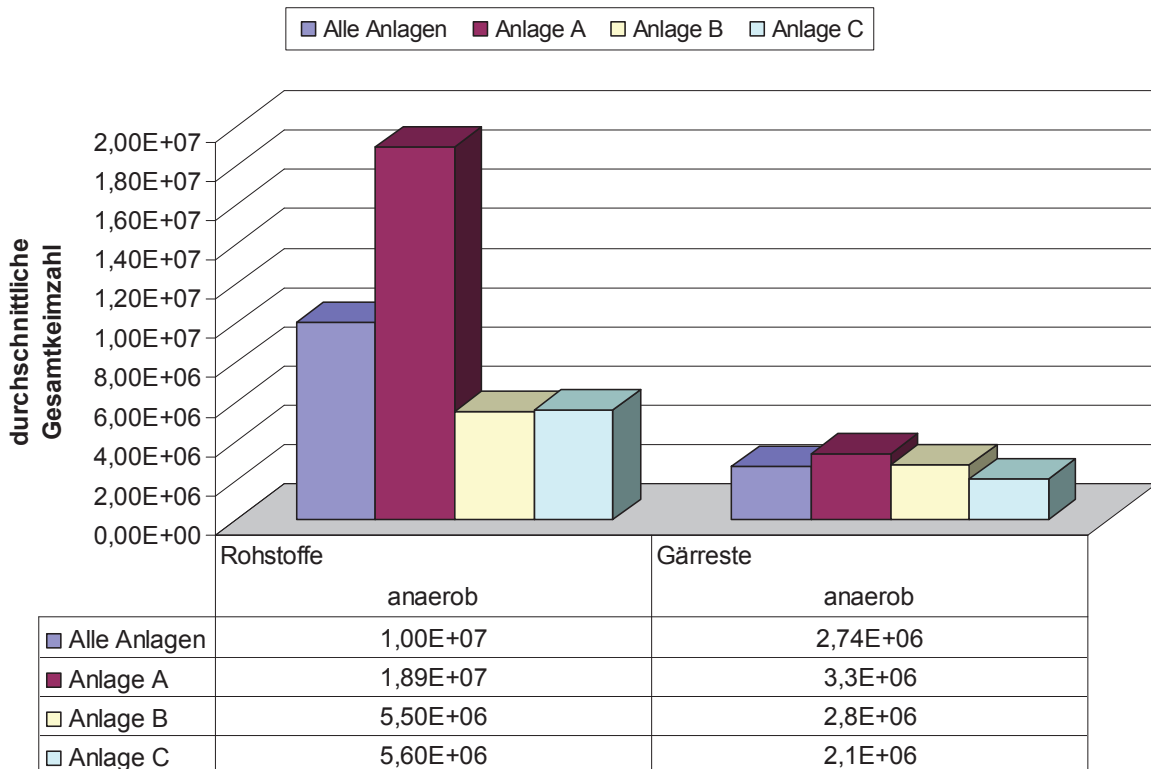


Abbildung 12: Vergleich der Clostridienkonzentrationen in Rohstoffen und Gärresten der Anlage A, B und C

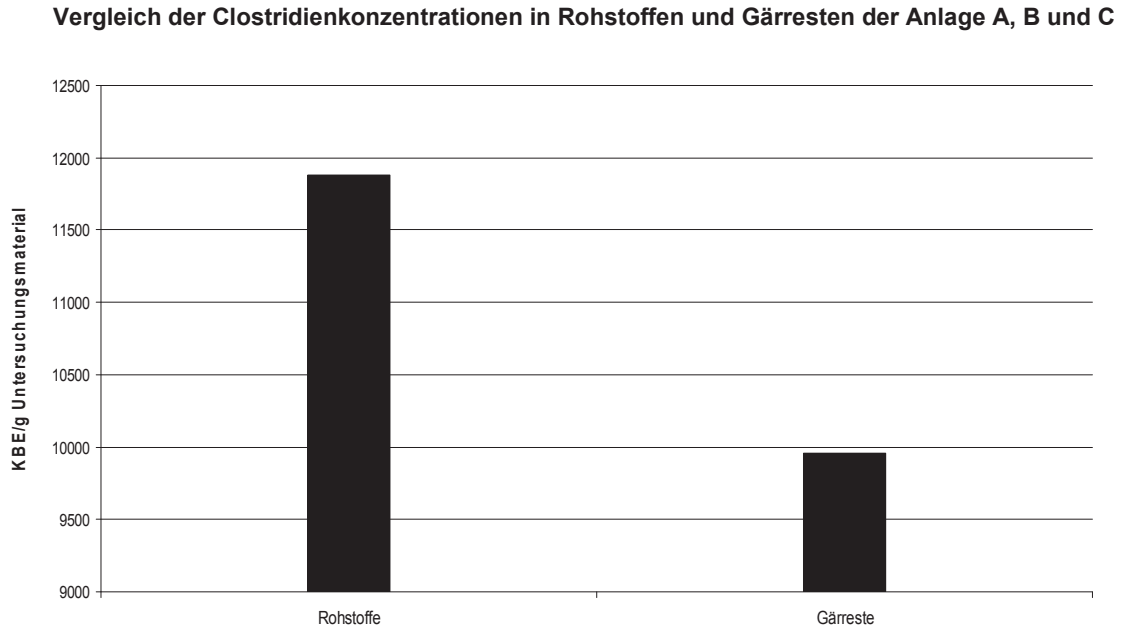


Abbildung 13: Statistik der 15 häufigsten Spezies aller Anlagen (ohne Cl. spp.)

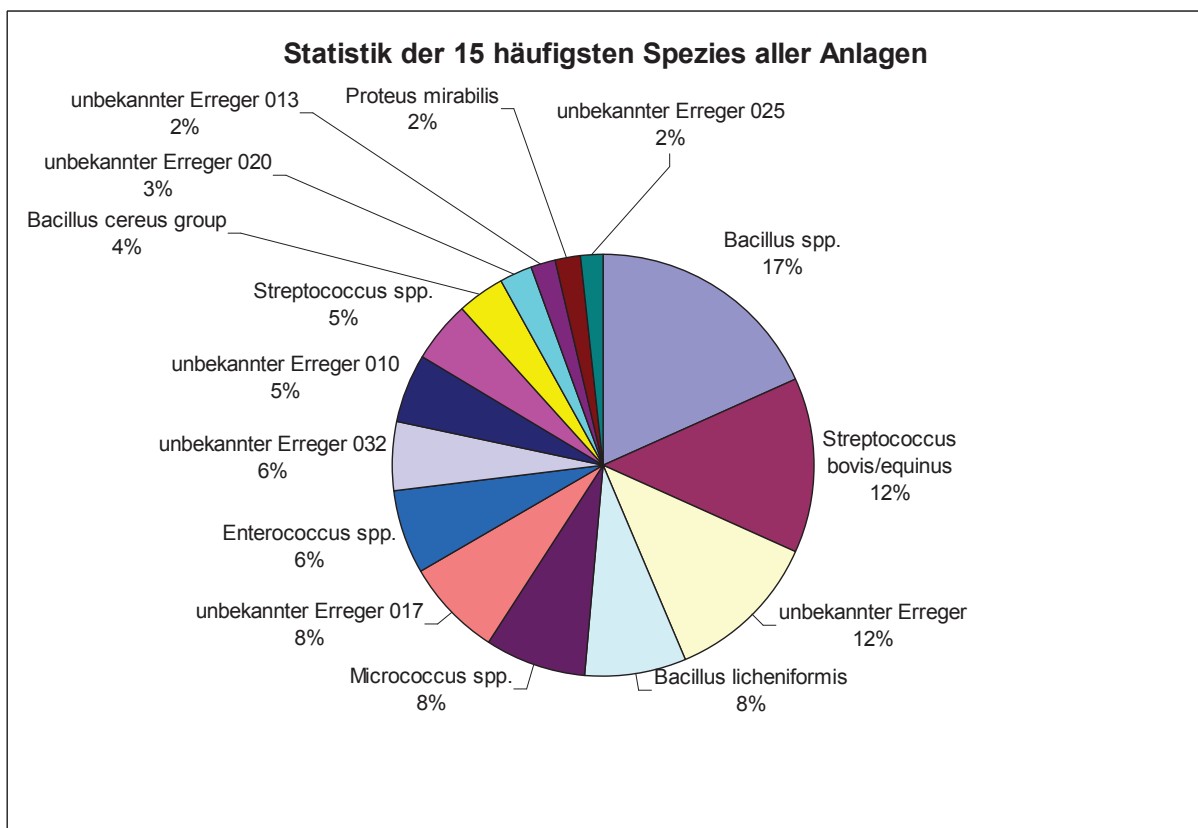


Abbildung 13 A: Bestimmung der Mikroflorazusammensetzung der Rohstoffproben und der Gärreste geordnet in Anlagen A

