



Gärrestnutzung unter Gesichtspunkten der Seuchenhygiene

Gerhard Breves, Susanne Riede
Physiologisches Institut

**Pflanzenbauliche Verwertung von Gärrückständen aus Biogasanlagen,
20./21.03.2013, Berlin**

Gliederung

- ▶ **1. Einleitung**
- 2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien**
- 3. Studiendesign**
- 4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen**
- 7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

Bildung von *Clostridium botulinum*-Toxin

<i>Clostridium botulinum</i>	-	7 Toxintypen A-G
<i>Clostridium barati</i>	-	Typ F
<i>Clostridium butyricum</i>	-	Typ E
<i>Clostridium limosum</i>	-	Typ C (eigene Untersuchungen)

Clostridium barati* und *Clostridium butyricum*- wahrscheinlich durch die Aufnahme von Toxinplasmiden von *Clostridium botulinum

Empfindlichkeit von Tieren und dem Menschen gegen die Toxine der *Clostridium botulinum*-Typen A-G

Toxintyp	Tiere	Mensch
A	Huhn, Nerz, Nutria, Fuchs	E
B	Schwein, Rind, Schaf, Ziege, Pferd	E
C	Vögel, Fische, Rind u.a. Wiederkäuer, Pferd, Nerz, Fuchs, Hund, Wolf, Schwein	R
D	Rind u.a. Wiederkäuer, Pferd	R
E	Nerz, Fische (Karpfen, Forelle u.a.)	E
F	nicht bekannt	E
G	nicht bekannt	E

E = empfindlich
R = resistent

Nachweis von *Bacillus* und *Clostridium* spp. in verschiedenen Substraten

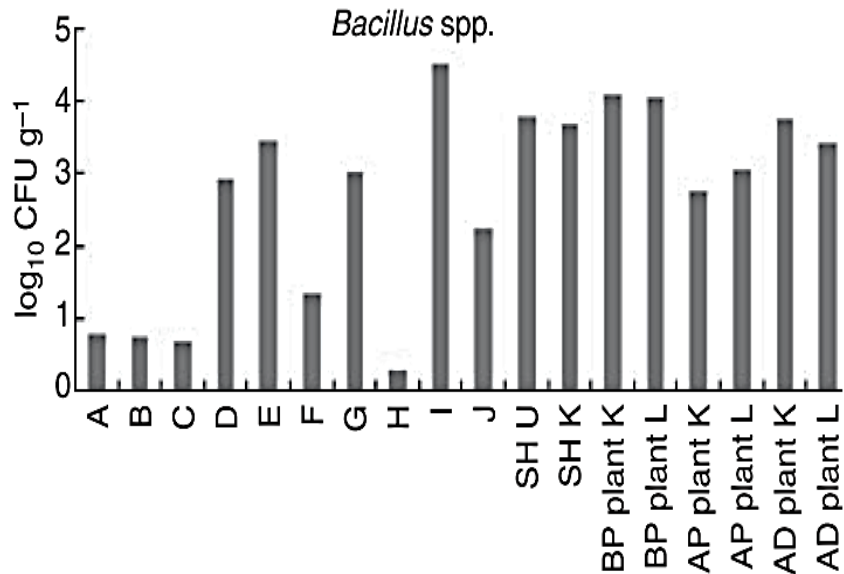


Figure 2 Mean values of the quantities of bacteria representing *Bacillus* spp. *Lysinobacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. in the different sampling materials. SH, slaughterhouse waste from slaughterhouses U and K; BG, biogas plants K and L; BP, before pasteurization; AP, after pasteurization; AD, after digestion.

