

Aus der Professur für Abfall- und Stoffstromwirtschaft
und der Professur für Tiergesundheit und Tierschutz
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

Vorkommen und Vermeidung pathogener Clostridien in Gärsubstraten und Gärresten von Biogasanlagen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
M. Sc. Beatrix Lüdecke

Gutachter:

Prof. Dr. Michael Nelles (Universität Rostock, Professur für Abfall- und Stoffstromwirtschaft)
Prof. Dr. Elmar Mohr (Universität Rostock, Professur für Tiergesundheit und Tierschutz)
Prof. Dr. Uwe Rösler (Freie Universität Berlin, Institut für Tier- und Umwelthygiene)
Dr.-Ing. Thomas Fritz (Union Agricole Holding AG)

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

Danksagung

Ich möchte allen, die mich bei der Bearbeitung
meines Promotionsthemas unterstützt haben, ganz herzlich danken:

- ❖ Herrn Prof. Dr. Michael Nelles für die gute Betreuung und die gewährten Freiräume,
- ❖ Herrn Prof. Dr. Elmar Mohr und Herrn Prof. Dr. Uwe Rösler für die Begutachtung,
- ❖ Dr.-Ing. Thomas Fritz für die vielen guten Anregungen während der Schaumann-Besprechungen in Wahlstedt und die Begutachtung,
- ❖ Dr. Regina Dibbert (Professur für Tiergesundheit und Tierschutz) für die Einführung in die mikrobiologische Forschung, die vielen guten Diskussionen und Anregungen und die unzähligen gemeinsamen Stunden im Labor,
- ❖ der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die finanzielle Unterstützung,
- ❖ den Geschäftsführern Herrn Dr. Edmund Matthies und Herrn Dietmar Ramhold sowie allen Mitarbeitern der ISF - Ilse Schaumann Forschung GmbH, insbesondere Dr. Ewald Kramer, Dr.-Ing. Dirk Banemann und Dr.-Ing. Claudia Demmig für die konstruktiven Diskussionsanregungen, die umfangreichen Laboranalysen und die tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen,
- ❖ den Mitarbeitern der Professur für Abfall- und Stoffstromwirtschaft, insbesondere Dr. Andrea Schüch für die Ermutigung zur Promotion, Dr.-Ing. Nils Engler und Kersten Eckermann für ihre tatkräftige Unterstützung im Bioenergietechnikum, Jennifer Grünes für die Mitfahrten zu den Biogasanlagen und Christine Herz fürs Organisieren,
- ❖ den Studenten Sarah Becker, Karsten Wulf und Rainer Cramer,
- ❖ Frau Dr. Köhler-Repp und den Mitarbeitern der RIPAC Labor GmbH,
- ❖ meiner Familie und besonders meinem Ehemann Dr. med. Tom Günther für den Rückhalt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	iii
Tabellenverzeichnis.....	iv
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	2
2.1 Clostridien.....	2
2.1.1 Systematik.....	2
2.1.2 Merkmale, Sporulation und Resistenz	3
2.1.2.1 <i>Clostridium perfringens</i>	5
2.1.2.2 <i>Clostridium botulinum</i>	6
2.1.2.3 <i>Clostridium sporogenes</i>	8
2.2 Organischer Abfall	9
2.2.1 Bioabfall.....	9
2.2.2 Tierische Nebenprodukte.....	10
2.3 Biogasanlagen	12
2.3.1 Aufbau.....	12
2.3.2 Prozess.....	14
2.3.3 Hygienisierung.....	15
2.3.4 Gärrückstandsverwertung.....	16
3 Eigene Untersuchungen	17
3.1 Material.....	17
3.2 Methoden.....	19
3.2.1 Anlagenscreening.....	19
3.2.1.1 Untersuchungsgebiet	19
3.2.1.2 Auswahl	19
3.2.1.3 Befragung	20
3.2.1.4 Probenahme	20

3.2.1.5	Nährmedienherstellung	20
3.2.1.6	Mikrobiologische Untersuchungen der Proben	21
3.2.1.7	Externe Analyse mittels MALDI-TOF-MS	22
3.2.2	Hygienisierungsversuche.....	23
3.2.2.1	Nährmedienherstellung	23
3.2.2.2	Kultivierung und Vermehrung der Clostridienstämme.....	23
3.2.2.3	Bestimmung des Sporenanteils	23
3.2.2.4	Temperaturbehandlung der Clostridiensporen	23
3.2.2.5	Wachstumskontrolle nach Temperatureinwirkung	25
3.2.2.6	Statistische Analysen	25
3.3	Untersuchungsergebnisse.....	26
3.3.1	Anlagenscreening.....	26
3.3.1.1	Befragung	26
3.3.1.2	Probenahme	27
3.3.1.3	Screening.....	28
3.3.2	Hygienisierungsversuche.....	44
3.3.2.1	Versuche mit 70°C	44
3.3.2.2	Versuche mit 90°C	46
3.3.2.3	Versuche mit 100 °C	48
3.3.2.4	Versuche mit 121 °C	51
3.3.2.5	Versuche mit 134 °C	53
3.4	Diskussion	55
3.4.1	Material.....	55
3.4.1.1	Anlagenscreening	55
3.4.1.2	Hygienisierungsversuche	55
3.4.2	Methoden	56
3.4.2.1	Anlagenscreening	56
3.4.2.2	Hygienisierungsversuche	57
3.4.3	Untersuchungsergebnisse	59

3.4.3.1	Anlagenscreening	59
3.4.3.2	Hygienisierungsversuche	64
4	Schlussfolgerungen	66
5	Literaturverzeichnis	68
6	Anhangsverzeichnis	84
7	Anhang.....	85

Abkürzungsverzeichnis

16S rRNS	=	16 Svedberg schweres ribosomale Ribonukleinsäure – Molekül
23S rRNS	=	23 Svedberg schweres ribosomale Ribonukleinsäure – Molekül
ANI-Wert	=	Average Nucleotide Identity-Wert
a_w -Wert	=	Wasser Aktivitäts-Wert
BioAbfV	=	Bioabfallverordnung
BMEL	=	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bzw.	=	beziehungsweise
C.	=	Clostridium
Ca ²⁺ -Ionen	=	Kalzium-Ionen
CDC	=	Center for Disease Control and Prevention, Atlanta
Da	=	Dalton
DBFZ	=	Deutsches Biomasse Forschungszentrum
Destatis	=	Statistisches Bundesamt
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
DRCM	=	Differential Reinforced Clostridial Medium
DSMZ	=	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
D-Wert	=	Dezimalreduktionswert
DüMV	=	Düngemittelverordnung
EG	=	Europäische Gemeinschaft
et al.	=	et alii
FNR	=	Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe
GC-Gehalt	=	Guanin-Cytosin-Gehalt
GKZ	=	Gesamtkeimzahl
°C	=	Grad Celsius
h	=	Stunde
HTK	=	Hühnertrockenkot
H ₂ S	=	Schwefelwasserstoff
i. d. R.	=	in der Regel
JCICSB	=	Judical Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology
k. A.	=	keine Angabe
KBE	=	Keim bildende Einheiten
kDa	=	Kilodalton
KrWG	=	Kreislaufwirtschaftsgesetz