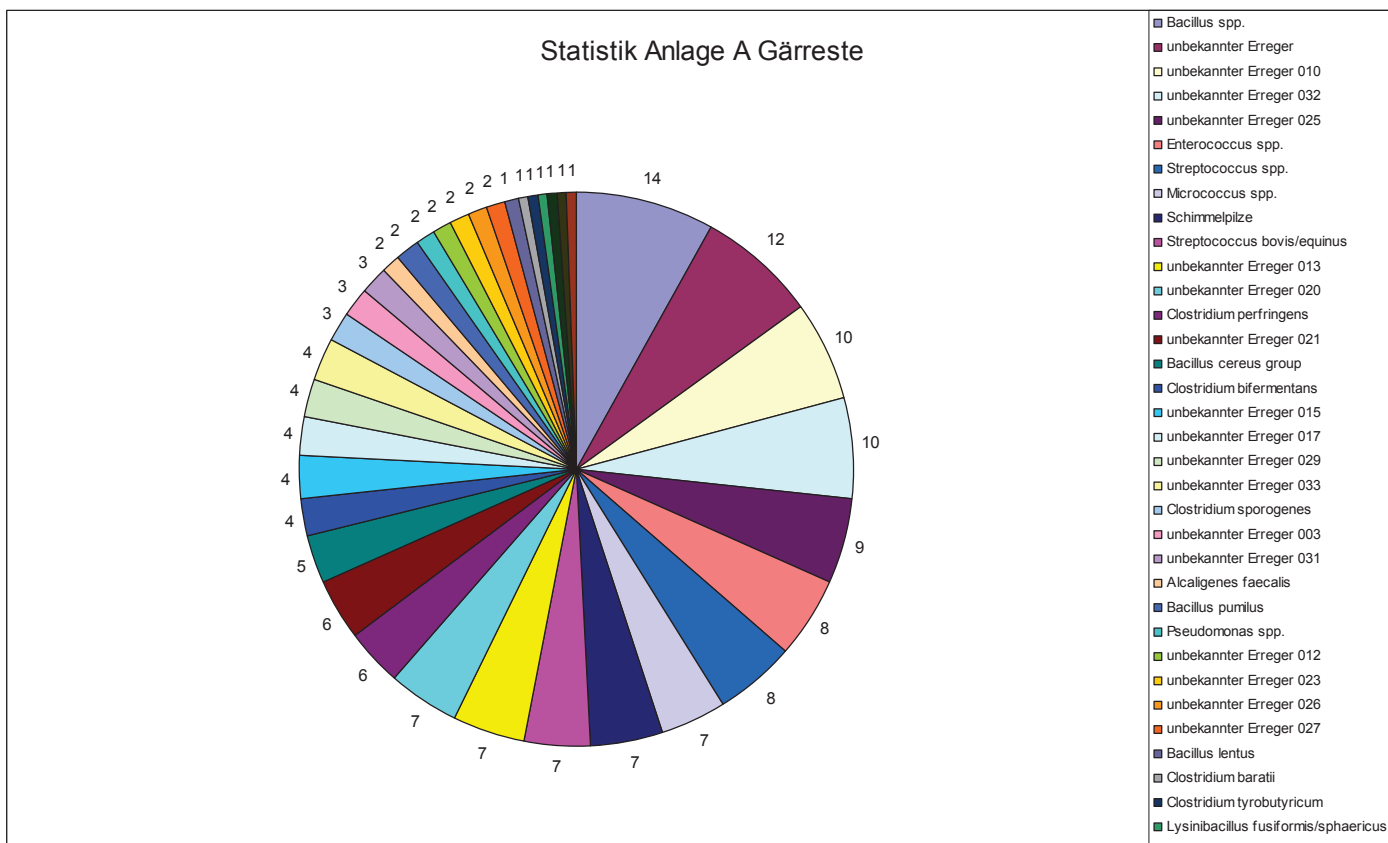
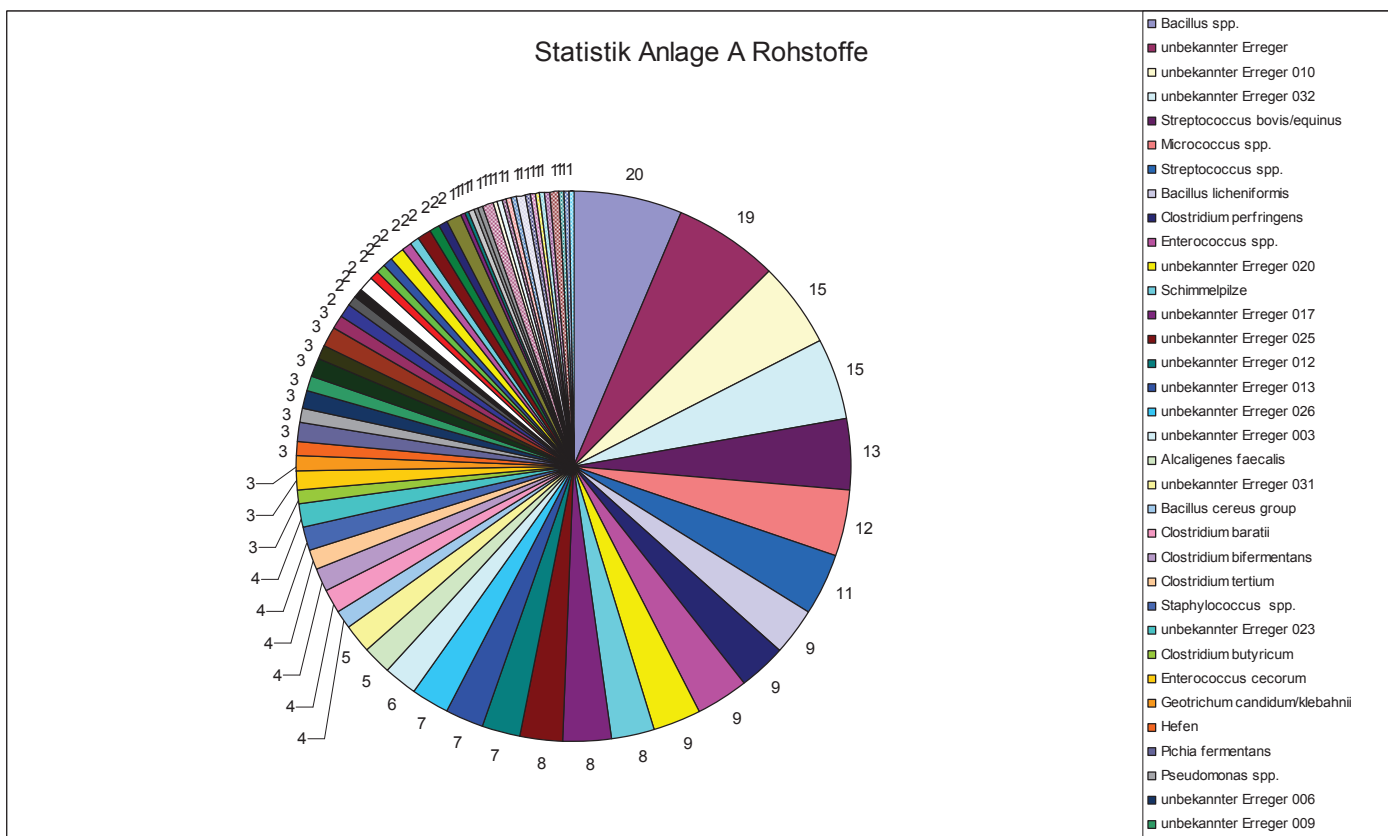


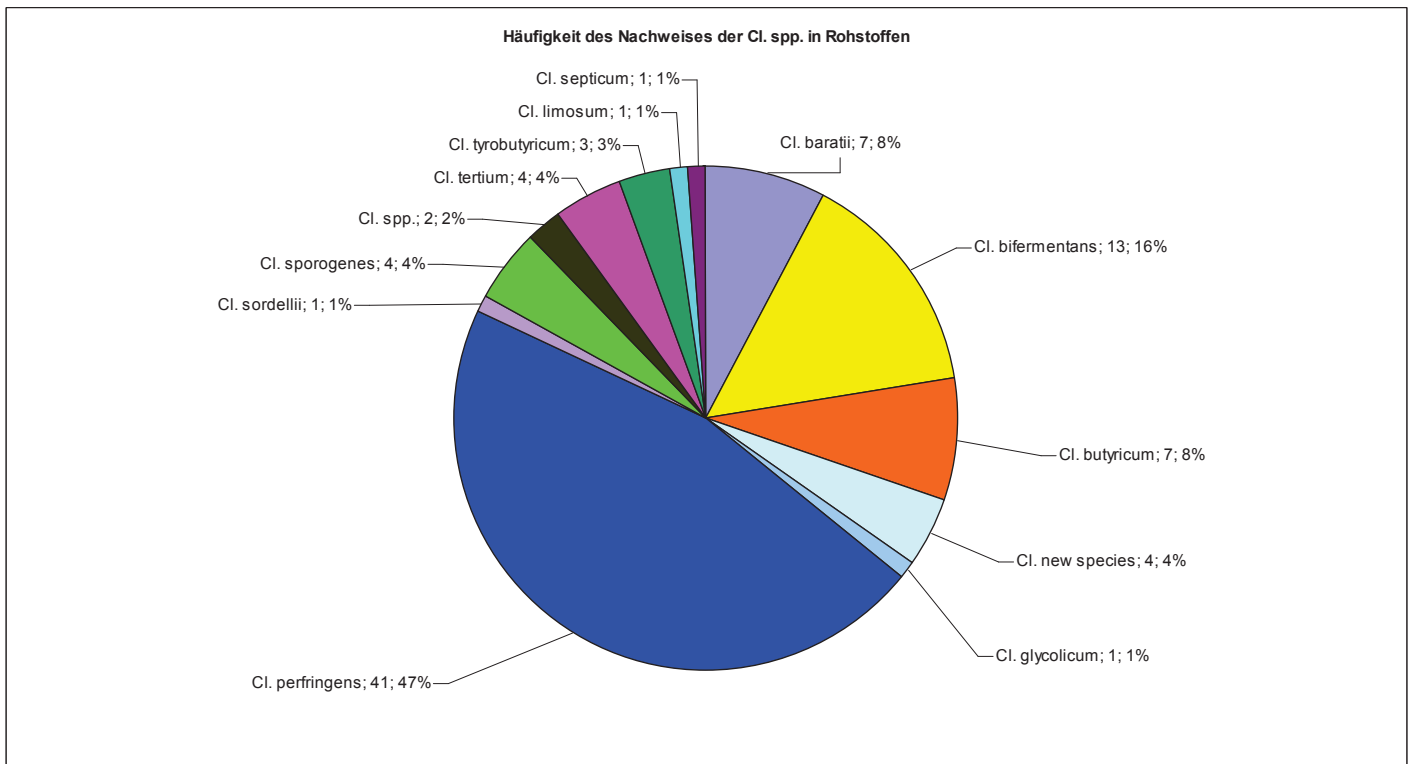
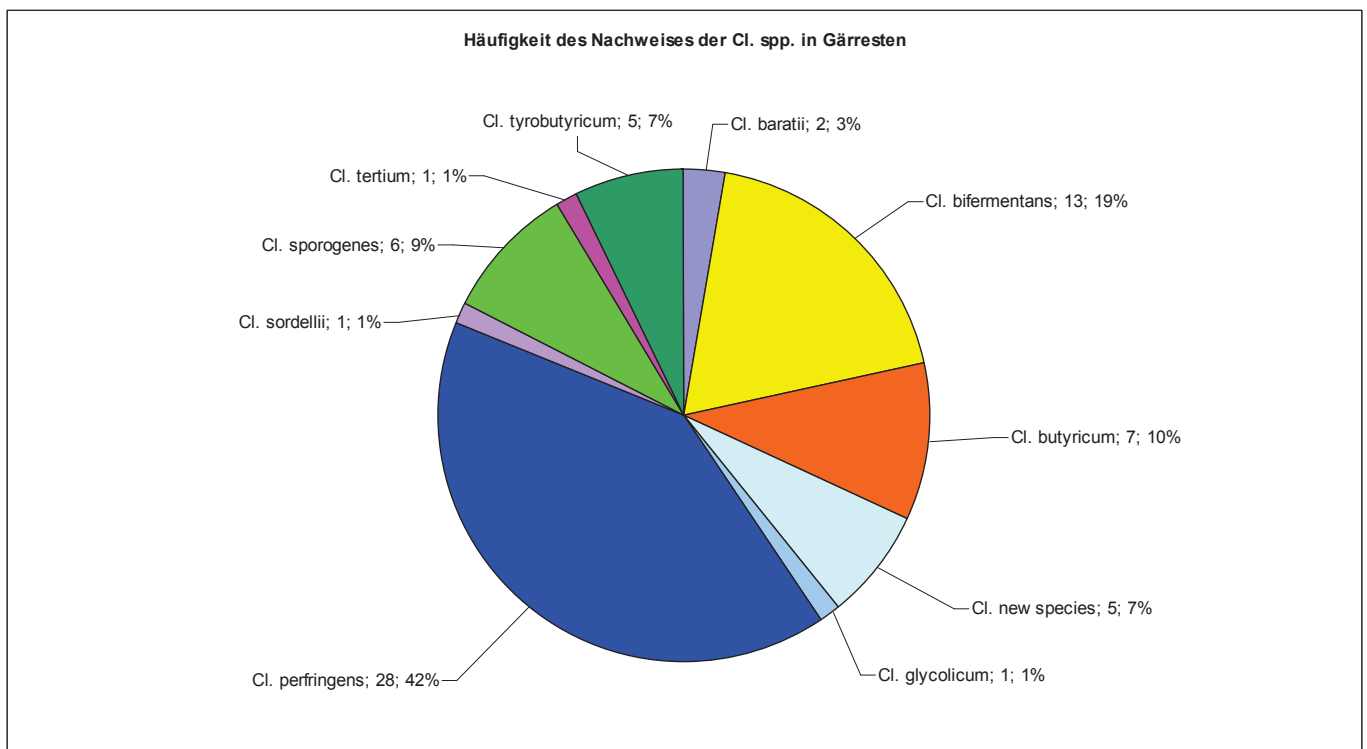
Abbildung 14: Häufigkeit des Nachweises der *Cl. spp.* in RohstoffenAbbildung 15: Häufigkeit des Nachweises der *Cl. spp.* in Gärresten

Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Clostridien Spezies in Anlagen A in Rohstoffen und Gärresten