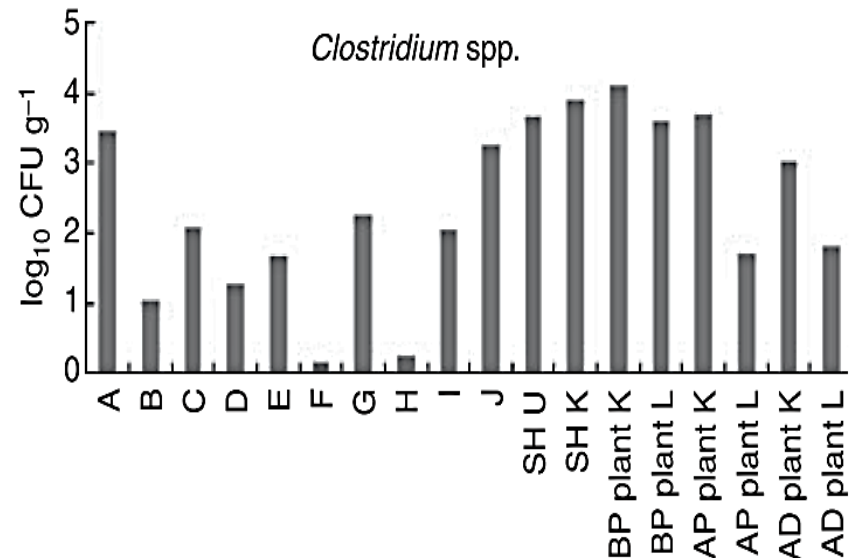
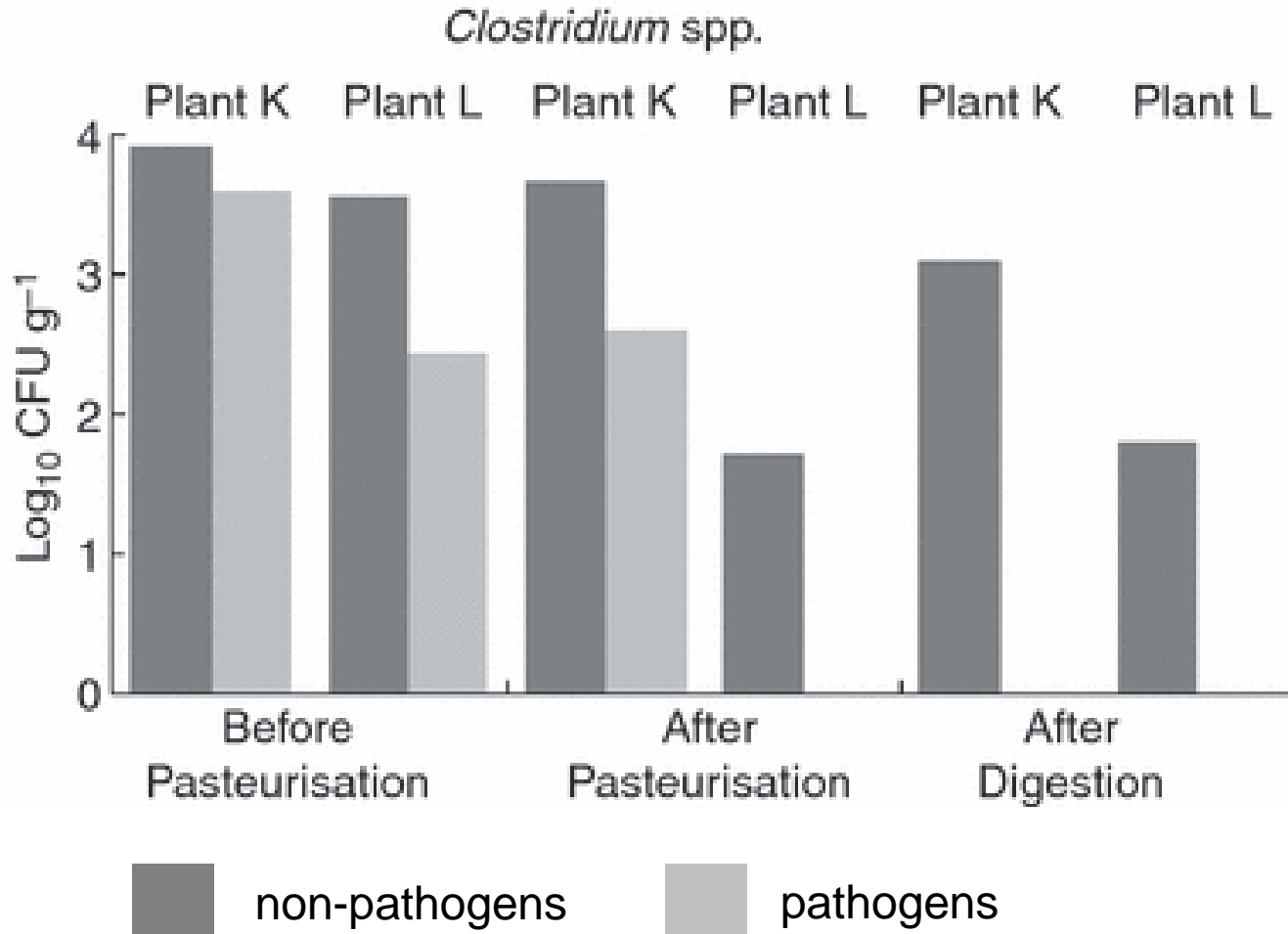


Figure 3 Mean values of the quantities of bacteria representing *Clostridium* spp. in different sampling materials. SH, slaughterhouse waste from slaughterhouses U and K; BG, biogas plants K and L; BP, before pasteurization; AP, after pasteurization; AD, after digestion.

(Bagge et al. 2010)

Clostridiendichte zu unterschiedlichen Phasen des Biogasprozesses



(Bagge et al. 2010)

Gliederung

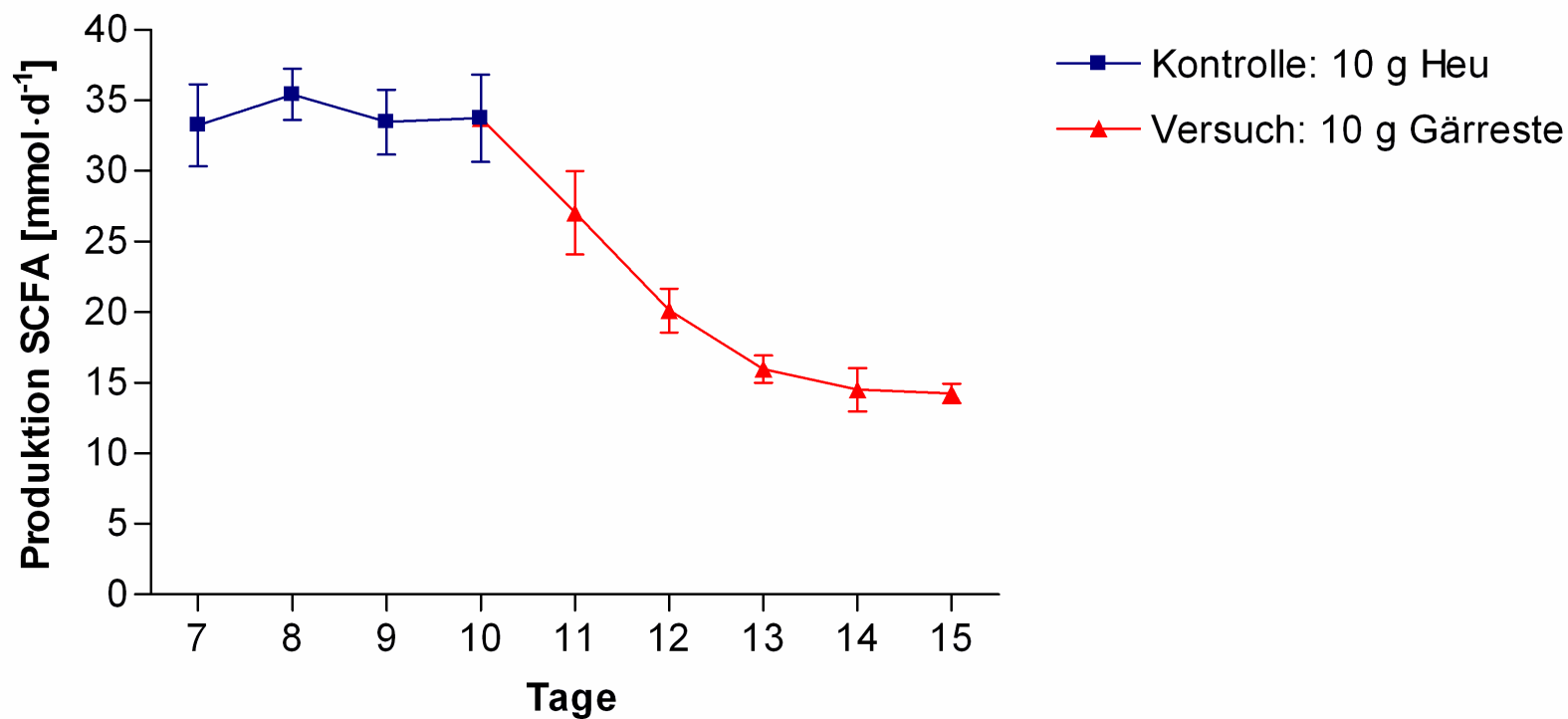
1. Einleitung
- ▶ 2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien
3. Studiendesign
4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum
5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme
6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen
7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens*