m ³	=	Kubikmeter
LUNG	=	Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie
MALDI-TOF MS	=	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry
m%	=	Masseprozent
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
µl	=	Mikroliter
µm	=	Mikrometer
mCP-Agar	=	Membran-Clostridium-Perfringens-Agar
NaCl	=	Natriumchlorid
NawaRo	=	Nachwachsende Rohstoffe
NE	=	Naglereinheiten
NH ₃	=	Ammoniak
NiedMinUK	=	Niedersächsisches Ministerium für Umwelt und Klimaschutz
pH	=	pondus hydrogenii
§	=	Paragraf
%	=	Prozent
RL	=	Richtlinie
sp.	=	Spezies
TierNebG	=	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz
TierNebV	=	Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung
TRBA	=	Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe
V	=	Verordnung
&	=	und
usw.	=	und so weiter
z. B.	=	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cluster zu Anlage 2.....	29
Abbildung 2: Cluster zu Anlage 3.....	30
Abbildung 3: Cluster zu Anlage 4.....	31
Abbildung 4: Cluster zu Anlage 5.....	32
Abbildung 5: Cluster zu Anlage 6.....	33
Abbildung 6: Cluster zu Anlage 7.....	34
Abbildung 7: Cluster zu Anlage 8.....	35
Abbildung 8: Cluster zu Anlage 9.....	36
Abbildung 9: Cluster zu Anlage 10.....	37
Abbildung 10: Cluster zu Anlage 11.....	38
Abbildung 11: Cluster zu Anlage 12.....	39
Abbildung 12: Cluster zu Anlage 13.....	40
Abbildung 13: Cluster zu Anlage 14.....	41
Abbildung 14: Cluster zu Anlage 15.....	42
Abbildung 15: Cluster zu Anlage 16.....	43
Abbildung 16: Wachstum von <i>C. perfringens</i> nach 70 °C	44
Abbildung 17: Wachstum von <i>C. sporogenes</i> nach 70 °C.....	45
Abbildung 18: Wachstum von <i>C. perfringens</i> nach 90 °C	46
Abbildung 19: Wachstum von <i>C. sporogenes</i> nach 90 °C.....	48
Abbildung 20: Wachstum von <i>C. perfringens</i> nach 100 °C	49
Abbildung 21: Wachstum von <i>C. sporogenes</i> nach 100 °C.....	51
Abbildung 22: Wachstum von <i>C. perfringens</i> und <i>C. sporogenes</i> nach 121 °C	52
Abbildung 23: Wachstum von <i>C. perfringens</i> und <i>C. sporogenes</i> nach 134 °C.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematik der Gattung Clostridium	2
Tabelle 2: Phänotypische Unterschiede von botulinumtoxinbildenden Organismen	8
Tabelle 3: <i>C. perfringens</i> - untersuchte Temperaturen, Zeitintervalle und Medien.....	24
Tabelle 4: <i>C. sporogenes</i> - untersuchte Temperaturen, Zeitintervalle und Medien.....	24
Tabelle 5: tägliche Biogasproduktion in befragten Anlagen	27
Tabelle 6: Anlagenauswahl für Screening	28
Tabelle 7: Ergebnisse der quantitativen Anzüchtung für Vergärungsanlage Nr. 1	29
Tabelle 8: <i>C. perf.</i> - 90 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen.....	47
Tabelle 9: <i>C. sporo.</i> - 90 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen.....	48
Tabelle 10: <i>C. perf.</i> - 100 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen	50
Tabelle 11: <i>C. sporo.</i> - 100 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen.....	51
Tabelle 12: 121 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen	53
Tabelle 13: <i>C. sporo.</i> - 134 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen.....	54

1 Einleitung

Seit dem Jahr 2015 verlangt die Europäische Union die getrennte Sammlung organischer Abfälle in allen europäischen Ländern (RL 2008/98/EG). In Deutschland wurden im Jahr 2017 3,8 Millionen Tonnen Bioabfälle von Haushalten in Biotonnen gesammelt (DESTATIS, 2018). Weitere 603.000 Tonnen organische Abfälle wurden aus Kantinen und Restaurants sowie 76.000 Tonnen Marktabfälle erfasst (DESTATIS, 2018). Die anaerobe Behandlung in Biogasanlagen ist einer der Verwertungswege der gesammelten organischen Abfälle. Hierfür schreibt die Bioabfallverordnung jedoch eine Hygienisierung des organischen Abfalls bei 70 °C für eine Stunde vor (BioABFV, 2017). In Übereinstimmung mit den Vorschriften und der epidemisch-hygienischen Unbedenklichkeit dürfen Gärreste aus Abfallvergärungsanlagen auf Grünland ausgebracht werden (BioABFV, 2017). Immer wieder gibt es in der Presse Meldungen, dass von Biogasanlagen ein Gesundheitsrisiko für Menschen und landwirtschaftliche Nutztiere durch die unbeabsichtigte Vermehrung pathogener Clostridien während der Fermentation in Biogasreaktoren ausgehen kann (KRÜGER, 2005; BESTE, 2007; PUBANTZ, 2010; BOLL, 2011; ANONYMOUS, 2012). Aufgrund der unterschiedlichen Substratgruppen, die in Biogasanlagen eingesetzt werden, könnten sich viele potentielle Eintragsquellen ergeben. Nach Meinung von BÖHNEL & GESSLER (2010) können dazu unter anderem Rinder-, Schweinegülle, Rinder-, Schweine-, Geflügelmist und Hühnertrockenkot, nachwachsende Rohstoffe (NawaRo, vor allem verunreinigte Grassilagen), aber auch Bioabfälle zählen. Durch das Ausbringen der mit pathogenen Clostridien belasteten Gärreste auf Grünfütterflächen kann der meist zu Silagen verarbeitete Grünschnitt kontaminiert werden und ins Tierfutter gelangen (HELLWIG, 2010). KÖHLER (2011) hat im Rahmen seiner Erhebungen festgestellt, dass beim Großteil der selbst untersuchten Fälle, deren Erkrankungen als „chronischer“ beziehungsweise „viszeraler“ Botulismus bezeichnet wurden, keine Intoxikationen durch Neurotoxine von *Clostridium botulinum* nachweisbar waren. Hingegen wurden oft mehrere gleichzeitig ablaufende Infektionen mit anderen pathogenen Clostridien nachgewiesen (KÖHLER, 2011). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Gärrestverwertung und einem steigenden Erkrankungsrisiko von Viehbeständen wurde bisher aber weder bestätigt noch widerlegt (BFR, 2010). Nach LEBUHN und WILDERER (2006) sowie HABER (2008) blieben aber anaerobe Sporenbildner, wie *Clostridium perfringens*, in ihrer Keimzahl in Gülle und im Gärrest nahezu unverändert. Die Sensibilisierung für das Thema Gärrest(aus)wirkung steigt auch mit der Anzahl und Dichte von Biogasanlagen. In der vorliegenden Dissertation wurde dazu mit zwei Forschungsansätzen gearbeitet:

- Im Rahmen eines Anlagenscreenings sollten die In- und Outputs verschiedener Biogasanlagen auf Vorhandensein pathogener Clostridien getestet werden. Die Ergebnisse sollen die Eintrags- und Verbreitungswege pathogener Clostridien in Vergärungsanlagen aufzeigen.
- Unter Verwendung von Sporen pathogener Clostridien sollte in Hygienisierungsversuchen deren Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen in Abhängigkeit verschiedener Verweildauern geprüft werden.

2 Schrifttum

2.1 Clostridien

2.1.1 Systematik

Die taxonomische Aufteilung der Bacteria erfolgte anfangs durch Aussehen und Physiologie (siehe Tabelle 1). Dabei wurden der Gattung Clostridium über 120 heterogene, obligat anaerobe, endosporenbildende, grampositive Arten zugeschrieben (STACKEBRANDT et RAINEY, 1997).

Tabelle 1: Systematik der Gattung Clostridium

Domäne	Bacteria
Abteilung	Phylum „Firmicutes“
Klasse	Clostridia
Ordnung	Clostridiales
Familie	Clostridiaceae
Gattung	Clostridium
Art	z. B. <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. difficile</i>

JOHNSON und FRANCIS führten bereits 1975 phylogenetische Analysen mittels der 16SrRNS- bzw. 23SrRNS-Moleküle durch und unterteilten die ersten 56 Clostridienarten in vier Hauptgruppen:

- Gruppe I und II bestehen aus eindeutig definierten Arten mit einem geringen GC-Gehalt (24-32 %; Guanin-Cytosin-Anteil an der Gesamtheit der Basen), wobei der

- Gruppe I 30 Arten angehören, die zu über 50 % Übereinstimmung mit den untersuchten Referenzstämmen *Clostridium butyricum*, *C. perfringens* (Typ A), *C. carnis*, *C. sporogenes*, *C. novyi* (Typ A) und *C. pasteurianum* aufweisen. Entsprechende Untergruppen verweisen auf die Homologie zu den einzelnen Referenzstämmen.
- Gruppe II werden 11 Arten zugeordnet, deren 23SrRNS zwischen 69 und 89 % mit der von *C. lituseburense* übereinstimmt.
- Gruppe III (sechs Arten) weist ebenfalls einen geringen GC-Gehalt auf, ist aber nicht gesichert mit den anderen beiden Gruppen verwandt.
- Gruppe IV (fünf Arten) weist einen hohen GC-Gehalt (41-45 %) auf (JOHNSON & FRANCIS, 1975).

Auch WOESE & FOX schlugen ab 1977 die Einteilung nach phylogenetischer Analytik vor. Bereits 1994 ist bei 100 der 120 Arten die 16SrRNA Sequenz bestimmt worden (COLLINS et al., 1994). Daraus ergeben sich insgesamt 19 Cluster, wobei Cluster I die größte und engste Verwandtschaftsgruppe der Clostridien zusammenfasst. Cluster I beinhaltet vorrangig die Organismen der ehemaligen Gruppe I nach JOHNSON und FRANCIS (1975), schließt nun aber auch *Clostridium tetani* aus der ehemaligen Gruppe II ein (LYRAS & ROD, 2006).