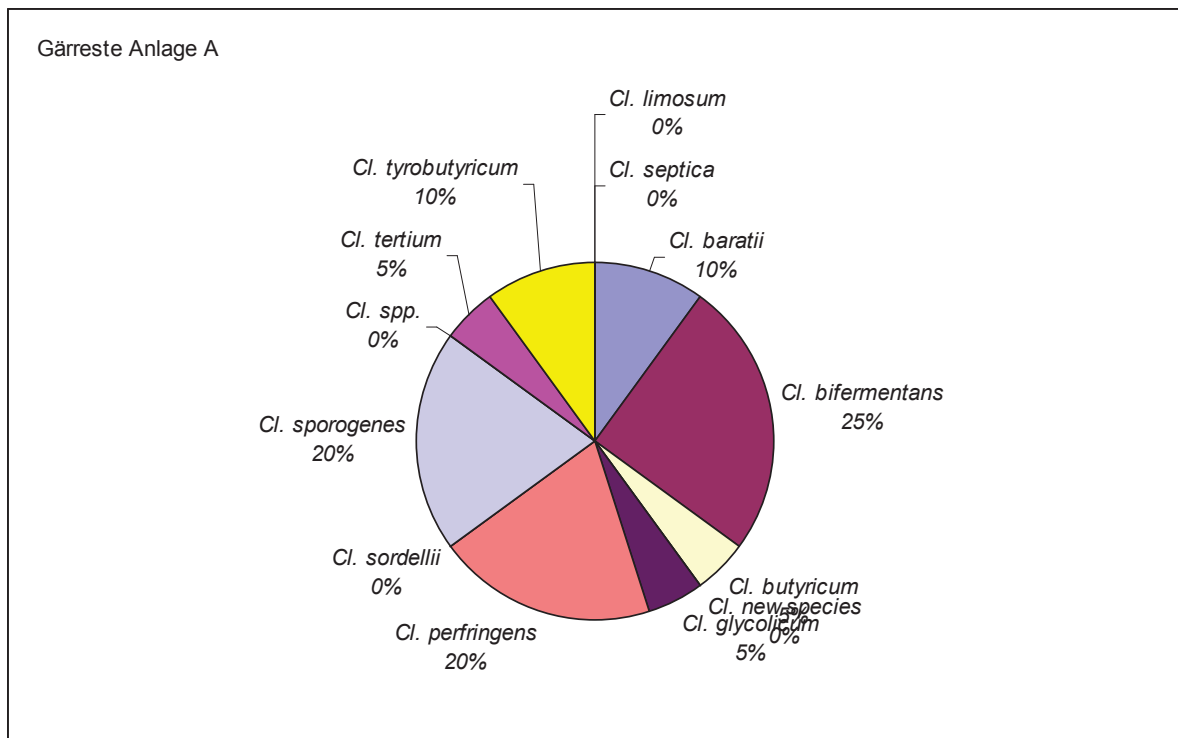
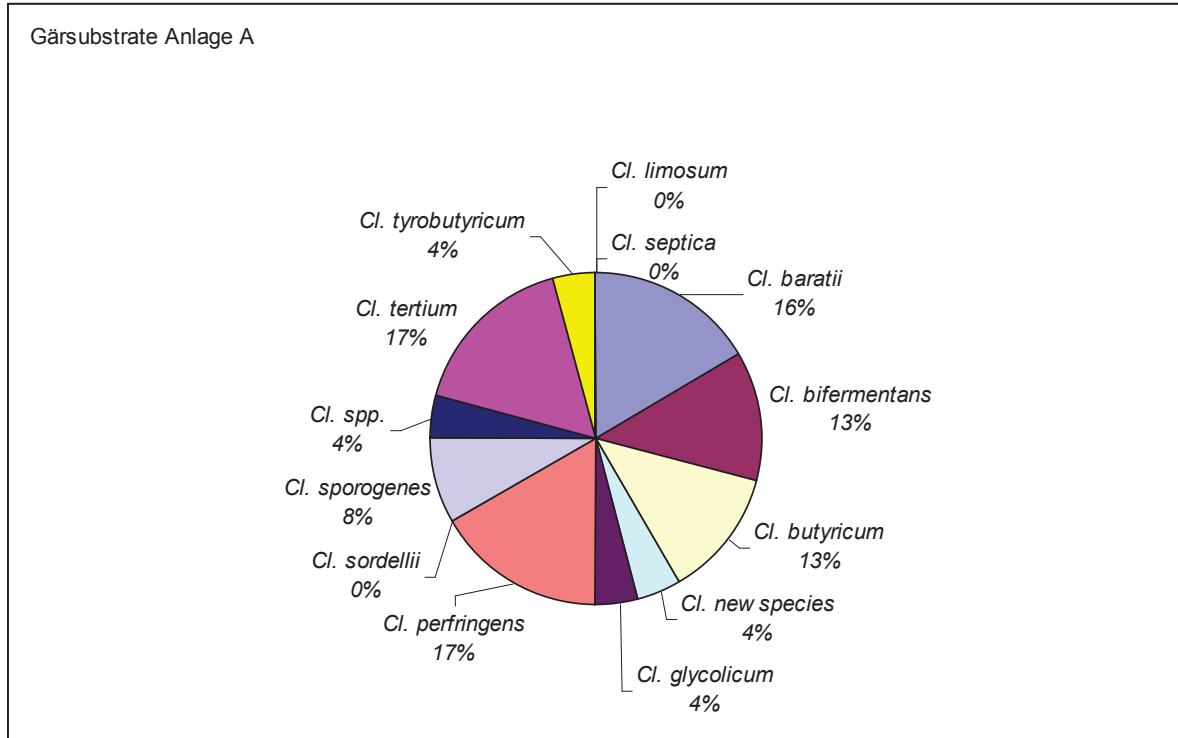


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Clostridien Spezies in Anlagen B in Rohstoffen und Gärresten

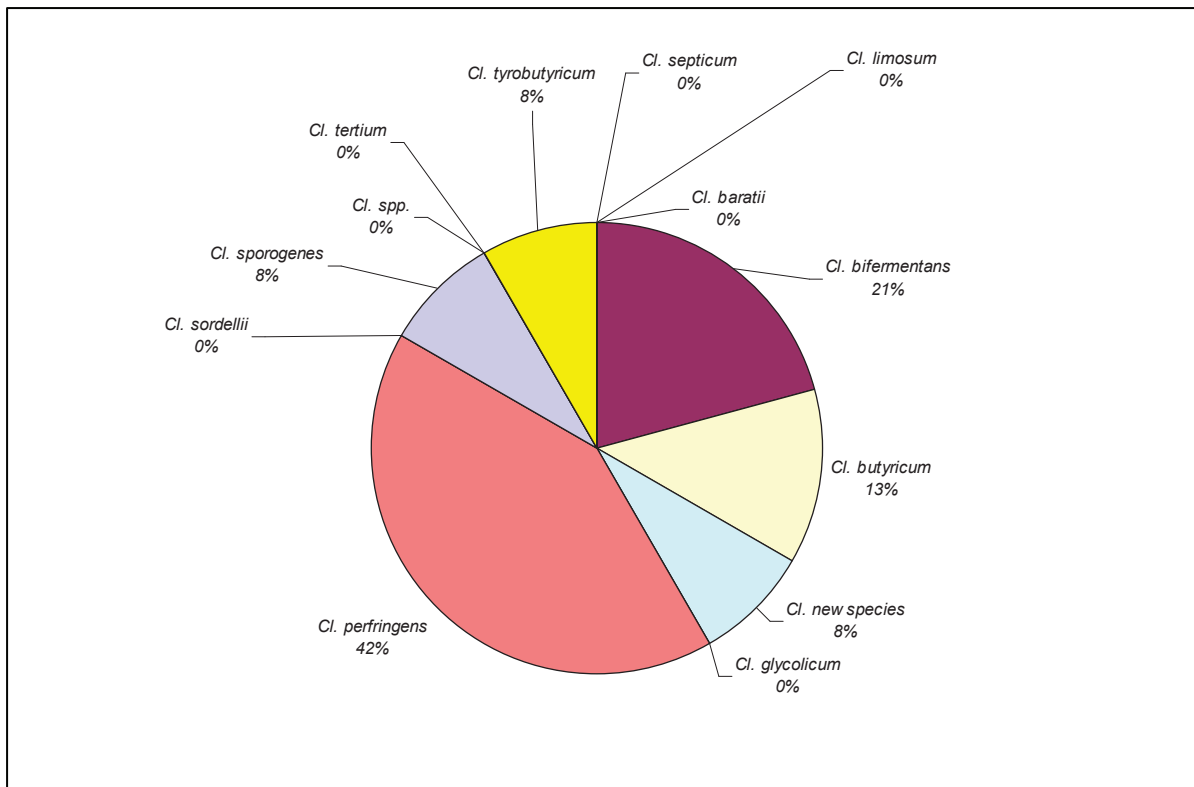
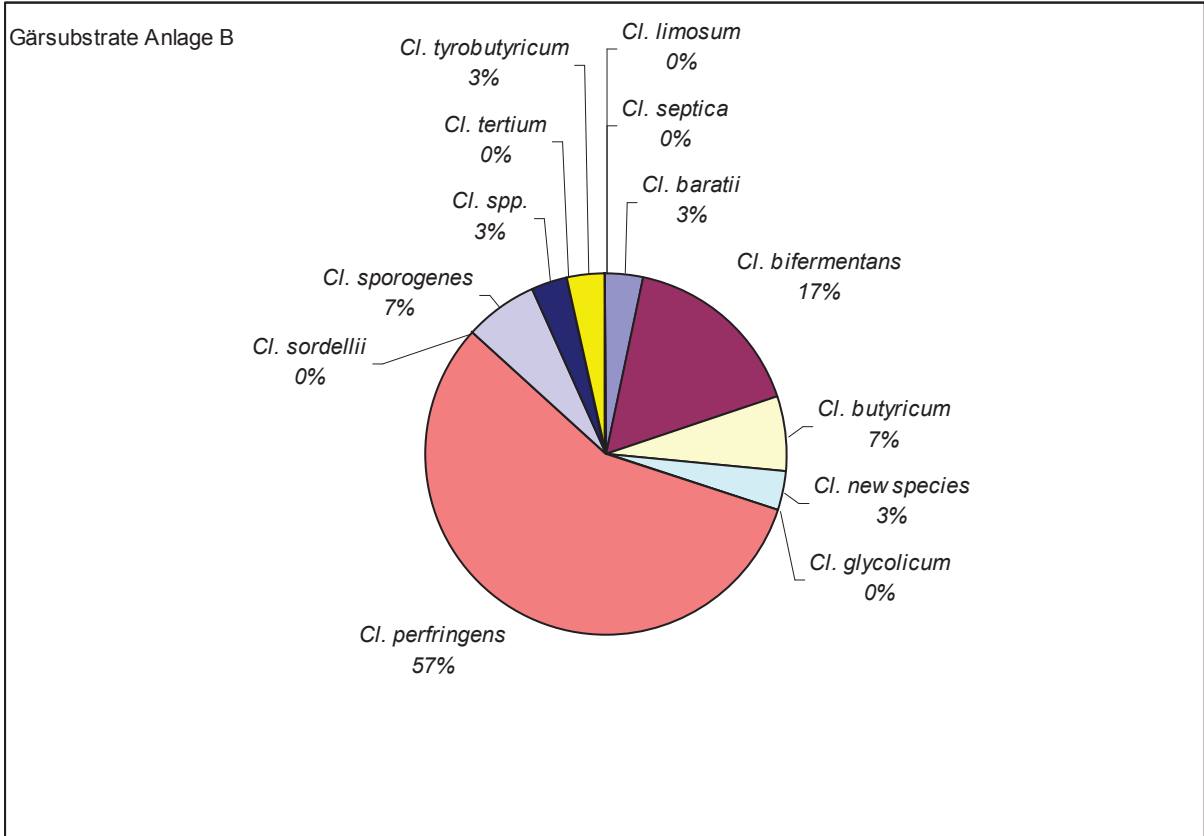