Rohnährstoffe Heu, Stroh, Gärrückständen (FR) und Güllepartikeln (MP)



Crude nutrients (% DM)	Hay	Straw	FR	MP
Ash	7.7	5.8	10.4	18.1
Crude fat	1.9	0.7	1.3	3.6
Crude protein	12.2	2.9	13.4	11.6
Crude fibre	30.3	47.2	30.5	26.6
NfE	47.9	43.5	44.3	40.2

SCFA



Gliederung

1. Einleitung
2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien
- ▶ 3. Studiendesign
4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum
5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme
6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen
7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens*

Studie zum mikrobiologischen Risikopotenzial von Biogasanlagen



Projektnehmer:

- Physiologisches Institut, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover in Kooperation mit dem RIPAC – Labor, Potsdam-Golm

Förderung:

- Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung

Studiendesign:

- 15 niedersächsische Biogasanlagen
- Je 5 Anlagen aus Milchvieh-, Ackerbau- und Veredelungsregionen
- Beprobung jeder Anlage: Gärsubstrate an vier aufeinanderfolgenden Tagen;
- Gärreste an drei aufeinanderfolgenden Tagen
- Nach Entnahme der Proben Kühlung bei + 4°C
- Transport der Proben zum Ripac-Labor (Potsdam)

Mikrobiologische Analytik in Gärsubstraten und Gärresten:

- Gesamtkeimzahl der Anaerobier und Aerobier
- Spezielle Untersuchungen auf: pathogene *Clostridien*, *Clostridium botulinum* inkl. Toxinnachweis, *Salmonellen*, pathogene *E. coli* und andere

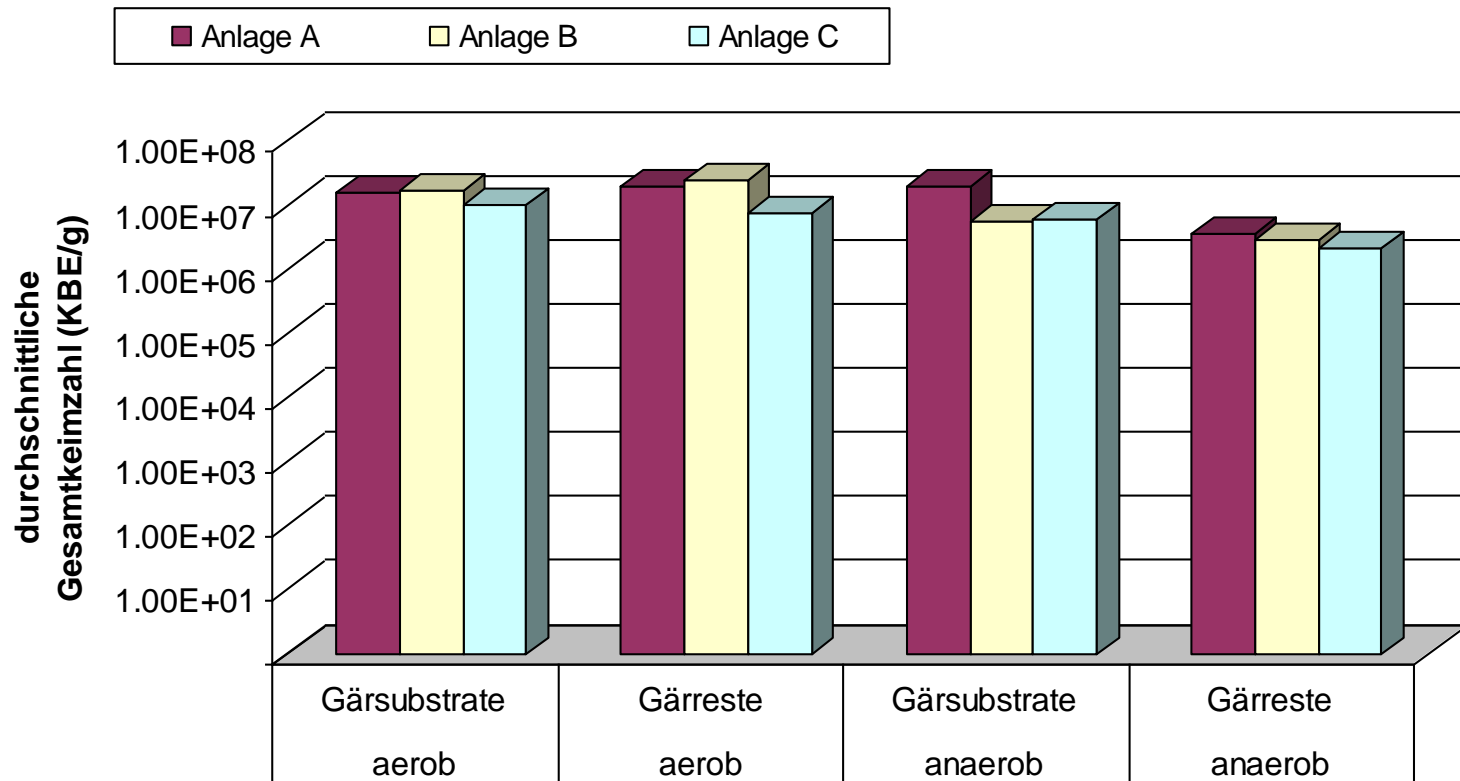
Übersicht Anlagentyp und Gärsubstrate

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. Hühner-trockenkot
C5	70% Mais, 30% Gülle

Gliederung

1. Einleitung
2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien
3. Studiendesign
- ▶ 4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum
5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme
6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagentypen
7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens*