2.1.2 Merkmale, Sporulation und Resistenz

Clostridien treten ubiquitär auf und zählen häufig zum Mikrobiom im Intestinaltrakt der Säugetiere (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009). Clostridien sind grampositive Stäbchenbakterien, die im anaeroben Milieu wachsen und inaktive Dauerformen bilden können (RODLOFF, 2012). Als Prokaryoten besitzen sie keinen echten Zellkern (SCHÖN, 1999). Die Zellwand besteht aus bis zu 40 Schichten Murein (Peptidoglycan), welches aus sich abwechselnden Polysaccharid-Strängen (N-Acetyl-Glucosamin, N-Acetyl-Muraminsäure) zusammengesetzt ist, die sich über kurze Peptidketten miteinander verbinden (CYPIONKA, 2006). Sie sind Katalase negativ und ihre Kohlenhydratverwertung erfolgt fermentativ, wobei sie saccharolytisch und proteolytisch oder nur saccharolytisch oder nur proteolytisch agieren können (RODLOFF, 2012).

Einige Arten gelten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Toxinbildung als pathogen und bedingen schwere Krankheitsbilder wie Botulismus (*C. botulinum*), Tetanus (*C. tetani*) und Gasbrand (*C. perfringens*, *C. novyii*, *C. septikum*, *C. histolyticum*), aber auch Wundinfektionen (*C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. fallax*, *C. ramosum*) oder intestinale Infektionen (*C. perfringens*, *C. difficile*). (RODLOFF, 2012; SCHAUMANN & RODLOFF, 2009)

Die Bezeichnung Clostridium erhielten die Organismen, weil sich die vegetativen Zellen durch die zentrale Lage der ovalen Endospore bei der Sporulation spindelförmig ausdehnen (griechisch: „closter“ = Spindel) (SELBITZ, 2010). Die Endosporen enthalten eine Kopie des Genoms umgeben von Cytoplasmamembran und Zellwand, welcher weitere Schichten (Cortex, Sporenhülle und Exosporangium) aus Peptidoglycan und Protein aufgelagert sind (SCHNEIDER, 2007). Die Sporulation wird unter anderem durch Nahrungsmangel bzw. Übervölkerung induziert, wobei die Sporen danach zum Teil über Jahrzehnte oder Jahrhunderte überdauern können und gegen eine Vielzahl von möglichen Einwirkungen (Hitze, Trockenheit, Strahlung oder Chemikalien) resistent sind (SONENSHEIN, 2000; SETLOW 2006; SCHNEIDER 2007).

Die starke Resistenz gegenüber schädigenden Umwelteinwirkungen ergibt sich aus dem hohen Gehalt an Dipicolinsäure (Pyridin-2,6-Dicarbonsäure) (bis zu 10 % des Trockengewichts (WANG ET AL., 2012)) und Typ bzw. Mengen der assoziierten bivalenten Kationen (meist Ca^{2+} -Ionen), einem sehr niedrigen Wassergehalt (10 – 30 % des Wassergehalts vegetativer Zellen), Schutz der DNA durch Sättigung mit einer Gruppe α/β -Typ-säurelöslicher Proteine (GERHARDT & MARQUIS, 1989; SETLOW, 2006), dem Gehalt an Mangan und durch die Maturation der freigesetzten Sporen. (GHOSH ET AL., 2011; SANCHES-SALAS ET AL., 2011)

Finden die Sporen wieder optimale Umweltbedingungen für ein Wachstum vor, können sie durch Auskeimung in ein aktives Stadium übergehen (SETLOW, 2003; SETLOW ET AL., 2007; PAREDES-SABJA ET AL., 2010). Initiatoren der Auskeimung, wie Nährstoffe und bestimmte monovalente Kationen, werden durch Rezeptoren in der inneren Membran der Sporen erkannt (WANG ET AL., 2011). Daraufhin kommt es zu einer Auskeimung, erkennbar am Austausch des Depots an Dipicolinsäure mit Wasser. Dadurch wird die Hydrolyse des Cortex angeregt (WANG ET AL., 2011]. Durch den Abbau des Cortex und die folgende Ausdehnung der Zellwand kommt es zum Wiedereinsetzen des Metabolismus, zur Zersetzung α/β -Typ-säurelöslicher Proteine an der DNA und schließlich zur Aktivierung der Genexpression. Die Zelle löst sich von der Sporenhülle und beginnt sich zu teilen. (SCHNEIDER, 2007)

Die Einleitung der Auskeimung der Sporen ist sehr heterogen und ereignet sich zu unterschiedlichen Zeiten (BARKER ET AL., 2005; STRINGER ET AL., 2005; CHEN ET AL., 2006; WEBB ET AL., 2007; ZHANG ET AL., 2010; WANG ET AL., 2011). Während der Großteil der Endosporen innerhalb einer Zeitspanne von ein bis zwei Stunden auskeimt, verbleibt ein relativ geringer Teil erst noch mehrere Stunden oder Tage im Sporenstadium (GHOSH & SETLOW, 2009).

2.1.2.1 *Clostridium perfringens*

Das kastenförmige (Durchmesser: 0,9 – 1,3 µm, Länge: 3 – 9 µm (KRÄMER & PRANGE, 2017)), proteolytische Bakterium ist im Gegensatz zu anderen Bakterien der Gattung *Clostridium* nicht peritrich-begeißelt und somit unbeweglich. In Kultur vermehrt sich *C. perfringens* (lateinisch: perfringere = durchbrechen; (RODLOFF, 2012)) zwischen pH 5,5 und pH 8 (Minimum pH = 5,0) (KAYSER & BÖTTGER, 2010), bei Temperaturen von 20 °C bis 50 °C (Optimum 43 – 45 °C) mit einer Generationszeit von unter 10 Minuten (LABBÉ, 2000; KRÄMER & PRANGE, 2017). Binnen acht- bis zehnstündiger Kultur bilden sich konvex gewölbte Kolonien, die glatt und von einer Hämolysezone umgeben sind (KAYSER & BÖTTGER, 2010).

C. perfringens bildet diverse Toxine, die jedoch nicht von allen Stämmen gleichermaßen produziert werden. Pathogenetisch von Bedeutung sind beim Menschen Typ A und Typ C (KRÄMER & PRANGE, 2017). In der Veterinärmedizin ist als Ursache von Gasgangrän Typ A und für Darmerkrankungen die Typen B bis E von Bedeutung (RODLOFF, 2012; BRYNESTAD & GRANUM, 2002; SCHAUMANN & RODLOFF, 2009). Stämme vom Typ A sind die Haupterreger der Clostridienmyositis (Gasbrand), wonach ca. 80 % der Infektionen durch *C. perfringens* und 20 % durch *C. novyi* und *C. septicum* hervorgerufen werden (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009). Hierbei handelt es sich um eine Wundinfektion von Haut und Weichteilen mit nekrotischem Zerfall des Gewebes, die unbehandelt durch einen Toxin induzierten Schock innerhalb von Stunden zum Tod führen kann (RODLOFF, 2012). Chirurgische Wundrevision mit Entfernung der Nekrosen und hoch dosierte Gaben von Penicillin G sind alleinige Maßnahmen für den Behandlungserfolg (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009; RODLOFF, 2012). *C. perfringens* Typ A bedingt zudem Lebensmittelvergiftungen. Im Darm gesunder Menschen findet man eine Konzentration von 10^2 – 10^4 KBE/g Stuhl vor, bei Lebensmittelvergiftungen hingegen eine Konzentration von 10^6 KBE/g Stuhl (KRÄMER & PRANGE, 2017). Die Peritonitis (Bauchfellentzündung) kann ebenfalls durch *C. perfringens* verursacht werden (RODLOFF, 2012).

Die Hitzeresistenz der vegetativen Zellen von *Clostridium perfringens* schwindet bei 75 °C nach 20 Minuten (GIBBS & HIRSCH, 1956). Die Hitzeresistenz der Sporen gestaltet sich hingegen sehr variabel (GHOSH & SETLOW, 2009; SARKER ET AL., 2000). In mehreren Studien (DUNCAN & STRONG, 1968; ANDO ET AL., 1985) wurde daher zwischen hitzeresistenten und hitzesensitiven Stämmen unterschieden. Laut ANDO (1985) liegt der D-Wert (= dezimale Reduktionszeit, die die Zeit beschreibt, die benötigt wird, um eine Population von Mikroorganismen zu 90 % abzutöten (ANONYMOUS, 2011)) der Sporen bei 95 °C bei 17,6 bis 63 Minuten (hitzeresistente Stämme) beziehungsweise bei 1,3 bis 2,8 Minuten (hitzesensitive Stämme). Nach RAJU und SARKER (2005) sowie ORSBURN et al.