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Clostridien Spezies in Anlagen C in Rohstoffen und Gärresten

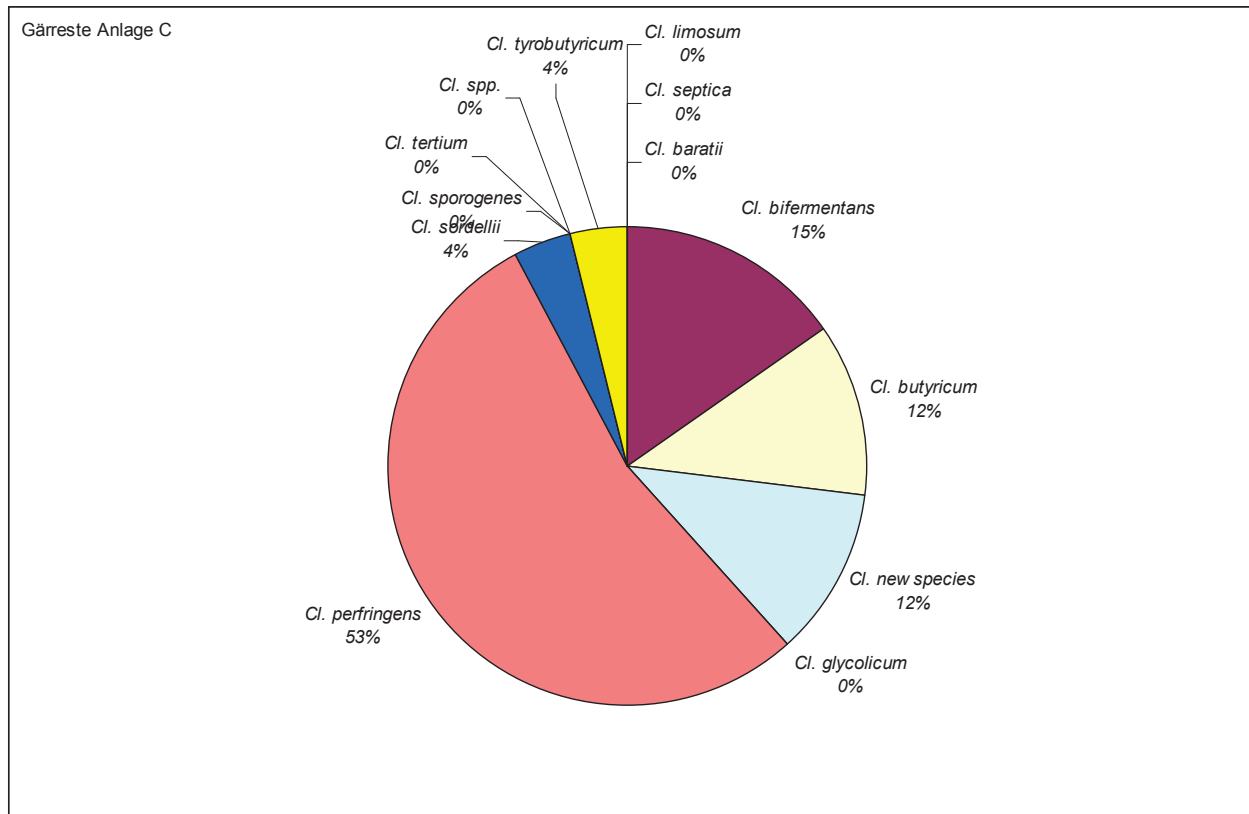
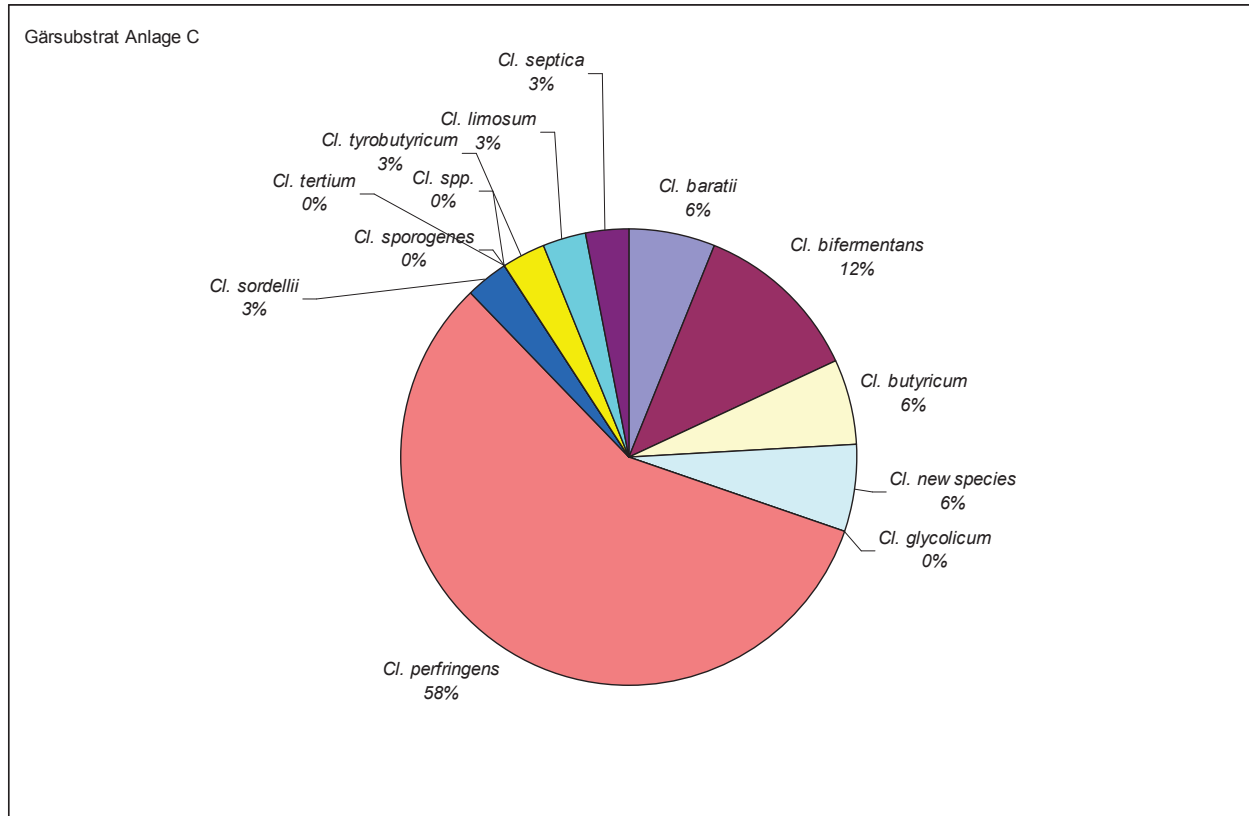


Abbildung 16 A: Übersicht der 15 häufigsten Bacteria spp. in allen 15 getesteten Biogasanlagen

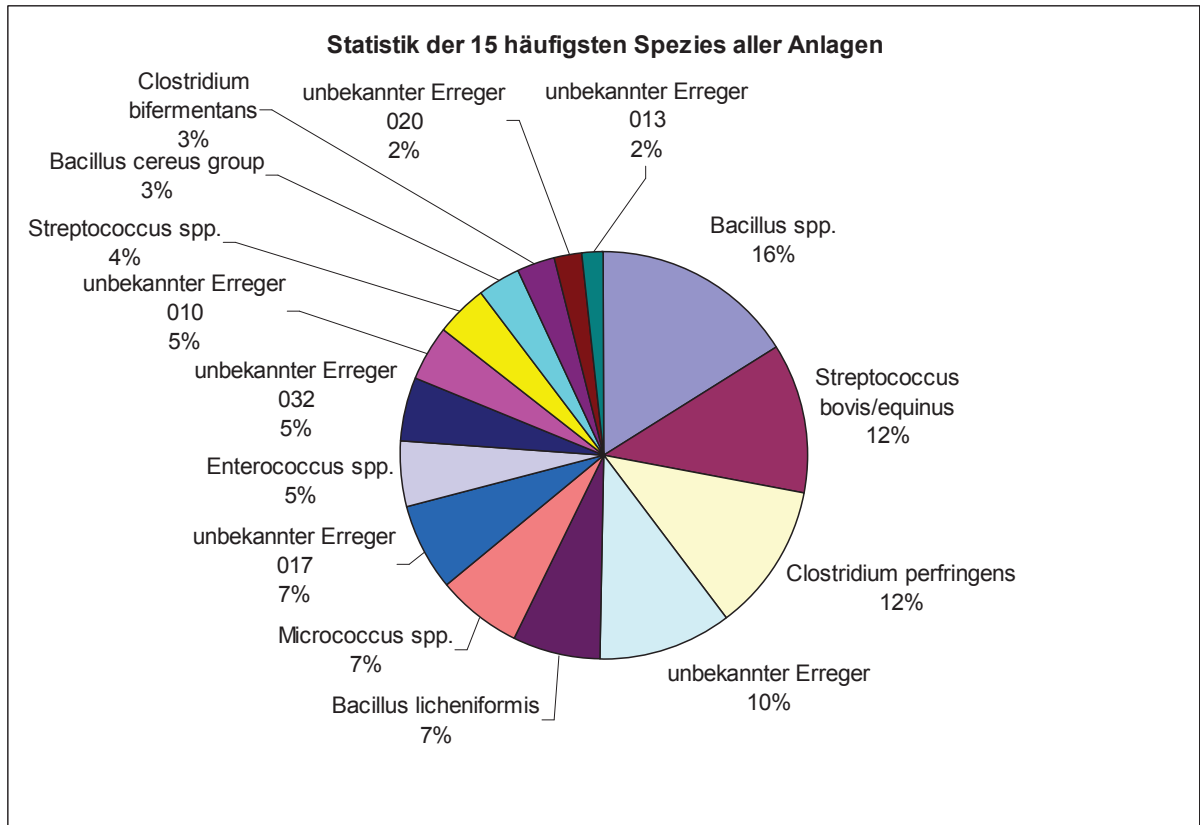


Abbildung 17: Vergleich der Gesamtkeimzahlen für *Cl. spp.* alle Anlagen

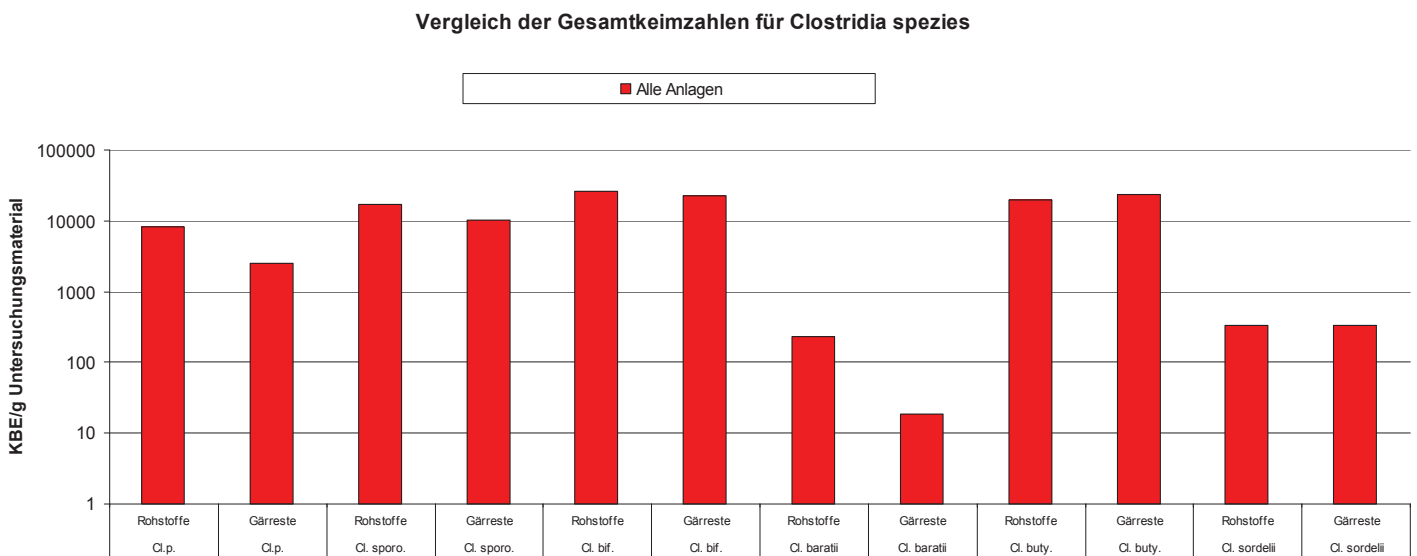


Abbildung 18: Vergleich der Gesamtkeimzahlen der verschiedenen *Clostridia* spp. in den Biogasanlagen A, B und C