Gesamtkeimzahlen (aerob/anaerob) in Gärsubstraten und Gärresten

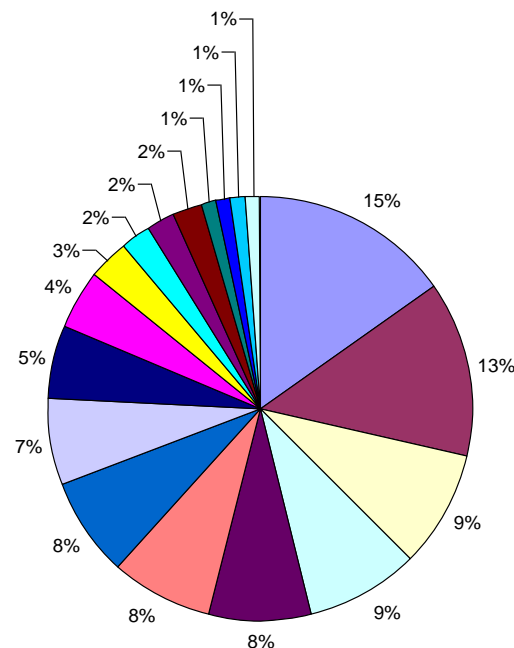
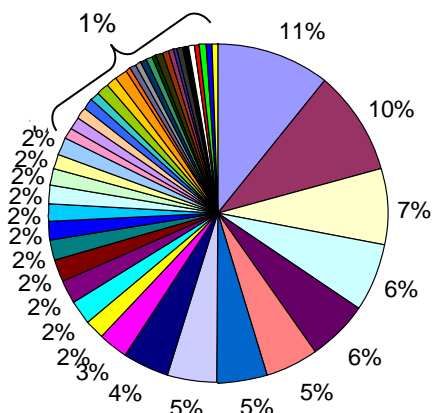


Spektrum der Mikroflora; Anlagen A

Gärssubstrate

Gärreste

- | | | |
|---|-------------------------------|--|
| ■ Bacillus spp. | ■ unbekannter Erreger | □ Streptococcus bovis/equinus |
| □ Micrococcus spp. | ■ Streptococcus spp. | ■ Bacillus licheniformis |
| ■ Clostridium perfringens | □ Enterococcus spp. | ■ Schimmelpilze |
| ■ Alcaligenes faecalis | ■ Bacillus cereus group | ■ Clostridium baratii |
| ■ Clostridium bifementans | ■ Clostridium tertium | ■ Staphylococcus spp. |
| ■ Clostridium butyricum | ■ Enterococcus cecorum | □ Geotrichum candidum/klebahnii |
| □ Hefen | ■ Pichia fermentans | ■ Pseudomonas spp. |
| ■ Bifidobacterium spp. | ■ Clostridium sporogenes | ■ Clostridium spp. |
| ■ Enterococcus spp. | ■ Escherichia coli | ■ Proteus vulgaris |
| ■ Scopulariopsis brevicaulis | ■ Staphylococcus spp. | ■ Absidia corymbifera |
| ■ Aneurinibacillus spp. | ■ Bacillus spp. | ■ Bacillus lentus |
| ■ Bacillus pumilus | ■ Clostridium D11-0088-1-1-16 | ■ Clostridium tyrobutyricum |
| ■ Enterobacter asburiae | ■ Enterobacter spp. | ■ Enterococcus faecium |
| ■ Escherichia coli | ■ Lactobacillus curvatus | □ Lysinibacillus fusiformis/sphaericus |
| ■ Paenibacillus spp. | ■ Proteus mirabilis | ■ Raoultella ornithinolytica |
| ■ Streptococcus infantarius/lutetiensis | | |



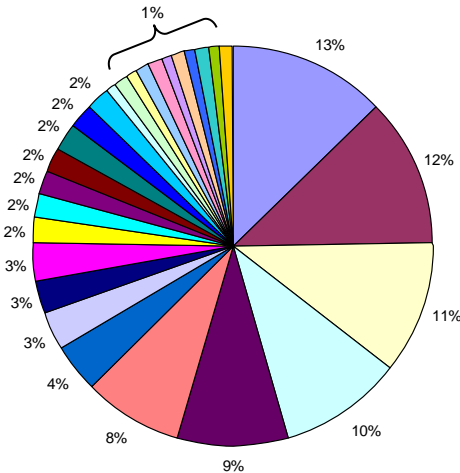
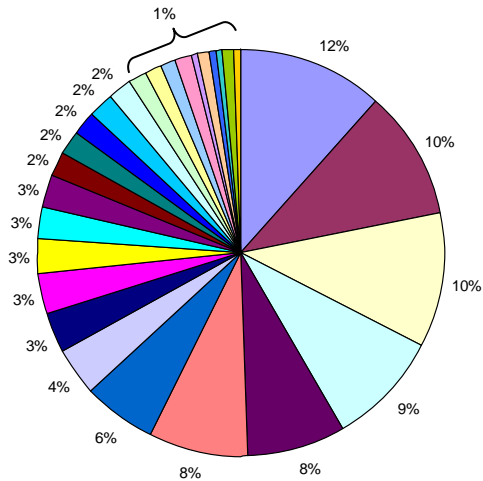
- | |
|--|
| ■ Bacillus spp. |
| ■ unbekannter Erreger |
| □ Enterococcus spp. |
| □ Streptococcus spp. |
| ■ Micrococcus spp. |
| ■ Schimmelpilze |
| ■ Streptococcus bovis/equinus |
| □ Clostridium perfringens |
| ■ Bacillus cereus group |
| ■ Clostridium bifementans |
| ■ Clostridium sporogenes |
| ■ Alcaligenes faecalis |
| ■ Bacillus pumilus |
| ■ Pseudomonas spp. |
| ■ Bacillus lentus |
| ■ Clostridium baratii |
| ■ Clostridium tyrobutyricum |
| □ Lysinibacillus fusiformis/sphaericus |