(2008) genügen 100 °C im Allgemeinen um *C. perfringens* abzutöten. Gegenüber Temperaturen unter 0 °C ist das Bakterium sehr empfindlich (KRÄMER ET PRANGE, 2017).

2.1.2.2 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum kommt natürlicher Weise im Erdboden oder in Sedimenten von Seen und Flüssen vor (KRÄMER & PRANGE, 2017). Es handelt sich um ein gerades bis leicht gebogenes bewegliches Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,0 µm und einer Länge von 2 bis 10 µm (KRÄMER & PRANGE, 2017). In tierischen (lateinisch botulus = Wurst) und pflanzlichen Lebens- und Futtermitteln können die Bakterien Exotoxine produzieren, die den klassischen Botulismus verursachen (KRÄMER & PRANGE, 2017).

Hingegen kommt es beim Wundbotulismus und beim Säuglingsbotulismus zu einer Infektion der Wunde bzw. zu einer Besiedlung des Magen-Darmtraktes mit *Clostridium botulinum* und infolge der Toxinproduktion innerhalb des Körpers zu einer Vergiftung (CAYA et al., 2004). Auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren, insbesondere bei Wiederkäuern (viszeraler Botulismus bei Rindern (BÖHNEL et al., 2001)) und Pferden (GALEY, 2001), ist Botulismus bekannt. Das von *Clostridium botulinum* produzierte Toxin gilt als stärkstes überhaupt bekanntes biologisches Gift (CAYA et al., 2004). Als Neurotoxin unterbricht es die Impulsleitung zwischen motorischen Nervenzellen, bzw. zwischen Nervenzellen und Muskeln, indem es die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin im peripheren Nervensystem verhindert. Dieses führt zur Lähmung der betroffenen quergestreiften Muskulatur (KRÄMER & PRANGE, 2017). In allen Fällen sind die klinischen Zeichen des Botulismus Folge einer Vergiftung und nicht ansteckend (CAYA et al., 2004). Der Name *Clostridium botulinum* fasst eine heterogene Gruppe von Bakterien zusammen, die alle zur Neurotoxinbildung (Botulinum) befähigt sind (COLLINS & EAST, 1998). Unterschieden werden sieben Varianten des Neurotoxins, die mit den Buchstaben A bis G bezeichnet werden. In der Historie zeigte sich, dass Botulismus beim Menschen durch Toxine der Typen A, B, E und seltener durch F verursacht wurde (CDC, 1998; POULAIN & POPOFF, 2019). Bei Tieren waren die Toxine der Typen C, D und E am Botulismus beteiligt (CDC, 1998; POULAIN & POPOFF, 2019).

Derzeit ist noch unklar, ob das Toxin vom Typ G tatsächlich Botulismus auslöst (COLLINS & EAST, 1998). Das Gen, das für die Typ G-Neurotoxinbildung verantwortlich ist, ist auf einem Plasmid vorhanden und die Gene zur Neurotoxinproduktion der Typen A, B und F sind chromosomal verschlüsselt (CAYA et al., 2004). Die Produktion der Neurotoxintypen C, D und E ist verschlüsselt in Genen, die von Phagen getragen werden (CAYA et al., 2004; FRANCIOSA et al., 2003).

Die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der Mikroorganismen, die unter dem Namen *Clostridium botulinum* zusammengefasst werden, lassen sich in vier Gruppen aufteilen (Tabelle 2):

- Die 1. Gruppe beinhaltet alle Stämme, die Neurotoxin des Typs A bilden, und die proteolytischen Stämme, die die Toxine B oder F produzieren. Sie bauen während des Wachstums vorrangig Proteine ab und produzieren daher sensorisch wahrnehmbare Fäulnisprodukte wie H_2S und NH_3 . Die Endosporen sind äußerst hitzeresistent und werden erst bei 121 °C nach drei Minuten zerstört. Bei Temperaturen unter 10 °C und bei a_w -Werten unter 0,95 (=8 % NaCl bzw. 45 % Saccharose) wird ihr Wachstum blockiert. (KRÄMER & PRANGE, 2017)
- Die 2. Gruppe umfasst alle Stämme, die Toxin des Typs E produzieren, und die nicht-proteolytischen Stämme, die die Toxine B oder F produzieren. Diese saccharolytischen Stämme verstoffwechseln vorrangig Kohlenhydrate. Dabei werden kaum wahrnehmbar Fäulnisgase produziert. Sie sind wesentlich empfindlicher gegenüber Hitze und können bereits nach fünf Minuten bei 90 °C abgetötet werden. Relativ hohe a_w -Werte (0,97) hemmen ihr Wachstum. Hingegen wachsen sie noch bei niedrigen Temperaturen bis zu + 3,3 °C und bilden weiterhin Toxine. (KRÄMER & PRANGE, 2017)
- Die Stämme der 3. Gruppe sind nicht proteolytisch und produzieren die Toxine C_1 , C_2 oder D. Sie führen nur bei Tieren Erkrankungen herbei. Die Herstellung der Toxine C_1 und D erfolgt mittels Bakteriophagen. Das Toxin C_2 wird nur bei der Sporulation produziert. (KRÄMER & PRANGE, 2017)
- Die Stämme, die Toxin vom Typ G produzieren sind der 4. Gruppe zugeordnet. Ihnen konnte bislang keine Beteiligung an tierischen und menschlichen Botulismusfällen nachgewiesen werden (KRÄMER & PRANGE, 2017).

Tabelle 2: Phänotypische Unterschiede von botulinumtoxinbildenden Organismen

Eigenschaft	Gruppe I	II	III	IV
Toxin-Typen	A, B, F	B, E, F	C ₁ , C ₂ , D	G
Proteolyse*	+	-	-	+
optimale Wachstumstemperatur	35 - 40 °C	18 - 25 °C	40 °C	37 °C
minimale Wachstumstemperatur	10 °C	3,3 °C	15 °C	k.A.
Hitzeresistenz der Sporen	112 °C	80 °C	104 °C	k.A.

(*+, alle Stämme sind positiv; -, alle Stämme sind negativ; modifiziert nach COLLINS & EAST, 1998)

Die aufgrund phänotypischer Differenzierungen erstellte Gruppierung spiegelt auch die tatsächliche Verwandtschaft, basierend auf den 16S rRNA Genen, wider (Collins & East, 1998). Daraus zeigt sich, dass es sich bei *Clostridium botulinum* tatsächlich nicht um eine sondern um mehrere Arten handelt (FAL, 2007).

2.1.2.3 *Clostridium sporogenes*

Bei *Clostridium sporogenes* handelt es sich um ein proteolytisches Stäbchenbakterium (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009), was erstmals 1908 von Metchnikoff und dann 1923 von Bergey et al. beschrieben wurde (JCICSB, 1999). *C. sporogenes* kommt sehr häufig in der Umwelt vor, sowie in Milch, Milch-Produkten und Dosenahrung (NAKAMURA, 1977; DROUIN & LAFRENIÈRE, 2012). Mittels peritricher Begeißelung kann es sich fortbewegen (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009). Es ist mit *Clostridium botulinum* auf der Art-Ebene verwandt, produziert aber kein Botulinumtoxin (JCICSB, 1999). Die genetische Analyse von *C. sporogenes* zeigt, dass die meisten Stämme, obwohl sie sehr nah mit Gruppe 1 der *C. botulinum*-Stämme (durchschnittliche Nucleotid-Übereinstimmung = 93%) verwandt sind, spezifische Klade-genetische Signaturen beinhalten und eine deutlich andere bakterielle Species als *C. botulinum* bilden (POULAIN & POPOFF, 2019). Jedoch haben einige *C. sporogenes*-Stämme diese Signaturen verloren und werden phylogenetisch der Gruppe 1 der *C. botulinum*-Stämme zugeordnet (HILL, 2007; WEIGAND, 2015). *C. sporogenes* wird oftmals als Surrogat für *C. botulinum* in Untersuchungen, wie zum Beispiel für kommerzielle Nahrungsmittelherstellungsprozesse, genutzt (BUTLER et al., 2017; TAYLOR et al., 2013). *C. sporogenes* ruft beim Menschen Wundinfektionen hervor (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009). Vegetative Zellen besitzen nach BYUN et al. (2011) nur

eine geringe Hitzeresistenz ab 90 °C (D-Wert: 0,21 Minuten (+/- 0,01 min)), die Sporen werden jedoch aktiviert (BYUN et al., 2011).