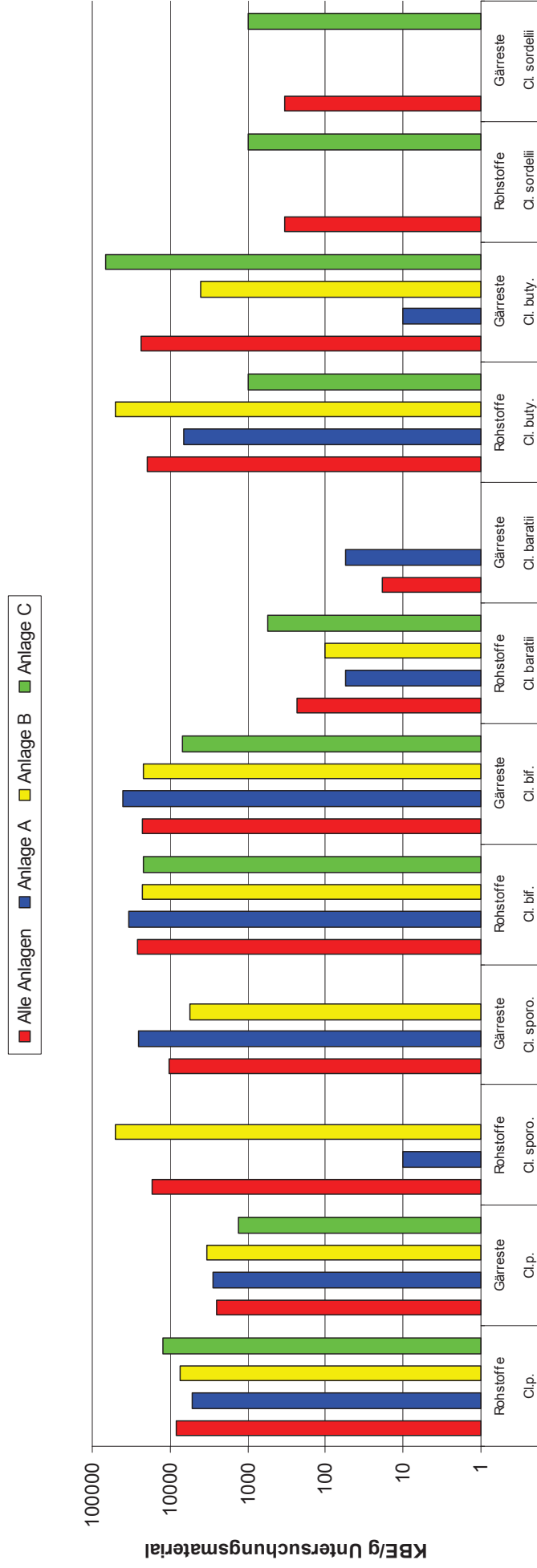


Abbildung 19: Gesamtkeimzahl von *Cl. perfringens* in Rohstoffen

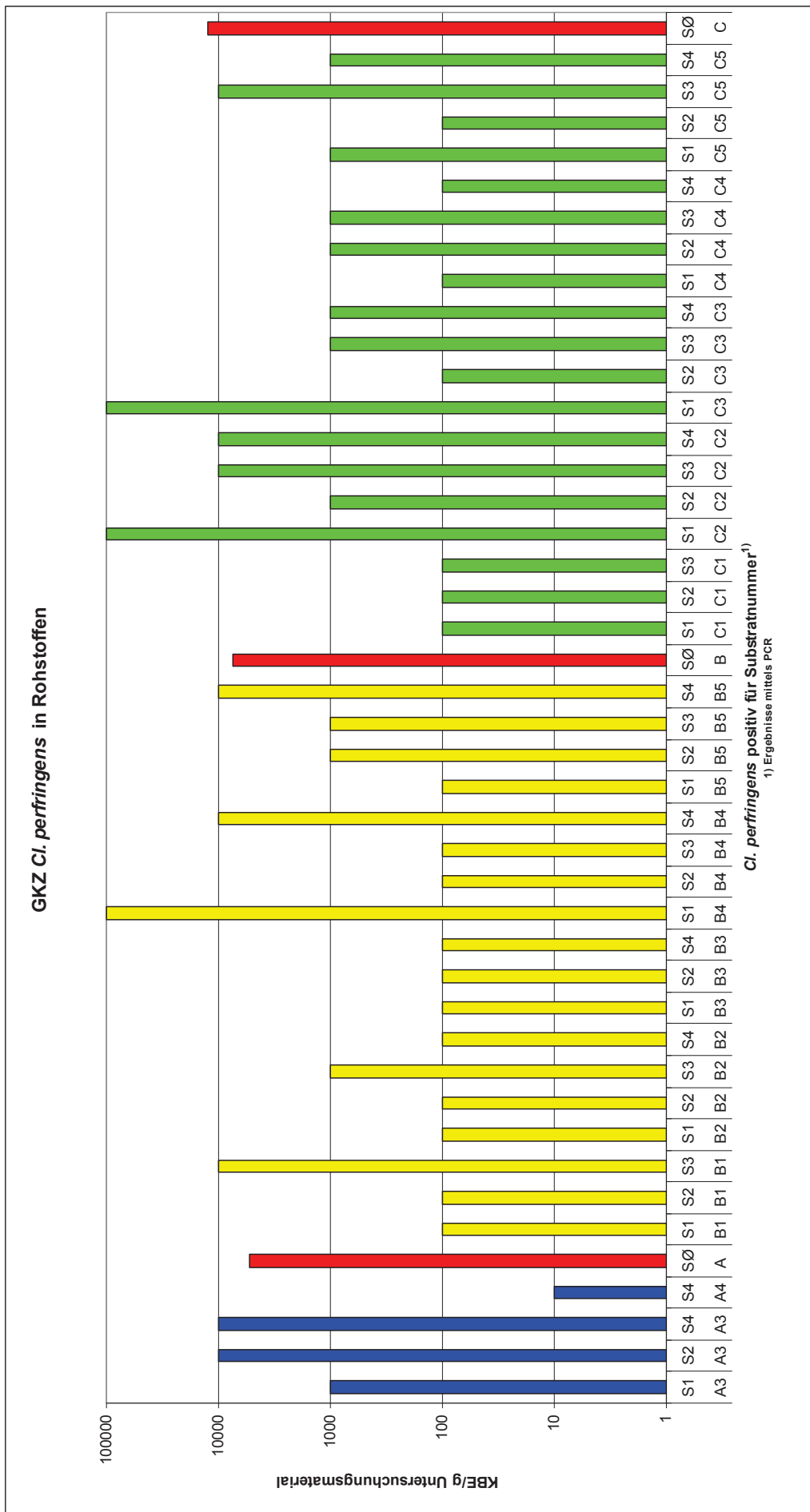


Abbildung 20: Gesamtkeimzahl von *Cl. perfringens* in Gärresten



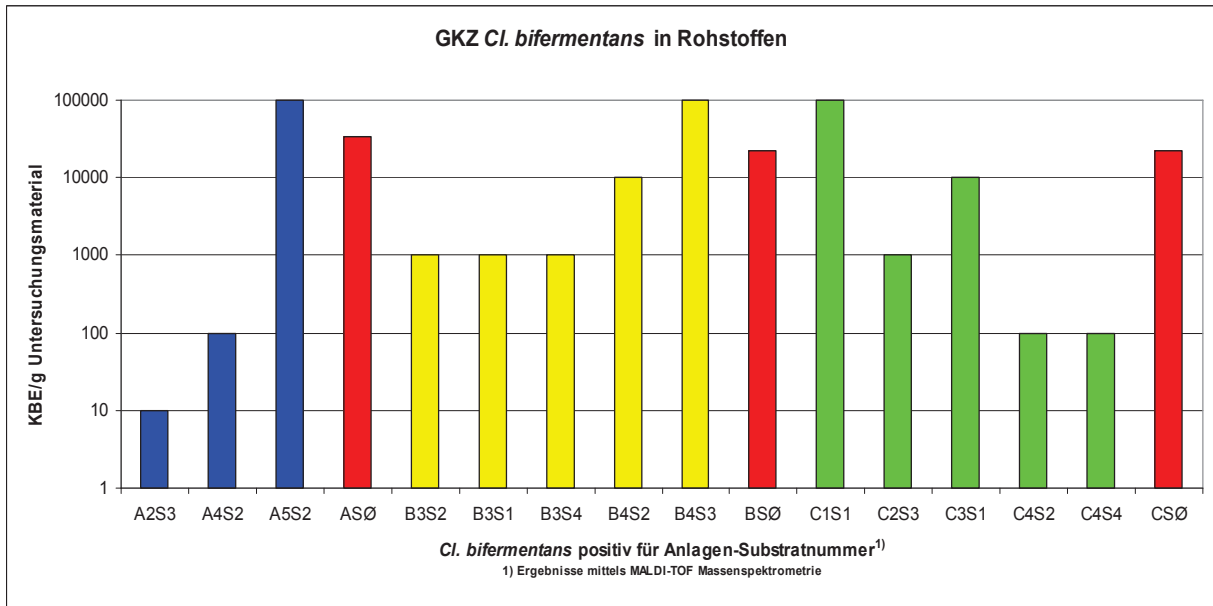
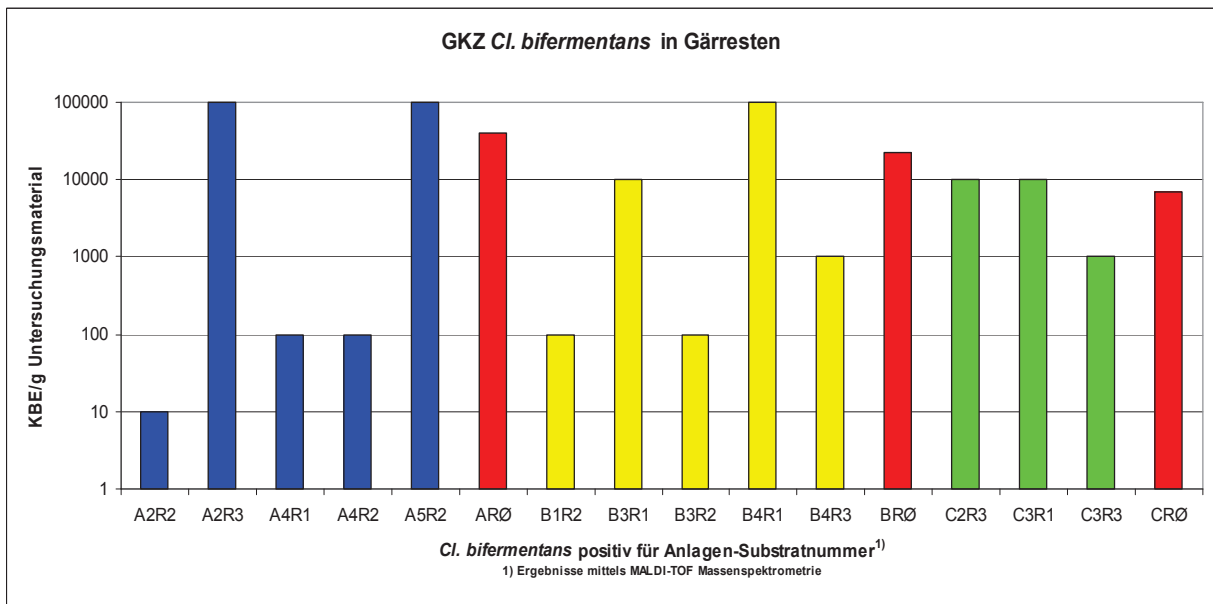
Abbildung 21: Gesamtkeimzahl von *Cl. bifermentans* in RohstoffenAbbildung 22: Gesamtkeimzahl von *Cl. bifermentans* in Gärresten