Spektrum der Mikroflora; Anlagen B

Gärssubstrate

Gärreste

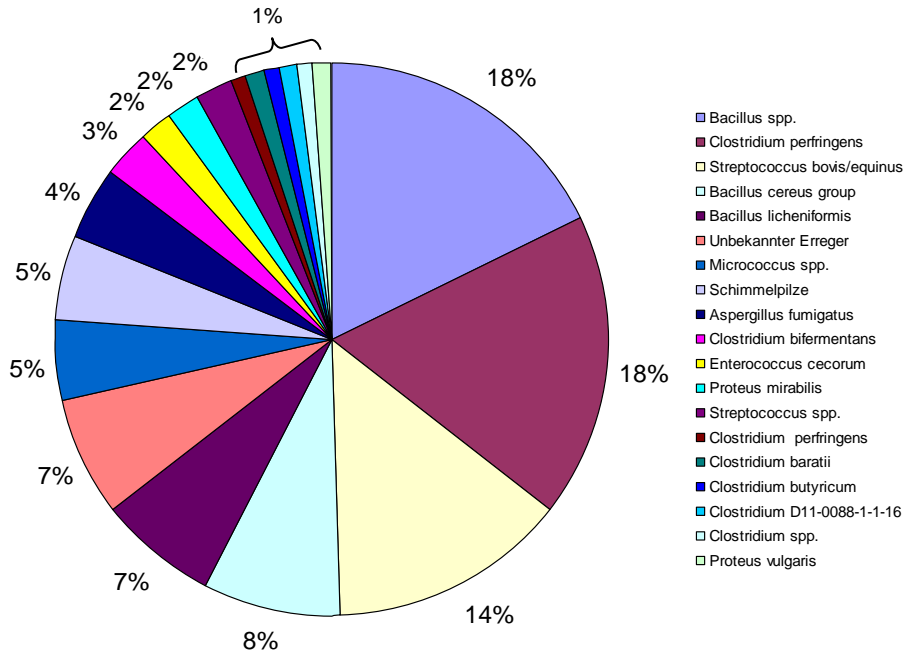
- | | | |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ■ Clostridium perfringens ■ Streptococcus bovis/equinus ■ Streptococcus spp. ■ Pichia membranifaciens ■ unbekannter Erreger Gruppe L ■ Bacillus spp. ■ Bacillus lentus ■ Riemerella M2878 ■ Clostridium perfringens ■ Coliforme | <ul style="list-style-type: none"> ■ Bacillus spp. ■ Bacillus licheniformis ■ Proteus mirabilis ■ Clostridium bifementans ■ Alcaligenes faecalis ■ Micrococcus spp. ■ Bacillus subtilis ■ Bacillus spp. ■ Clostridium butyricum | <ul style="list-style-type: none"> □ unbekannter Erreger ■ Micrococcus spp. ■ Hefen ■ Escherichia coli ■ Bacillus cereus group □ Schimmelpilze ■ Proteus spp. ■ Bacillus pumilus ■ Clostridium sporogenes |
|--|--|--|



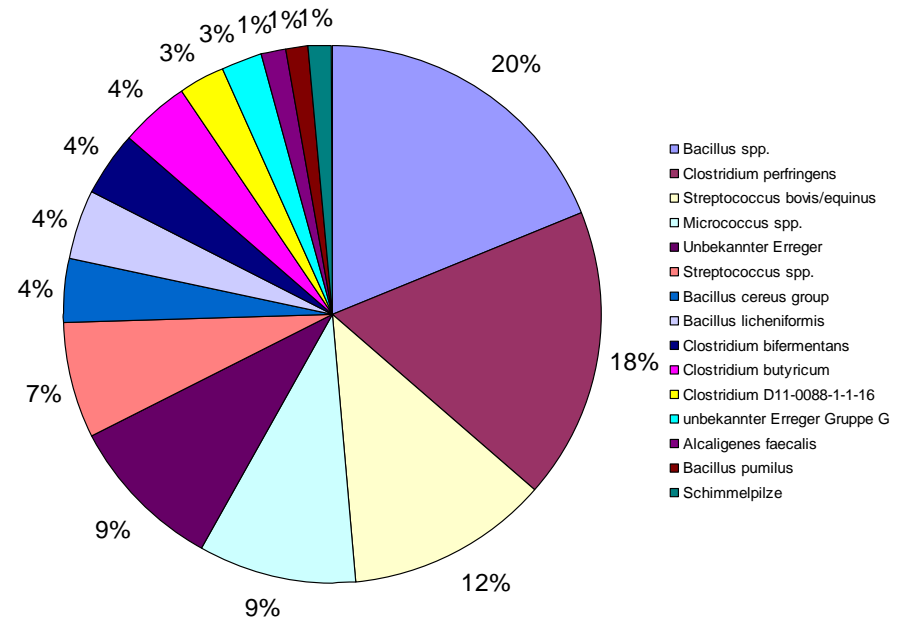
- Clostridium perfringens
- Bacillus spp.
- Streptococcus bovis/equinus
- Micrococcus spp.
- Unbekannter Erreger
- Bacillus licheniformis
- Clostridium bifementans
- Bacillus pumilus
- Pichia membranifaciens
- Schimmelpilze
- Clostridium butyricum
- Escherichia coli
- Hefen
- Proteus mirabilis
- Streptococcus spp.
- unbekannter Erreger Gruppe K
- unbekannter Erreger Gruppe L
- Bacillus cereus group
- Bacillus circulans
- Bacillus lentus
- Bacillus spp.
- Clostridium D11-0088-1-1-16
- Clostridium sporogenes
- Clostridium tyrobutyricum
- Coliforme
- Enterococcus spp.
- Micrococcus spp.
- Pseudallescheria angusta/boydii Komplex

Spektrum der Mikroflora; Anlagen C

Gärsubstrate



Gärreste



Gliederung

1. Einleitung
2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien
3. Studiendesign
4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum
- ▶ 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme
6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen
7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens*

Untersuchung auf Neurotoxin-bildende Stämme von *Clostridium botulinum*



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	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
2	A	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
3	A	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
4	A	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
5	A	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
6	B	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
7	B	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
8	B	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
9	B	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
10	B	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
11	C	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
12	C	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
13	C	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
14	C	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	0	-	-	-	-	-	-	
15	C	x		4	0	-	-	-	-	-	-	-
			x	3	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)

Stellungnahme der
Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)
zum „chronischen Botulismus“ beim Menschen (08.02.2012)