2.2 Organischer Abfall

2.2.1 Bioabfall

Die Europäische Richtlinie 2008/98/EG novellierte das europäische Abfallrecht hinsichtlich der Einführung einer fünfstufigen Abfallhierarchie und der Abgrenzung zwischen Verwertung und Beseitigung von Abfall. Ebenso setzte sie neue Impulse für den Umgang mit nativ-organischem Abfall. Demzufolge musste für diesen Abfallstrom ab 01. Januar 2015 eine flächendeckende Getrenntsammlung eingeführt werden (RL 2008/98/EG).

In Deutschland werden die Forderungen der Europäischen Abfallrahmenrichtlinie mittels Kreislaufwirtschaftsgesetz umgesetzt; wobei die bewährten Inhalte des vorhergehenden Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetzes erhalten bleiben. Das Kreislaufwirtschaftsgesetz zielt auf einen verbesserten, nachhaltigen Umwelt- und Klimaschutz ab und fördert die Schonung natürlicher Ressourcen (KRWG, 2017).

Die Bioabfallverordnung regelt im Speziellen die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (BIOABFV, 2017).

Gemäß § 2 Nummer 1 der Bioabfallverordnung (2017) handelt es sich um Bioabfall, wenn die „Abfälle tierischer oder pflanzlicher Herkunft [sind] oder aus Pilzmaterialien [...] [bestehen], die durch Mikroorganismen, bodenbürtige Lebewesen oder Enzyme abgebaut werden können [...]“ (BIOABFV, 2017). Dazu zählen zum Beispiel biologisch abbaubare Küchen- und Kantinenabfälle (Biotonne), Marktabfälle, für Verzehr oder zur Verarbeitung ungeeignete organische Stoffe und tierische Ausscheidungen (BIOABFV, 2017). Bei der Verwertung von Bioabfällen spielt die Hygienisierung der aufzubringenden Abfälle eine wesentliche Rolle. Um deren seuchen- und phytohygienische Unbedenklichkeit sicherzustellen, werden in der Bioabfallverordnung Vorgaben zu hygienisierenden Behandlungen und Anforderungen an die Prozessprüfungen abgebildet. Die Bioabfallverordnung regelt die Bedingungen für die Ausbringung von Gärresten auf Feldern und Grünland in Bezug auf Schadstoffgehalte und Hygienisierungsanforderungen. Gemäß Anhang 2 der Verordnung können organische Abfälle durch Kompostierung (55 °C für zwei Wochen, 60 °C für sechs Tage oder 65 °C für drei Tage), durch Pasteurisierung (mindestens 70 °C für eine Stunde) oder durch Fermentation (50 °C für eine bestimmte Mindestzeit) desinfiziert werden. Der Erfolg der

Hygienisierung wird einmalig nach dem Bau von Abfallvergärungsanlagen (Untersuchung mit dem Indikatororganismus *Salmonella senftenberg* W775 (H₂S-negativ)) und kontinuierlich während des Betriebs durch Temperaturkontrolle überprüft. Außerdem dürfen im Gärrest (50 g einer gut gemischten 3 kg-Probe) keine Salmonellen nachweisbar sein. In Übereinstimmung mit den Vorschriften und der epidemisch-hygienischen Unbedenklichkeit können Gärreste aus Abfallvergärungsanlagen auf Grünland ausgebracht werden. (BIOABFV, 2017)

2.2.2 Tierische Nebenprodukte

Die Verordnung 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates legt Hygienevorschriften für tierische Nebenprodukte und Folgeprodukte fest, die nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt sind (V 1069/2009/EG).

Tierische Nebenprodukte sind gemäß der Verordnung über tierische Nebenprodukte 1069/2009 „ganze Tierkörper oder Teile von Tieren oder Erzeugnisse tierischen Ursprungs beziehungsweise andere von Tieren gewonnene Erzeugnisse, die nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, einschließlich Eizellen, Embryonen und Samen“ (V 1069/2009/EG). Es gibt drei verschiedene Kategorien von tierischen Nebenprodukten, die das Risiko einer Infektion oder Kontamination des Materials angeben (von „Kategorie 1“ -> hohes Risiko, „Kategorie 2“ -> kein aktuelles Risiko bis „Kategorie 3“ -> kein Risiko). Gemäß Artikel 13 dürfen Materialien der Kategorie 2 „für die Herstellung von organischen Düngemitteln oder Bodenverbesserungsmitteln [...] [verwendet werden], die [...] durch Drucksterilisation [(20 Minuten lang bei 133 °C unter einem Druck von mindestens 3 bar)] und nach dauerhafter Kennzeichnung des entstandenen Materials in Verkehr gebracht werden sollen“ (V 1069/2009/EG). Ebenso können Materialien der Kategorie 2 kompostiert oder in Biogas umgewandelt werden, nachdem eine Drucksterilisation und dauerhafte Kennzeichnung des entstandenen Materials erfolgte. Oder sie können mit oder ohne vorherige Verarbeitung kompostiert oder in Biogas umgewandelt werden, „wenn es sich um Gülle, Magen und Darm und dessen Inhalt, Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis, Kolostrum, Eier und Eiprodukte handelt, bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie eine Gefahr der Verbreitung einer schweren übertragbaren Krankheit bergen“ (V 1069/2009/EG). Zudem dürfen „Gülle, von Magen und Darm getrennten Magen- und Darminhalt, Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis und Kolostrum, bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie eine Gefahr der Verbreitung einer schweren übertragbaren Krankheit bergen“, ohne Verarbeitung auf Flächen ausgebracht werden (V 1069/2009/EG).

Laut Artikel 14 kann Material der Kategorie 3 zur Herstellung organischer Düngemittel oder Bodenverbesserungsmittel verarbeitet und verwendet werden, „außer wenn es sich um Material der Kategorie 3 handelt, das sich durch Zersetzung, oder Verderb so verändert hat, dass es durch dieses Produkt eine unannehmbare Gefahr für die Gesundheit von Mensch oder Tier darstellt“ (V 1069/2009/EG). Ebenso kann Material der Kategorie 3 kompostiert oder in Biogas umgewandelt werden. Sofern es sich nicht um Küchen- und Speiseabfälle von international eingesetzten Verkehrsmitteln handelt, können diese durch Drucksterilisation oder mittels anderer Verarbeitungsmethoden für tierische Nebenprodukte als Drucksterilisation (einstündige Desinfektion bei 70 °C) verarbeitet oder in Biogas umgewandelt werden (V 1069/2009/EG). Material der Kategorie 3 kann auch ohne vorhergehende Verarbeitung auf Flächen ausgebracht werden, „sofern es sich um Rohmilch, Kolostrum und Produkte auf Milchbasis und auf Basis von Kolostrum handelt, bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie eine Gefahr für die Verbreitung einer übertragbaren Krankheit für Menschen oder Tiere bergen“ (V 1069/2009/EG).

Für die Verwertung von Gräsern als Tierfutter aus mit solchen organischen Düngemitteln behandelten Flächen muss eine Wartezeit von mindestens 21 Tagen garantiert werden (V 1069/2009/EG).

Seit Februar 2011 gilt zusätzlich die Verordnung (EU) Nr. 142/2011 der Kommission zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009. Danach wird in Anhang II Kapitel II noch einmal aufgeführt, dass Wartezeiten von mindestens 21 Tagen nach der Düngung mit organischen Düngemitteln eingehalten werden müssen und dass die Anforderungen für die Verwendung von organischen Düngemitteln und anderen Bodenverbesserungsmitteln entsprechend der Verordnung 1069/2009/EG eingehalten werden müssen (V 142/2011/EG). Diese Anforderungen gelten jedoch nicht, wenn nur Gülle und Guano oder Magen- und Darminhalt, Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis, aus Milch gewonnene Erzeugnisse, Kolostrum und Kolostrumerzeugnisse auf die Flächen ausgebracht wurden, „bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie ein Risiko für die Verbreitung schwerer Tierseuchen bergen“ (V 142/2011/EG).

In Deutschland dient das Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG) der Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009. Hierin werden unter anderem Zuständigkeiten, Verbote im Umgang mit tierischen Nebenprodukten und Folgeprodukten der Kategorie 1 und 2, Beseitigungspflichten, Ausnahmen, Meldepflichten, Abhol-, Ablieferungs- und Aufbewahrungspflichten, Vorgaben für die Überwachung und Bußgeldvorschriften festgelegt (TIERNEBG 2016).