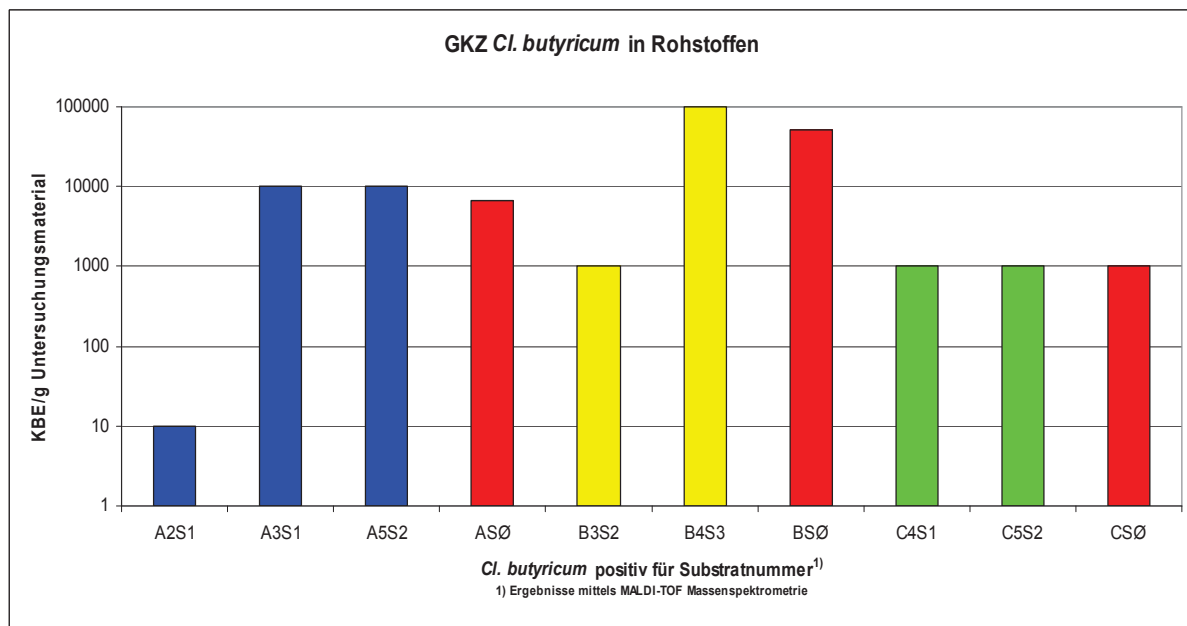
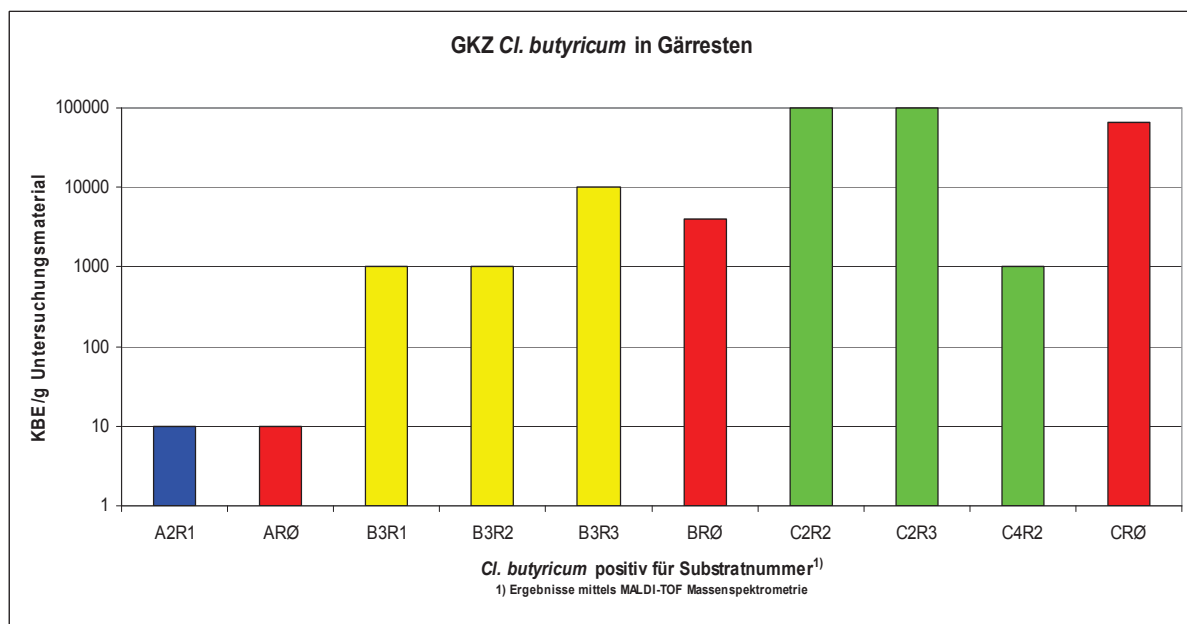
Abbildung 23: Gesamtkeimzahl von *Cl. butyricum* in RohstoffenAbbildung 24: Gesamtkeimzahl von *Cl. butyricum* in Gärresten

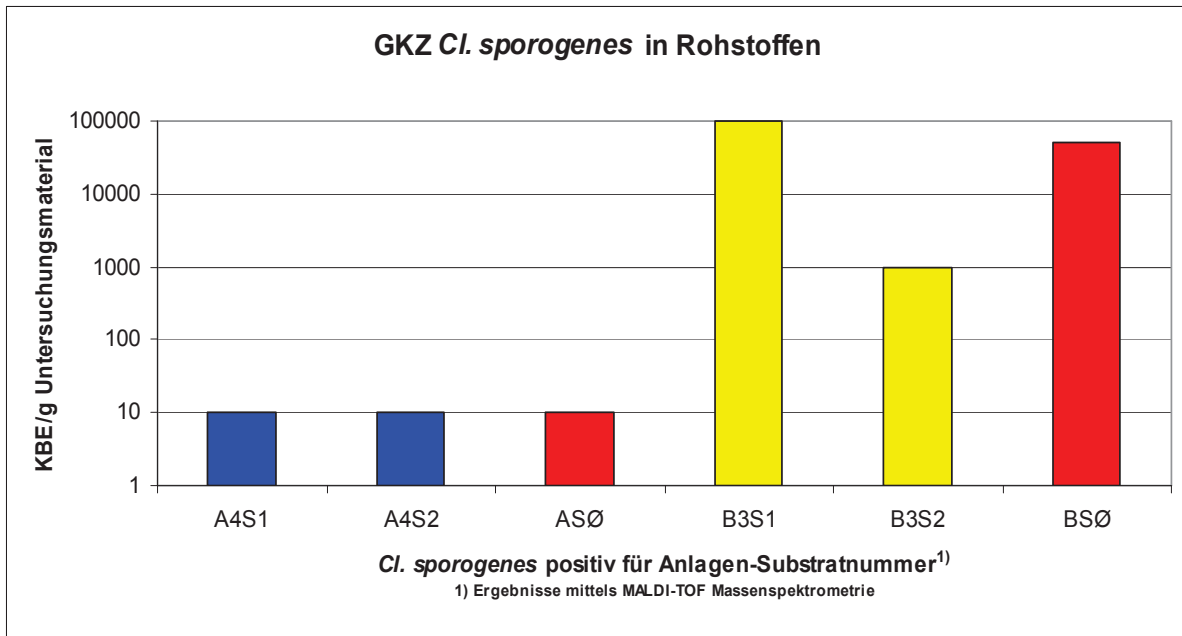
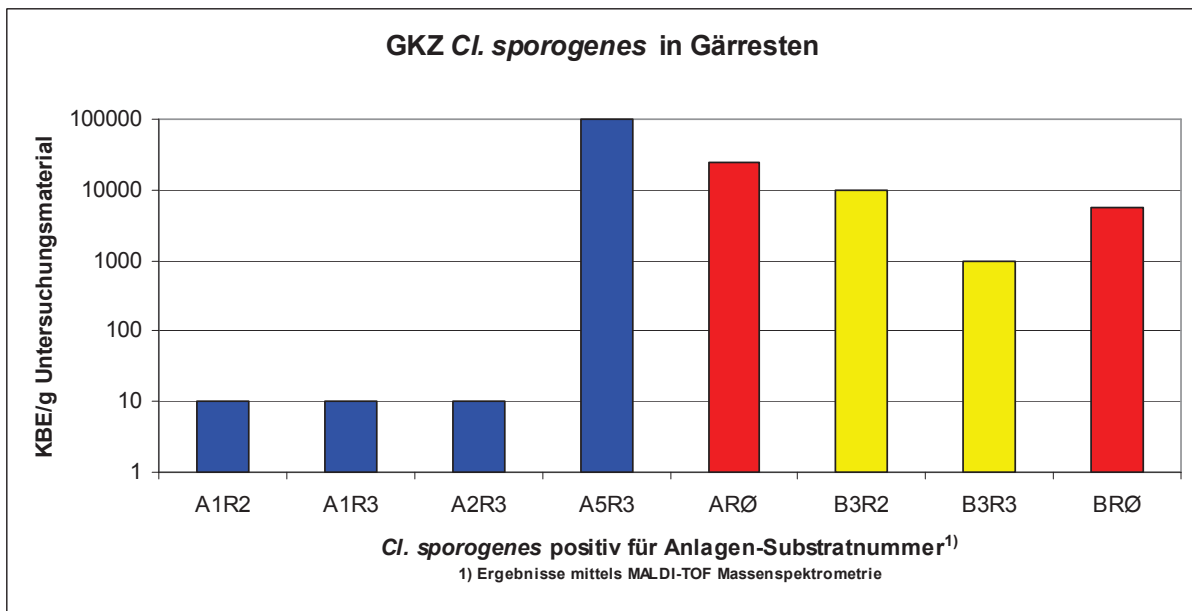
Abbildung 25: Gesamtkeimzahl von *Cl. sporogenes* in RohstoffenAbbildung 26: Gesamtkeimzahl von *Cl. sporogenes* in Gärresten