„Das Syndrom eines humanen chronischen Botulismus bei Menschen, die in der Landwirtschaft tätig sind, wird postuliert, ohne dass bisher ein eindeutiger Beweis für seine Existenz gelungen ist.“

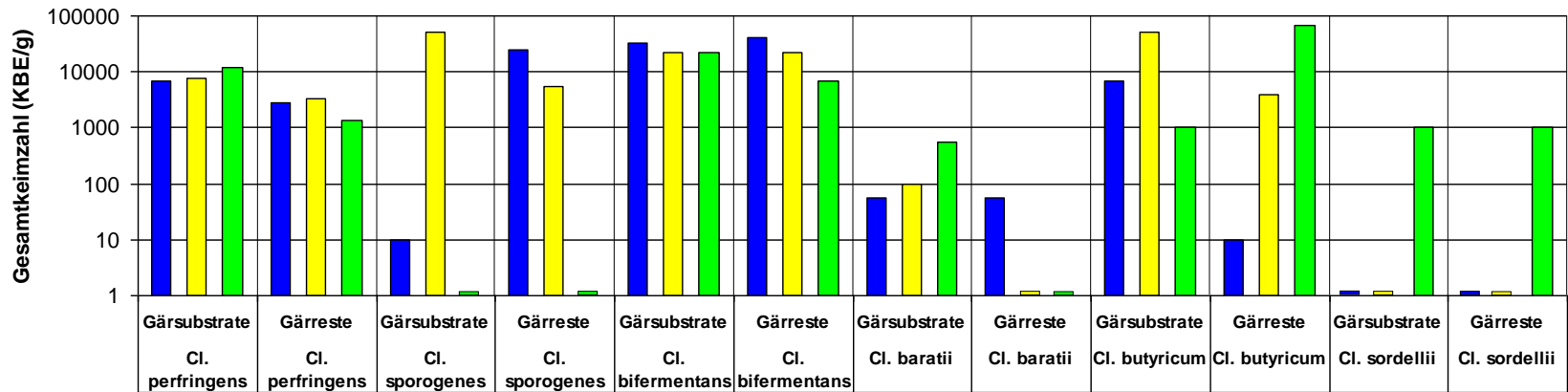
Dressler, D., Saberi, F.A. (2009): Botulinum Toxin: vom Medikament zum Toxin. Fortschr. Neurol. Psychiat. 77, Suppl. 1

Gliederung

1. Einleitung
2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien
3. Studiendesign
4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum
5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme
- ▶ 6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagentypen
7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens*

Gesamtkeimzahlen für verschiedene *Clostridien*-Spezies in Gärsubstraten und Gärresten