Die Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes (Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung) gibt im Speziellen Anforderungen für Küchen- und Speiseabfälle und an Betriebe mit Nutztierhaltung vor (TIERNEBV 2018).

Sie regelt Transport- und Nachweisverpflichtungen und stellt Anforderungen an die Verarbeitung, Behandlung (Pasteurisierung, Vergärung und Kompostierung) und Entsorgung tierischer Nebenprodukte (Milch der Kategorie 2, Gülle, Guano, Küchen- und Speiseabfälle der Kategorie 3). Die Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung verweist hierbei auch auf die Anforderungen des Kreislaufwirtschaftsgesetzes und der Bioabfallverordnung. Die räumliche Trennung von Behandlungsanlagen zu Nutztierbereichen (Tieren, Tierfutter und Einstreu) ist wie auch in der Bioabfallverordnung zum Schutz vor der Übertragung von Seuchenerregern vorgeschrieben. Ebenso sind hierin die Bedingungen für eine Hygienisierung mit einer Temperatur von 70 °C über 60 Minuten im Zuge der Pasteurisierung vorgeschrieben. (TIERNEBV 2018)

2.3 Biogasanlagen

2.3.1 Aufbau

Eine landwirtschaftliche Biogasanlage besteht aus Substratlagerung und –aufbereitung, Vorgrube mit Substrateinbringung, Fermenter mit Rührwerk, Gasspeicher, Gärrückstandslager und Biogasverwertung (Blockheizkraftwerk oder Gasaufbereitungsanlage) (FNR, 2016):

Der eigentlichen Biogasproduktion ist das Substratmanagement vorangestellt. Dazu gehören insbesondere Substratanlieferung, -lagerung, -aufbereitung, -transport und -einbringung. Substratlager, wie Güllebehälter oder Fahrsilos, ermöglichen eine zeitnahe Beschickung benötigter Mengen. Die Substrataufbereitung ist auf die jeweiligen Ausgangsstoffe sowie die verwendete Anlagentechnik ausgerichtet. Zudem soll durch die adäquate Substrataufbereitung die Gasausbeute erhöht und damit die Effizienz verbessert werden. Die Substrataufbereitung kann Sortierung und Störstoffabtrennung, Zerkleinerung, Anmaischen und Homogenisieren, Hydrolyse oder Desintegration einschließen. Werden seuchenhygienisch bedenkliche Substrate (Bioabfall oder tierische Nebenprodukte) mitvergoren, erfolgt zwingend eine Hygienisierung. (FNR, 2016)

Aus der Vorgrube gelangen die Substrate in den wärmeisolierten und beheizten Fermenter. Er ist das Kernstück der Anlage und muss gas- und wasserdicht sowie lichtundurchlässig ausgeführt sein. Entsprechende Rührtechnik gewährleistet die Homogenität des Gärsubstrates und unterstützt die Gasbildung. Die verschiedenen

Fermenterbauarten sind an das Vergärungsverfahren angepasst. Sie können stehend oder liegend, rund oder eckig, aus Beton oder Stahl sein. Die Vergärungsverfahren können anhand des Trockensubstanzgehaltes des eingesetzten Substrates in Nassvergärung und Feststoffvergärung unterschieden werden. Eine eindeutige Abgrenzung existiert nicht zwischen den beiden Verfahren, aber es gibt eine Faustregel, nach der 15 m% für die Pumpfähigkeit des Mediums herangezogen werden sollten. Substrate mit feindisperser Partikelverteilung und hohen Gehalten angelösten Stoffen sind auch bei Trockensubstanzgehalten von bis zu 20 m% pumpfähig (z.B. dispergierte Speisereste aus einem Tankfahrzeug). Hingegen liegen andere Substrate, wie Obst- und Gemüseschalen bereits bei 10 bis 12 m% in stapelbarer Form vor. Weiterhin werden die Vergärungsverfahren nach der Art der Beschickung in diskontinuierlich, quasikontinuierlich und kontinuierlich, sowie nach der Anzahl der Prozessphasen (einphasig, zweiphasig) unterschieden. Die Anzahl der Fermenter und Nachgärbehälter richtet sich nach der Größe und dem Konzept der jeweiligen Anlage. (FNR, 2016)

Schließlich sind noch psychrophile, mesophile und thermophile Vergärungsverfahren zu unterscheiden. Psychrophile Vergärungsverfahren laufen unterhalb von 25 °C ab. Hierdurch entfällt das Aufheizen der Substrate bzw. des Fermenters, aber die Abbauleistung und Gasproduktion sind nur gering und ein wirtschaftlicher Betrieb von Biogasanlagen (sehr lange Verweilzeiten) nicht möglich (WEILAND, 2001; HELM, 2014; FNR, 2016).

Die meisten der bekannten Methanbildner haben ihr Wachstumsoptimum zwischen 37 °C und 42 °C und liegen damit im mesophilen Temperaturbereich. Der größte Anteil der Biogasanlagen arbeitet im mesophilen Temperaturbereich, da hiermit akzeptable Verweilzeiten (etwa 40 Tage) und relativ hohe Gasausbeuten und zudem eine gute Prozessstabilität durch die sehr artenreiche Biozönose erreicht wird (HELM, 2014; FNR, 2016).

Sofern durch Hygienisierung des Substrates gesundheitsschädliche Keime abgetötet oder als Substrate Nebenprodukte oder Abfallstoffe verwendet werden, die mit hoher Eigentemperatur anfallen (z. B. Prozesswasser), können thermophil lebende Kulturen (Optimum zwischen 50 und 60 °C) für die Vergärung eingesetzt werden. Bei Prozesstemperaturen zwischen 45 und 55 °C ergibt sich eine höhere Abbaugeschwindigkeit. Zudem wird eine geringere Viskosität erreicht. Ein Mehrbedarf an Energie für das Aufheizen des Gärprozesses ist unablässig. Der Gärprozess ist in diesem Temperaturbereich zudem empfindlicher gegenüber Störungen, Unregelmäßigkeiten in der Substratzufuhr oder der Betriebsweise des Fermenters, da unter thermophilen

Bedingungen weniger verschiedene Arten von methanogenen Mikroorganismen existieren (FNR, 2016; WEILAND, 2001; HELM, 2014).

Das Biogas gelangt in den Gasspeicher, während das ausgegorene Substrat in das Gärrestlager transportiert wird, das i. d. R. auch als Nachgärbehälter dient. Bevor das Biogas im Blockheizkraftwerk genutzt werden kann, müssen Partikel und Kondensat eliminiert werden. Die Entschwefelung ist dabei zum Schutz von Motoren und Anlagenteilen gegen Korrosion unentbehrlich. Diese erfolgt in landwirtschaftlichen Biogasanlagen mit Vorortverstromung meist biologisch durch eine Zudosierung von Luft. *Sulfobacter oxydans* (omnipräsent) wandelt hierbei den Schwefelwasserstoff in Gegenwart von Sauerstoff in elementaren Schwefel um, der über den Gärrest aus der Anlage hinausbefördert wird. Besitzt das BHKW einen Abgaskatalysator, muss zusätzlich eine Feinentschwefelung mit Aktivkohlefilter eingerichtet sein, um den Katalysator zu schützen. Außerdem muss das Rohbiogas getrocknet bzw. aktiv entfeuchtet werden. Dadurch werden auch die in der Feuchtigkeit enthaltenen Salze und Mineralstoffe entzogen, die die Gasverwertungseinheit ebenfalls schädigen können. (FNR, 2016)

Der flüssige oder feste Rückstand der Vergärung, der ins Gärrestlager gepumpt wird, wird als Gärrest oder Biogasgülle bezeichnet und von den Landwirten wegen seiner hohen Nährstoffgehalte meist als organischer Dünger bzw. Wirtschaftsdünger verwendet. Die Lagerung muss in geeigneten, wasser- und gasdichten Behältern erfolgen. Hiermit werden Restgaspotenziale genutzt und gleichzeitig Emissionen und Gerüche reduziert. (FNR, 2016)

2.3.2 Prozess

Der Vergärungsprozess im Fermenter läuft prinzipiell in vier voneinander abhängigen Teilschritten, der Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und der Methanogenese, (Biogasprozess nach GUJER & ZEHNDER, 1983) unter anaeroben Bedingungen ab, an denen jeweils verschiedene Gruppen von Mikroorganismen beteiligt sind (HELM, 2014):