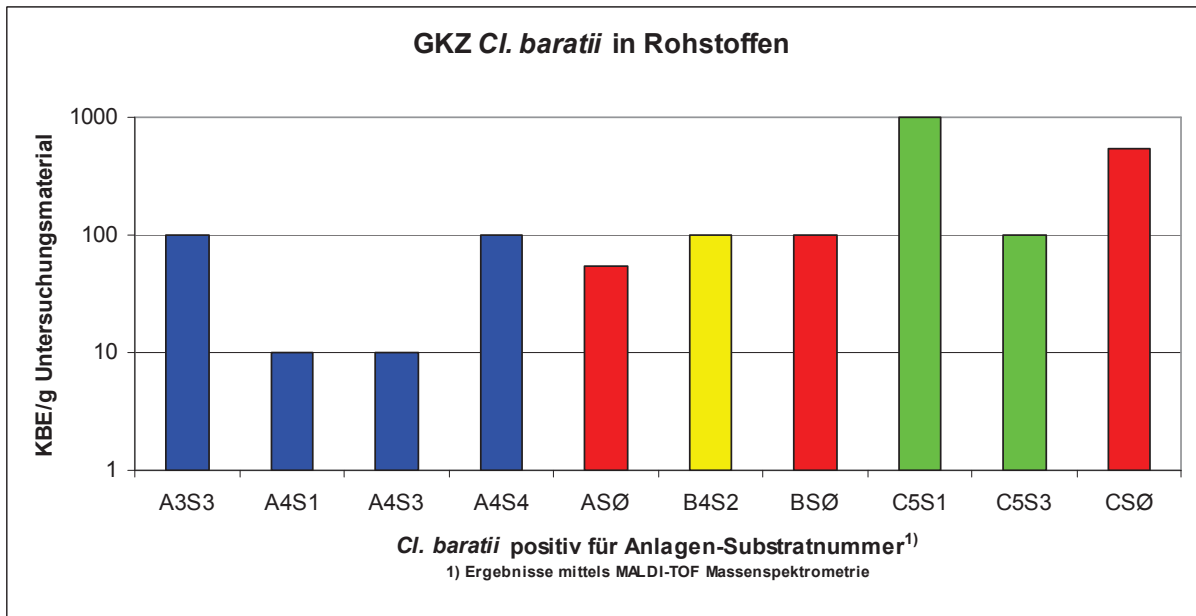
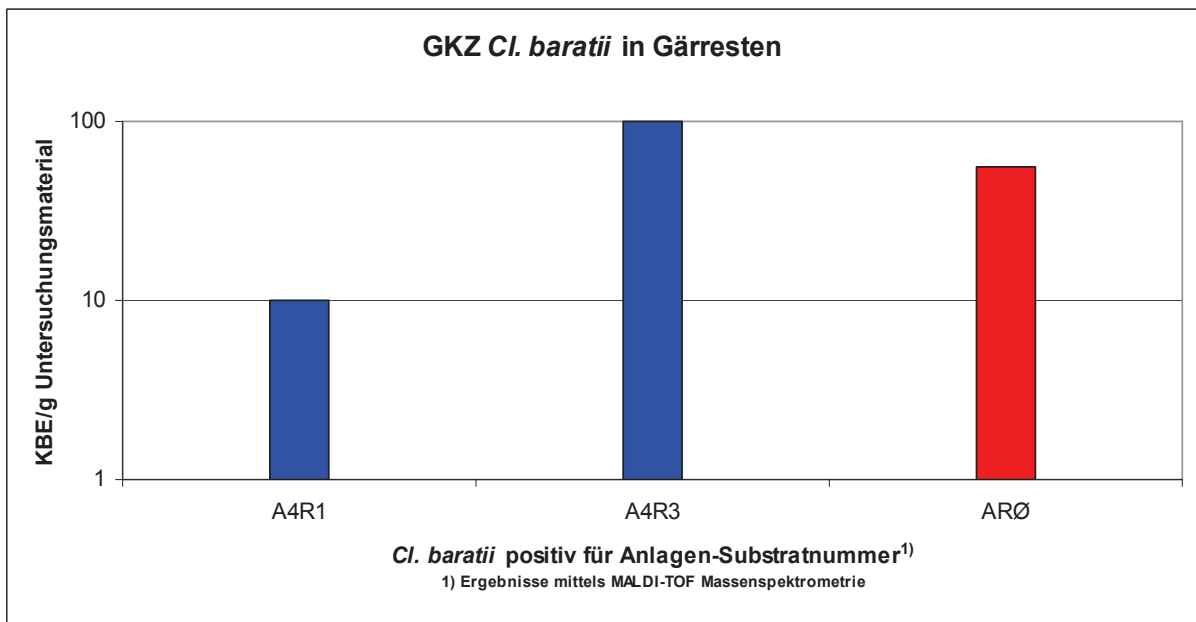
Abbildung 27: Gesamtkeimzahl von *Cl. baratii* in RohstoffenAbbildung 28: Gesamtkeimzahl von *Cl. baratii* in Gärresten

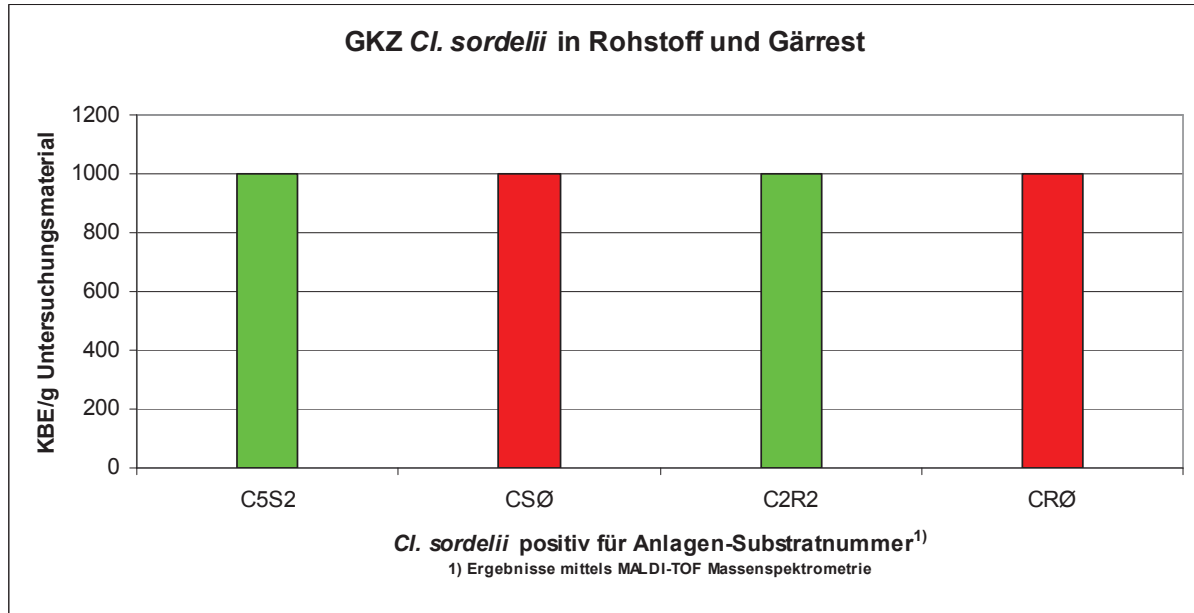
Abbildung 29: Gesamtkeimzahl von *Cl. sordelii* in Rohstoff und Gärresten

Tabelle 2:
Probenübersicht

| Anlage | Nr. | Anlage | Nr. | Anlage | Nr. | Anlage | Nr. |
|--------|-----|----------|-----|--------|-----|----------|-----|
| A1 | S1 | Substrat | 1 | B1 | S1 | Substrat | 36 |
| A1 | S2 | Substrat | 2 | B1 | S2 | Substrat | 37 |
| A1 | S3 | Substrat | 3 | B1 | S3 | Substrat | 38 |
| A1 | S4 | Substrat | 4 | B1 | S4 | Substrat | 39 |
| A1 | R1 | Gärrest | 5 | B1 | R1 | Gärrest | 40 |
| A1 | R2 | Gärrest | 6 | B1 | R2 | Gärrest | 41 |
| A1 | R3 | Gärrest | 7 | B1 | R3 | Gärrest | 42 |
| A2 | S1 | Substrat | 8 | B2 | S1 | Substrat | 43 |
| A2 | S2 | Substrat | 9 | B2 | S2 | Substrat | 44 |
| A2 | S3 | Substrat | 10 | B2 | S3 | Substrat | 45 |
| A2 | S4 | Substrat | 11 | B2 | S4 | Substrat | 46 |
| A2 | R1 | Gärrest | 12 | B2 | R1 | Gärrest | 47 |
| A2 | R2 | Gärrest | 13 | B2 | R2 | Gärrest | 48 |
| A2 | R3 | Gärrest | 14 | B2 | R3 | Gärrest | 49 |
| A3 | S1 | Substrat | 15 | B3 | S1 | Substrat | 50 |
| A3 | S2 | Substrat | 16 | B3 | S2 | Substrat | 51 |
| A3 | S3 | Substrat | 17 | B3 | S3 | Substrat | 52 |
| A3 | S4 | Substrat | 18 | B3 | S4 | Substrat | 53 |
| A3 | R1 | Gärrest | 19 | B3 | R1 | Gärrest | 54 |
| A3 | R2 | Gärrest | 20 | B3 | R2 | Gärrest | 55 |
| A3 | R3 | Gärrest | 21 | B3 | R3 | Gärrest | 56 |
| A4 | S1 | Substrat | 22 | B4 | S1 | Substrat | 57 |
| A4 | S2 | Substrat | 23 | B4 | S2 | Substrat | 58 |
| A4 | S3 | Substrat | 24 | B4 | S3 | Substrat | 59 |
| A4 | S4 | Substrat | 25 | B4 | S4 | Substrat | 60 |
| A4 | R1 | Gärrest | 26 | B4 | R1 | Gärrest | 61 |
| A4 | R2 | Gärrest | 27 | B4 | R2 | Gärrest | 62 |
| A4 | R3 | Gärrest | 28 | B4 | R3 | Gärrest | 63 |
| A5 | S1 | Substrat | 29 | B5 | S1 | Substrat | 64 |
| A5 | S2 | Substrat | 30 | B5 | S2 | Substrat | 65 |
| A5 | S3 | Substrat | 31 | B5 | S3 | Substrat | 66 |
| A5 | S4 | Substrat | 32 | B5 | S4 | Substrat | 67 |
| A5 | R1 | Gärrest | 33 | B5 | R1 | Gärrest | 68 |
| A5 | R2 | Gärrest | 34 | B5 | R2 | Gärrest | 69 |
| A5 | R3 | Gärrest | 35 | B5 | R3 | Gärrest | 70 |
| C1 | S1 | Substrat | 71 | C2 | S1 | Substrat | 78 |
| C1 | S2 | Substrat | 72 | C2 | S2 | Substrat | 79 |
| C1 | S3 | Substrat | 73 | C2 | S3 | Substrat | 80 |
| C1 | S4 | Substrat | 74 | C2 | S4 | Substrat | 81 |
| C1 | R1 | Gärrest | 75 | C2 | R1 | Gärrest | 82 |
| C1 | R2 | Gärrest | 76 | C2 | R2 | Gärrest | 83 |
| C1 | R3 | Gärrest | 77 | C2 | R3 | Gärrest | 84 |
| C3 | S1 | Substrat | 85 | C4 | S1 | Substrat | 92 |
| C3 | S2 | Substrat | 86 | C4 | S2 | Substrat | 93 |
| C3 | S3 | Substrat | 87 | C4 | S3 | Substrat | 94 |
| C3 | S4 | Substrat | 88 | C4 | S4 | Substrat | 95 |
| C3 | R1 | Gärrest | 89 | C4 | R1 | Gärrest | 96 |
| C3 | R2 | Gärrest | 90 | C4 | R2 | Gärrest | 97 |
| C3 | R3 | Gärrest | 91 | C4 | R3 | Gärrest | 98 |
| C5 | S1 | Substrat | 99 | C5 | S1 | Substrat | 99 |
| C5 | S2 | Substrat | 100 | C5 | S2 | Substrat | 100 |
| C5 | S3 | Substrat | 101 | C5 | S3 | Substrat | 101 |
| C5 | S4 | Substrat | 102 | C5 | S4 | Substrat | 102 |
| C5 | R1 | Gärrest | 103 | C5 | R1 | Gärrest | 103 |
| C5 | R2 | Gärrest | 104 | C5 | R2 | Gärrest | 104 |
| C5 | R3 | Gärrest | 105 | C5 | R3 | Gärrest | 105 |