■ Anlagen A1-A5
 ■ Anlagen B1-B5
 ■ Anlagen C1-C5

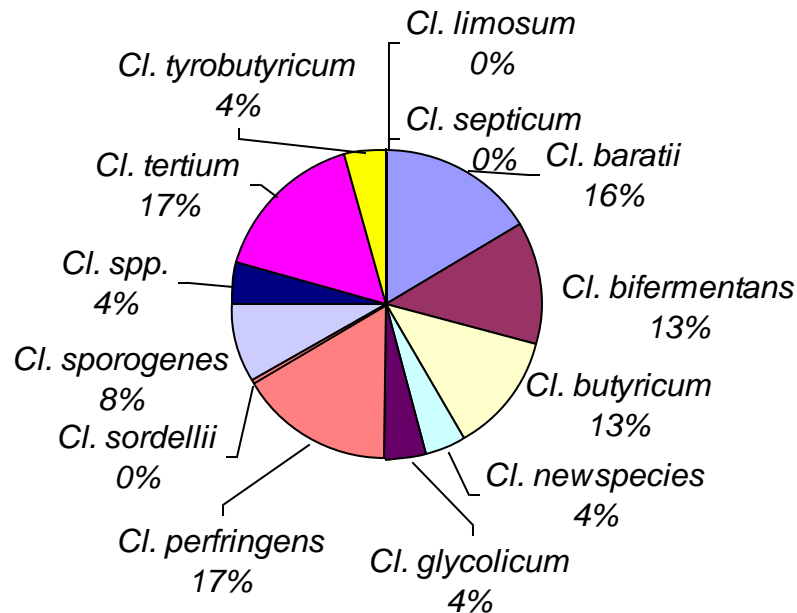


Clostridien Gärsubstrate und Gärreste

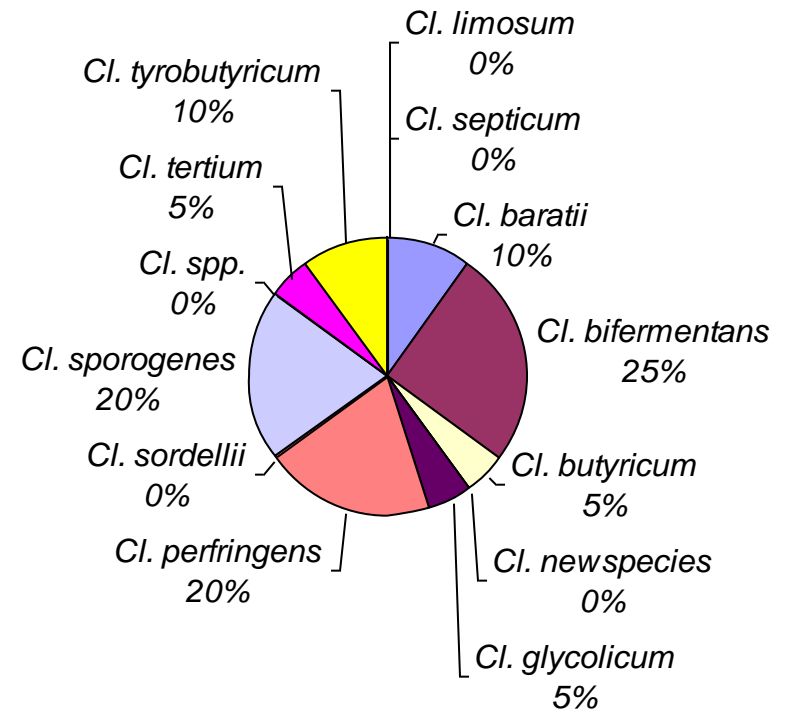
Anlagen A1-A5



Gärsubstrate



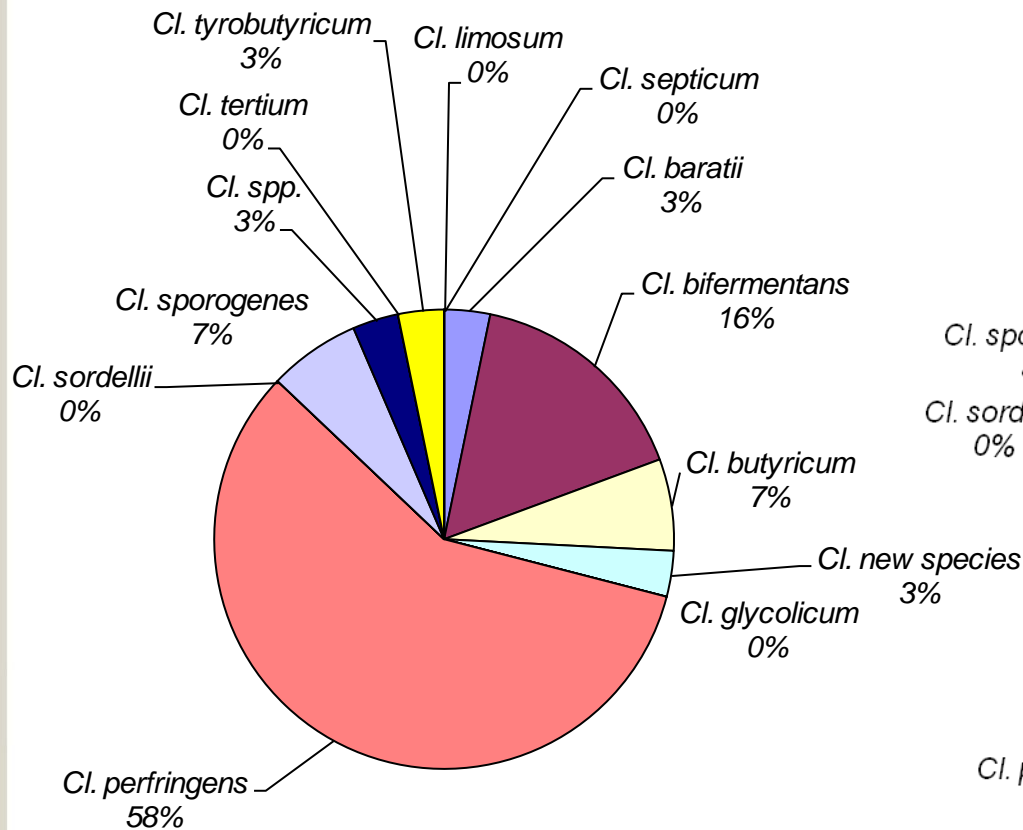
Gärreste



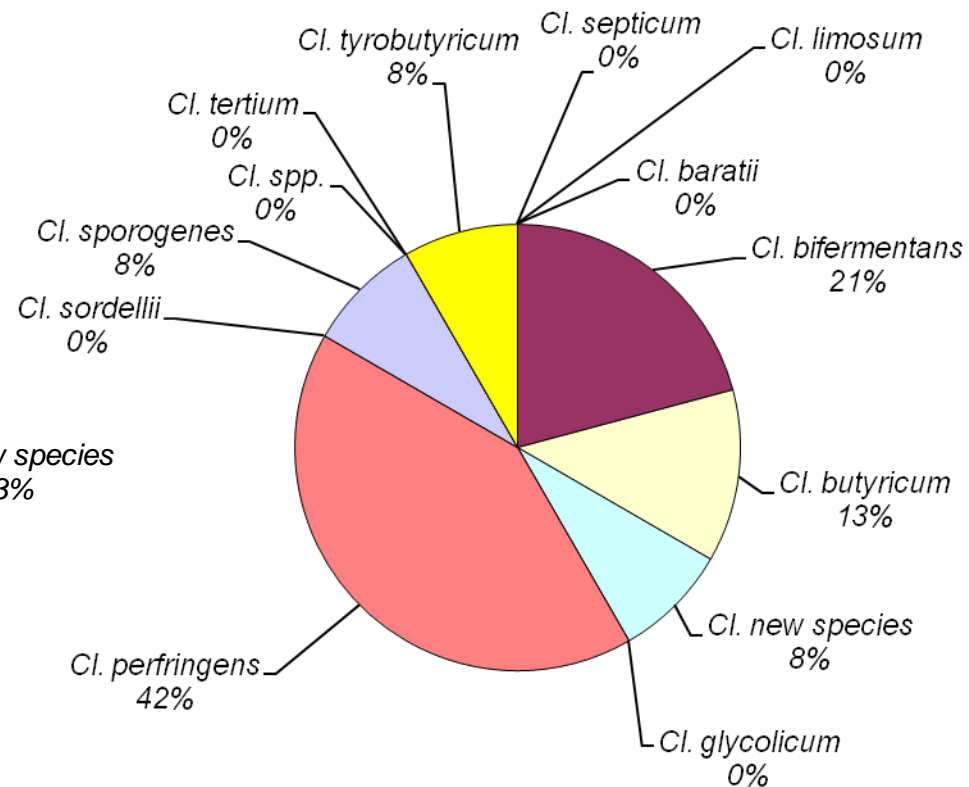
Clostridien Gärsubstrate und Gärreste

Anlagen B1-B5

Gärsubstrate



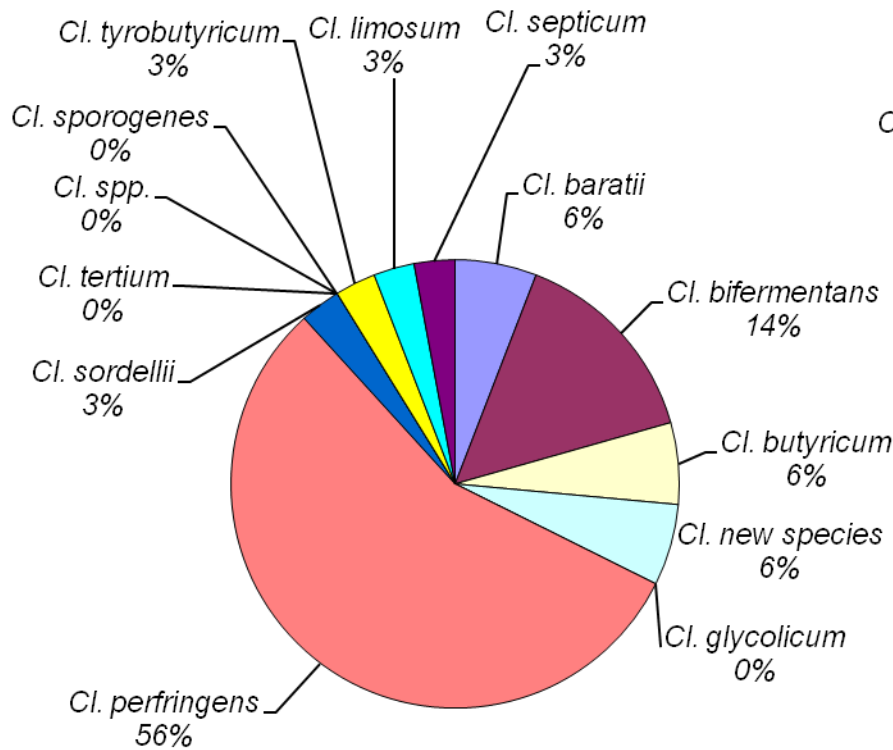
Gärreste



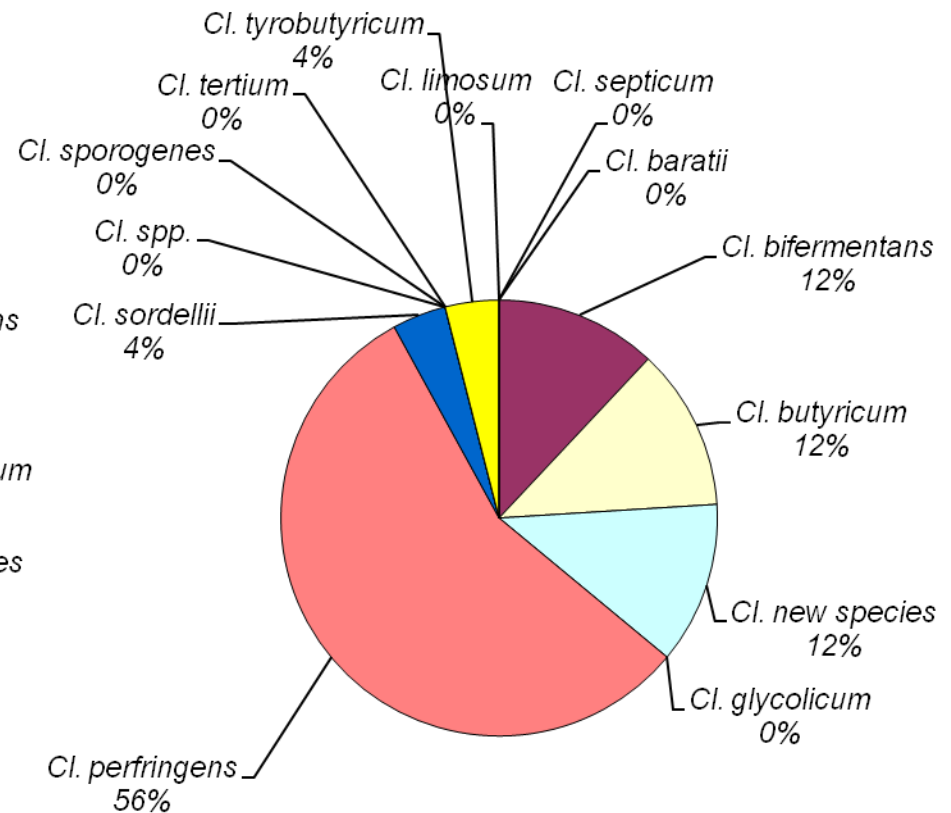
Clostridien Gärsubstrate und Gärreste

Anlagen C1-C5

Gärsubstrate



Gärreste



Gliederung

1. Einleitung
2. Nutzung von Gärsubstraten für innovative Biogastechnologien
3. Studiendesign
4. Gesamtkeimzahlen und Keimspektrum
5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme
6. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen
- ▶ 7. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens*

Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens* in Gärsubstraten und Gärresten



Anlagen	Proben	N	<i>Cl. perfringens</i> positiv in %	Isolate (N)	Multiplex PCR								α-Toxin Nagler-Einheiten (NE)		
					Majorletale Toxine						Minorletale Toxine		≤8 NE	16-32 NE	≥64 NE