Partikuläres organisches Substrat, welches aus Fett, Eiweiß und Kohlenhydraten besteht, wird zu Beginn hydrolytisch in Fettsäuren, Aminosäuren und Zucker umgewandelt. Diese Zwischenprodukte werden weiter in organische Säuren (Propion- und Buttersäure), Alkohole, Wasserstoff, Kohlendioxid und Wasser aufgespalten. Durch weitere biochemische Umwandlungen entstehen daraus Essigsäure und Wasserstoff, wobei im Anschluss aus der Essigsäure durch methanbildende Organismen, wie Methanococcus, bis zu 70 % des Methans gebildet werden. Die restlichen 30% werden aus Wasserstoff und Kohlendioxid synthetisiert. (HELM, 2014)

Grundsätzlich finden die vier Phasen zeitgleich und parallel statt (FNR, 2016). Jede der vier Prozessstufen wird von anderen Mikroorganismen, die unterschiedliche Milieuanforderungen stellen, vorangetrieben (Helm, 2014). Sie leben jedoch oft in Symbiose in unmittelbarer Nähe zueinander und verflocken miteinander (Helm, 2014). Eine möglichst hohe Methanproduktion aus dem eingesetzten Substrat resultiert aus einer optimalen Nährstoffversorgung der Mikroorganismen, wobei die maximal mögliche Methanausbeute abhängig von den Anteilen an Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten in den eingesetzten Substraten ist (Seyfried, 1990).

Aufgrund der unterschiedlichen Milieubedingungen der verschiedenen Mikroorganismen muss daher ein Kompromiss der optimalen Parameter, wie insbesondere Gärtemperatur, pH-Wert oder Nährstoffversorgung gefunden werden (FNR, 2016).

Das am Prozessende gebildete Biogasgemisch besteht überwiegend aus Methan (50-75 %), Kohlendioxid (25-45 %) und geringen Anteilen an Wasserdampf, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefelwasserstoff und weiteren Spurengasen (FNR, 2016).

2.3.3 Hygienisierung

Um die gesetzlich vorgeschriebenen Kriterien für den Einsatz der seuchen- und phytohygienisch kritischen Substrate in Biogasanlagen zu erfüllen, ist es notwendig, eine thermische Behandlung in die Anlage zu integrieren. Die Vermischung von hygienisch bedenklichem und unbedenklichem Material muss durch die Konstruktion ausgeschlossen sein. Oft anzutreffen sind Pasteurisierungseinheiten, seltener Einheiten für die Drucksterilisation. Die Durchsatzmenge bestimmt die Größe der zur Hygienisierung genutzten Behälter und den Energieaufwand. Bei der Dimensionierung müssen zu der reinen Hygienisierungszeit der Befüllvorgang, das Aufheizen und Entleeren einkalkuliert werden. Die Hygienisierungseinheit wird meistens vor der Einbringung hygienisch bedenklicher Kosubstrate in den Fermenter etabliert. Dadurch werden nur die bedenklichen Stoffe hygienisiert und die Hygienisierungsstufe wirtschaftlicher dimensioniert (Teilstromhygienisierung). Zudem erfolgt ein thermischer Aufschluss des Materials, welches abhängig von dessen Eigenschaften besser vergärbar wird. Die üblichen Hygienisierungsbehälter erfordern pumpfähiges Substrat. Daher muss es gegebenenfalls vor der Hygienisierung angepasst werden. Die Vollstromhygienisierung der gesamten Einsatzstoffe ist vor der Vergärung, zwischen zwei Vergärungsstufen bzw. nach der Vergärung auch möglich. Häufig werden luftdicht verschließbare und beheizbare Edelstahlbehältern, entweder einwandig mit innenliegender Heizung oder Doppelwandbehälter mit Wandheizung, aus der Fütterungstechnik verwendet. Füllstands-,

Temperatur- und Druckmessenrichtungen überwachen und dokumentieren den Hygienisierungsprozess. Die Wärme des hygienisierten Substrats kann zur Vorwärmung anderer Substrate oder durch direkte Zugabe (nur Teilstromhygienisierung) in den Fermenter zu dessen Beheizung dienen. (FNR, 2016)

2.3.4 Gärrückstandsverwertung

In Anlehnung an die TierNebV und die BioAbfV regelt die Düngemittelverordnung das Inverkehrbringen von Düngemitteln, wie Gärrückständen aus Biogasanlagen (DüMV, 2012). Hiernach sind Gärreste aus Biogasanlagen für die Düngung nur zugelassen, wenn sie „vorbehaltlich des § 5 Absatz 1 des Düngegesetzes nur in den Verkehr gebracht werden, wenn sie einem durch diese Verordnung zugelassenen Düngemitteltyp entsprechen“ und „sie auch hinsichtlich ihrer nicht typbestimmenden Bestandteile bei sachgerechter Anwendung die Fruchtbarkeit des Bodens, die Gesundheit von Menschen, Tieren und Nutzpflanzen nicht schädigen und den Naturhaushalt nicht gefährden“ (DüMV, 2012).

Zudem wird vorausgesetzt, „dass keine Krankheitserreger, Toxine oder Schaderreger enthalten sind, von denen Gefahren für die Gesundheit von Menschen, Tieren und Nutzpflanzen ausgehen“ (DüMV, 2012).

Diese Anforderungen werden nicht eingehalten:

„1. hinsichtlich seuchenhygienischer Eigenschaften, wenn in 50 Gramm Probenmaterial Salmonellen gefunden werden,

2. hinsichtlich phytohygienischer Eigenschaften, wenn Ausgangsstoffe pflanzlicher Herkunft, auch in Mischungen,

verwendet werden, die von widerstandsfähigen Schadorganismen, insbesondere

- a) von einem der in der Richtlinie 2000/29/EG genannten Schadorganismus,
- b) thermoresistenten Viren, insbesondere solche aus der Tobamovirus-Gruppe oder
- c) pilzlichen Erregern mit widerstandsfähigen Dauerorganen, insbesondere *Synchytrium endobioticum*, *Sclerotinia*-Arten, *Rhizoctonia solani*, *Plasmodiophora brassicae*,

befallen sind und nicht einer geeigneten hygienisierenden Behandlung unterzogen wurden“ (DüMV, 2012).

„Die seuchenhygienischen Anforderungen gelten bei der Abgabe an Personen, die Düngemittel, Bodenhilfsstoffe, Kultursubstrate und Pflanzenhilfsmittel im Rahmen ihrer beruflichen Tätigkeit anwenden, abweichend von [...] [oben genannten Anforderungen] als

eingehalten, wenn [...] im Rahmen der Hinweise zur sachgerechten Anwendung auf die bestehende Belastung hingewiesen wird und folgende als Anwendungsvorgaben gekennzeichnete Hinweise gegeben werden:

- a) auf Ackerland ist die Anwendung ausschließlich auf unbestelltem Ackerland und bei sofortiger Einarbeitung in den Boden zulässig, es sei denn, die Ausbringung erfolgt in Wintergetreide und Winterraps bis zum Schosserstadium (EC 30) mit bodennaher Ausbringungstechnik,
- b) die Ausbringung auf unbestellte Ackerflächen mit nachfolgendem Gemüse- oder Kartoffelanbau oder dem nachfolgenden Anbau von Heil-, Duft- und Gewürzkräutern ist nicht zulässig,
- c) **auf Grünland und Futterbauflächen ist ein zeitlicher Abstand von 6 Wochen bis zur nächsten Nutzung einzuhalten** und
- d) die Ausbringung in Zonen I und II von Wasserschutzgebieten ist nicht zulässig [...]“ (DÜMV, 2012).

Zudem werden die seuchenhygienischen Anforderungen „[...] eingehalten, wenn alle verwendeten tierischen Ausgangsprodukte eine geeignete Behandlung zur Hygienisierung entsprechend den Bestimmungen der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 [...] erfahren haben“ (DÜMV, 2012).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

Im Rahmen des Anlagenscreenings wurden

- Futtermittel wie Silagen (Mais, Gras, GPS), Getreidekorn, Zuckerrübe, Futterreste,
- Exkrememente wie Festmist (Rind, Pferd, Huhn), Gülle (Rind, Schwein),
- Lebensmittel- und Schlachtabfälle
- Flotate und Bioabfall
- Fermenterinhalt
- feste und flüssige Gärrückstände
- Permeate und Zentrat

verschiedener Anlagentypen mikrobiologisch analysiert.