Tabelle 5: Qualitatives und quantitatives Vorkommen von Clostridia spp. in Rohstoff- und Gärrestproben von 15 Biogasanlagen aus Niedersachsen

| Anlage | Rohstoffe (S) Gärreste (R) | Nr. | GKZ in 1g/Untersuchungsmaterial | | | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|--------------------------------|---|
| | | | <i>Cl. p.</i> ¹⁾ | <i>Cl. sporo.</i> ²⁾ | <i>Cl. bif.</i> ²⁾ | <i>Cl. bara.</i> ²⁾ | <i>Cl. sord.</i> ²⁾ | <i>Cl. tyrob.</i> ²⁾ | <i>Cl. tert.</i> ²⁾ | <i>Clostridium buty.</i> ²⁾ | <i>Cl. gly.</i> ²⁾ | <i>Cl. limo.</i> ²⁾ | |
| A1 | S1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1- | - | - |
| | S2 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 3 | - | - | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - |
| | S4 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 6 | - | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 7 | - | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A2 | S1 | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | >10<10 ² | - | - |
| | S2 | 9 | - | - | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - |
| | S3 | 10 | - | - | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 11 | - | - | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - |
| | R1 | 12 | - | - | - | - | - | - | - | positiv | >10<10 ² | - | - |
| | R2 | 13 | - | - | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 14 | - | >10<10 ² | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A3 | S1 | 15 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - |
| | S2 | 16 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 17 | - | - | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 18 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - | - |
| | R1 | 19 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | positiv | - |
| | R2 | 20 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 21 | - | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - | - |
| A4 | S1 | 22 | - | >10<10 ² | - | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 23 | - | >10<10 ² | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 24 | - | - | - | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 25 | >10<10 ² | - | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | positiv | - |
| | R1 | 26 | - | - | >10 ² <10 ³ | >10<10 ² | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 27 | >10<10 ² | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 28 | >10 ² <10 ³ | - | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - |
| A5 | S1 | 29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 30 | - | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | positiv | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - |
| | S3 | 31 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 32 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 33 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 34 | - | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 35 | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | positiv | - | - | - | - |

Cl. p. = *Clostridium perfringens*
 Cl. sporo. = *Clostridium sporogenes*
 Cl. bif. = *Clostridium bifermentans*
 Cl. bara. = *Clostridium baratii*

Cl. sord. = *Clostridium sordelii*
 Cl. tyrob. = *Clostridium tyrobutyricum*
 Cl. tert. = *Clostridium tertium*
 Cl. buty. = *Clostridium butyricum*

Cl. gly. = *Clostridium glycolicum*
 Cl. limo. = *Clostridium limosum*
 1) Ergebnisse mittels PCR
 2) Ergebnisse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Fortsetzung Tabelle 5: Qualitatives und quantitatives Vorkommen von Clostridia spp. in Rohstoff- und Gärrestproben von 15 Biogasanlagen aus Niedersachsen

| Anlage | Rohstoffe (S) Gärreste (R) | Nr. | GKZ in 1g/Untersuchungsmaterial | | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| | | | <i>Cl. p.</i> ¹⁾ | <i>Cl. sporo.</i> ²⁾ | <i>Cl. bif.</i> ²⁾ | <i>Cl. bara.</i> ²⁾ | <i>Cl. sord.</i> ²⁾ | <i>Cl. tyrob.</i> ²⁾ | <i>Cl. tert.</i> ²⁾ | <i>Cl. buty.</i> ²⁾ | <i>Cl. gly.</i> ²⁾ | <i>Cl. limo.</i> ²⁾ |
| B1 | S1 | 36 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 37 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 38 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 39 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 40 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 41 | - | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 42 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B2 | S1 | 43 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 44 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 45 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 46 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 47 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 48 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 49 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B3 | S1 | 50 | >10 ² <10 ³ | >10 ⁵ <10 ⁶ | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 51 | >10 ² <10 ³ | >10 ³ <10 ⁴ | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - |
| | S3 | 52 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 53 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 54 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - |
| | R2 | 55 | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - |
| | R3 | 56 | >10 ² <10 ³ | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | positiv | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - |
| B4 | S1 | 57 | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - |
| | S2 | 58 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 59 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - |
| | S4 | 60 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 61 | >10 ³ <10 ⁴ | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 62 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | positiv | - | - | - |
| | R3 | 63 | >10 ³ <10 ⁴ | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - |
| B5 | S1 | 64 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 65 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 66 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 67 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 68 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 69 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 70 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Cl. p. = *Clostridium perfringens*
Cl. sporo. = *Clostridium sporogenes*
Cl. bif. = *Clostridium bifementans*
Cl. bara. = *Clostridium baratii*

Cl. sord. = *Clostridium sordellii*
Cl. tyrob. = *Clostridium tyrobutyricum*
Cl. tert. = *Clostridium tertium*
Cl. buty. = *Clostridium butyricum*

Cl. gly. = *Clostridium glycolicum*
Cl. limo. = *Clostridium limosum*
1) Ergebnisse mittels PCR
2) Ergebnisse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Fortsetzung Tabelle 5: Qualitatives und quantitatives Vorkommen von Clostridia spp. in Rohstoff- und Gärrestproben von 15 Biogasanlagen aus Niedersachsen

| Anlage | Rohstoffe (S) Gärreste (R) | Nr. | GKZ in 1g/Untersuchungsmaterial | | | | | | | | | |
|--------|-------------------------------|-----|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | <i>Cl. p.</i> ¹⁾ | <i>Cl. sporo.</i> ²⁾ | <i>Cl. bif.</i> ²⁾ | <i>Cl. bara.</i> ²⁾ | <i>Cl. sord.</i> ²⁾ | <i>Cl. tyrob.</i> ²⁾ | <i>Cl. tert.</i> ²⁾ | <i>Cl. buty.</i> ²⁾ | <i>Cl. gly.</i> ²⁾ | <i>Cl. limo.</i> ²⁾ |
| C1 | S1 | 71 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 72 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 73 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 74 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 75 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 76 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 77 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C2 | S1 | 78 | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - | - | positiv |
| | S2 | 79 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 80 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 81 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 82 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 83 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - |
| | R3 | 84 | >10 ³ <10 ⁴ | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | positiv | - | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | - |
| C3 | S1 | 85 | >10 ⁵ <10 ⁶ | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 86 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 87 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | positiv | - | - | - | - |
| | S4 | 88 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 89 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 90 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 91 | >10 ³ <10 ⁴ | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - |
| C4 | S1 | 92 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - |
| | S2 | 93 | >10 ³ <10 ⁴ | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - |
| | S3 | 94 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 95 | >10 ² <10 ³ | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 96 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 97 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - |
| | R3 | 98 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C5 | S1 | 99 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - |
| | S2 | 100 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | >10 ³ <10 ⁴ | - | - |
| | S3 | 101 | >10 ⁴ <10 ⁵ | - | - | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - |
| | S4 | 102 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R1 | 103 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R2 | 104 | >10 ³ <10 ⁴ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 | 105 | >10 ² <10 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Cl. p. = *Clostridium perfringens*
Cl. sporo. = *Clostridium sporogenes*
Cl. bif. = *Clostridium bifementans*
Cl. bara. = *Clostridium baratii*

Cl. sord. = *Clostridium sordellii*
Cl. tyrob. = *Clostridium tyrobutyricum*
Cl. tert. = *Clostridium tertium*
Cl. buty. = *Clostridium butyricum*

Cl. gly. = *Clostridium glycolicum*
Cl. limo. = *Clostridium limosum*
1) Ergebnisse mittels PCR
2) Ergebnisse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Tabelle 6: Vorkommen u. Toxizität von *Cl. perfringens* in Rohstoffen und in Gärresten der Biogasanlagentypen A, B und C.

| Anlagen-Typ | Proben/ Material | Anzahl der Proben | Cl. perfringens positiv in % | Anzahl der Isolate ¹⁾ | Multiplex PCR | | | | | | | | | | α-Toxin Nagler-Einheiten (NE) | | | | |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|--------------------|--------------|--------------|----------------|-------------------|----------------|--------------------|--------------|----------------|-------------------|----------------------------------|-----------------|----------|-------------|-----------|
| | | | | | Majorletale Toxine | | | | | | Minorletale Toxine | | | | μ-Toxin Hyaluro- nidase | Theta- Toxin | ≤8 NE | 16-32 NE | ≥64 NE |
| | | | | | α- Toxin | β1- Toxin | β2- Toxin | NetB- Toxin | Epsilon- Toxin | Jota- Toxin | β1- Toxin | β2- Toxin | NetB- Toxin | Epsilon- Toxin | | | | | |
| A ₁ -A ₅ | Rohstoffe | 20 | 20 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | - | - |
| | Gärreste | 15 | 26,4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | - | - |
| B ₁ -B ₅ | Rohstoffe | 20 | 90 | 18 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 7 | - |
| | Gärreste | 15 | 66,6 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 1 |
| C ₁ -C ₅ | Rohstoffe | 20 | 95 | 19 | 19 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 1 | 3 |
| | Gärreste | 15 | 86,6 | 14 | 14 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 1 | 1 |
| Σ | Rohstoffe | 60 | 68,3 | 41 | 41 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 8 | 3 |
| | Gärreste | 45 | 62,2 | 28 | 28 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 7 | 2 |

1) Ergebnisse mittels PCR

k. A. = keine Angaben

Tabelle 7: Untersuchung auf Clostridium botulinum - Neurotoxin im Maus-Bioassay

| BGA | Typ | Probenmaterial | | Anzahl der Proben gesamt | Nachweis Neurotoxinbildner ¹⁾ | Toxinkonzentration (Dlm) | Toxintypen von Clostridium botulinum | | | | | | |
|---------------------|-----|----------------|---------------|---|--|--------------------------|--------------------------------------|---|---|---|---|-----------|---|
| | | Rohstoffe | Gärrückstände | | | | A | B | C | D | E | A/B/C/D/E | |
| 1 | A | x | | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | A | x | | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | A | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | A | x | x | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | A | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | B | x | | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | B | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | B | x | x | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | B | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | B | x | x | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | C | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | C | x | x | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | C | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | C | x | x | 3 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | C | x | x | 4 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Σ 15 Anlagen | | | | 105 davon 60x Rohstoff und 45x Gärreste | 0 | | | | | | | | |

1) Mittels 7 tägiger Anreicherung in einem Spezialnährboden zur Neurotoxin - Produktion mit nachfolgendem Toxinnachweis im Maus-Bioassay einschließlich Toxintypisierung (Dlm = Dosis letalis minima für ca. 25g schwere Mäuse)