					α-Toxin	β1-Toxin	β2-Toxin	NetB-Toxin	Epsilon-Toxin	Jota-Toxin	μ-Toxin Hyaluronidase	Theta-Toxin			
A	G.substrate	20	20,0	4	4	0	1	0	0	0	k. A.	4	4	-	-
	Gärreste	15	26,4	4	4	0	1	0	0	0	k. A.	4	4	-	-
B	G.substrate	20	90,0	18	17	0	0	0	0	0	k. A.	18	11	7	-
	Gärreste	15	66,6	10	10	0	0	0	0	0	k. A.	10	3	6	1
C	G.substrate	20	95,0	19	19	0	6	0	0	0	k. A.	19	15	1	3
	Gärreste	15	86,6	14	14	0	5	0	0	0	k. A.	14	12	1	1

Zusammenfassung

Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

- Hohe mikrobielle Diversität in Gärsubstraten und Gärresten
- Kein Nachweis von Neurotoxin produzierendem *Cl. botulinum* in Gärsubstraten und Gärresten
- Angabe der Keimgehalte in KBE/g → Bei Berücksichtigung der Fermentation der organischen Substanz → Absoluter Keimeintrag > Keimaustrag; also: Hygienisierung anstelle von Keimanreicherung



Danksagung

- ▶ **Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung**
- ▶ **den Betreibern der an der Studie beteiligten Anlagen**
- ▶ **Kompetenzzentrum Niedersachsen – Netzwerk Nachwachsende Rohstoffe e.V. - 3N**
- ▶ **...und Ihnen für Ihre Aufmerksamkeit**