Zur Probenahme wurden für jede Probe Einweg-Handschuhe sowie desinfizierte bzw. sterilisierte Schaufeln und Transportbehälter verwendet.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen kamen zur Anwendung:

- Medien:
 - Reinstwasser (institutseigene Demineralisationsanlage)
 - Nährbouillon I
 - Thioglycolat-Lösung USP, alternative (Oxoid Deutschland GmbH)
 - DRCM-Bouillon (Oxoid Deutschland GmbH)
 - Eisensulfit-Agar (Oxoid Deutschland GmbH)
 - mCP-Selektivnährboden (Oxoid Deutschland GmbH)
 - Anaerobier-Blutagar mit Neomycin (heipha Dr. Müller GmbH)
 - Polymyxin-Agar (VWR International GmbH)
 - Columbia-Agar mit Schafblut (Oxoid Deutschland GmbH)
 - AnaeroGen (Oxoid Deutschland GmbH)
 - Gentianaviolett (Merck KGaA)
 - Lugol-Jodlösung (Remel Products)
 - Safranin (Remel Products)
 - Ethanol (70%, vergällt mit Methyl-Ethyl-Keton)
 - Leitungswasser
 - Leberbouillon (Oxoid Deutschland GmbH)
 - Transwab®-Amiesmedium mit Kohle (Check Diagnostics)
- Geräte:
 - Brutschrank (Inucell ($\pm 0,1$ K))
 - Autoklav (VST Zirbus 40/60)
 - Sicherheitswerkbank (Kendro)
 - Anaerobiertöpfe (Oxoid Deutschland GmbH Deutschland GmbH)
 - Laborthermometer
 - Durchlichtmikroskop (Jenamed, Carl Zeiss Jena)
 - Bunsenbrenner
 - Stomacher
 - Stomacherbeutel
 - Zentrifuge
 - Waage
 - Pipetten
- Verbrauchsmaterialien:
 - Autoklavenbeutel
 - Stomacherbeutel
 - Einmal-Impfösen (1 μ l und 10 μ l)

- Einmal-Spatel
- Pipettenspitzen
- Glasobjekträger

Für die Hygienisierungsversuche wurden die Clostridienstämme *C. sporogenes* X904 T+ (Typ B) (RIPAC-LABOR GmbH) und *C. perfringens* DSM 756 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; andere Bezeichnung ATCC 13124, ATCC 19408, NCIB 6125, NCTC 6125, NCTC 8237, WDCM 00007 (DSMZ, 2013), verwendet.

Ein Wasserbad (Memmert, Fassungsvermögen von 14 Litern, gefüllt mit Reinwasser (institutseigene Demineralisationsanlage) und ein Ölbad (Memmert, Fassungsvermögen von 14 Litern, gefüllt mit Silikonöl (Roth)) wurden für die Versuchsreihen mit Bakterien-Sporen genutzt.

Des Weiteren wurden Rapsöl (Speiserapsöl, handelsüblich) und Paraffin (Merck KGaA) zusätzlich zu den vorhergehend aufgeführten Medien verwendet.

Folgende sonstigen Materialien wurden im Rahmen der Hygienisierungsversuche genutzt:

- Einmalreagenzgläser (Durchmesser: 1,6 cm; Höhe: 16 cm)
- Bechergläser (600 ml)
- Vollglasaquarium
- Petrischalen (Plastik, Durchmesser: 9 cm)
- Zellulosestopfen
- Aluminiumfolie
- Reagenzglasständer (Metall)

3.2 Methoden

3.2.1 Anlagenscreening

3.2.1.1 Untersuchungsgebiet

Das Untersuchungsgebiet für das Anlagenscreening umfasst die drei Bundesländer Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern.

3.2.1.2 Auswahl

Je Bundesland wurden 100 Vergärungsanlagen für eine Befragung ausgewählt. Aus Publikationen des Niedersächsischen Ministeriums für Umwelt und Klimaschutz (NIEDMINUK, 2009), des Landesamtes für Umwelt, Natur und Geologie Mecklenburg-

Vorpommerns (LUNG, 2011), des Schleswig-Holsteinischen Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung (LU-ATLAS SH, 2011), des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL, 2010) und mittels Internetrecherche (z.B. Referenzanlagen der MT-ENERGIE GMBH, 2011) wurden verschiedene Typen von Vergärungsanlagen zusammengestellt, darunter reine NawaRo-Biogasanlagen, Biogasanlagen mit Gülleeinsatz und Abfallvergärungsanlagen.

3.2.1.3 Befragung

Für die Erhebung wurde ein vierseitiger Fragebogen in Anlehnung an den DBFZ-Fragebogen (2009) erstellt (siehe Anhang 2 und 3).

Damit sollten anlagenspezifische Daten zu Aufbau, Technik, Inputsubstraten und Gärrestverwertung erhoben sowie die Bereitschaft zur Beprobung erfragt werden. In einem Anschreiben wurden die Anlagenbetreiber über den Befragungshintergrund und die anonymisierte Behandlung der zur Verfügung gestellten Daten informiert (siehe Anhang 1). Anschreiben und Fragebogen wurden mit einem frankierten Rückumschlag versandt.

3.2.1.4 Probenahme

Die Proben wurden von Silage- und Futtermittelagerplätzen, aus Lagertanks, Fermentern und Gärrestlagern entnommen. Aus den Tanks, Fermentern und Gärrestlagern konnten flüssige Proben mittels Abfüllhahn direkt in die Probenbehälter gefüllt werden und unmittelbar luftdicht verschlossen werden. Bei festen Substraten wurden mittels Schaufel aus verschiedenen Bereichen der Gesamtmasse einzelne Proben zu einer Mischprobe in die Probenbehälter gefüllt und unmittelbar verschlossen. Bei den Probenahmen wurden für jede Probe neue Einweg-Handschuhe, Schaufel und Transportbehälter verwendet, um Keimübertragungen zu vermeiden.

3.2.1.5 Nährmedienherstellung

Die Nährplatten Columbia-Agar mit Schafblut Plus, Anaerobier-Blutagar mit Neomycin und Schafblut Polymyxin-Agar wurden von den Herstellern verwendungsbereit bezogen und bis zur Anwendung entsprechend der Herstellervorgaben gelagert. DRCM-Nährmedium wurde entsprechend der Angaben des Herstellers angesetzt, in Reagenzgläser (10 ml) oder Bechergläser (600 ml) gefüllt, diese mit Zellulosestopfen bzw. Aluminiumfolie verschlossen, autoklaviert und bis zur Verwendung entsprechend gelagert. Leberbouillon wurde ebenfalls nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert und in 50ml-Röhrchen gefüllt und verschlossen bis zur Verwendung kühl gelagert.

3.2.1.6 Mikrobiologische Untersuchungen der Proben

Alle genommenen Proben (Nomenklatur für Probenbezeichnung in Anhang 4) wurden umgehend mikrobiologisch untersucht. Zu Beginn wurde jede Probe gut durchmischt und jeweils 25 g als Ausgangsmenge für die mikrobiologische Analytik eingewogen. Übriges Probenmaterial wurde als Rückstellprobe eingefroren. Die festen Proben wurden mit 50 ml Nährbouillon 1 in einem Stomacher für 20 Minuten homogenisiert, um ein Probeneluat zu erhalten. Jeweils 5 ml Probe wurden in 45 ml Thioglycolat-Lösung und DRCM-Bouillon zur Anzucht gefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen, in denen sich die Nährlösungen befanden, zur Herstellung einer anaeroben Atmosphäre mit Paraffin bedeckt. Aufgrund der Gasbildung wurden die Röhrchendeckel nicht fest verschraubt. Die beimpften Röhrchen wurden bei 37 °C im Brutschrank über fünf Tage inkubiert. Ergänzend wurde mit 1 ml der Ausgangsprobe und je 9 ml Natriumchlorid-Lösung eine geometrische Verdünnungsreihe mit 4 Verdünnungsstufen erstellt. Anschließend wurden mit 15 ml Eisensulfit-Agar gefüllte Röhrchen mit jeweils 100 µl der Ausgangsprobe bzw. der jeweiligen Verdünnung beimpft, mit Metallkappen verschlossen und ebenfalls bei 37 °C im Brutschrank über 5 Tage inkubiert.

Die erste Ablesung der Thioglycolat- und DRCM-Medien erfolgte nach 24 Stunden. Bei Trübung bzw. Schwarzfärbung der Medien wurden diese weiter untersucht. Dazu wurde aus den Röhrchen 100 µl Probenlösung auf mCP-Selektivnährboden-Platten abgeimpft. Diese Platten wurden bei 44 °C über zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert. Die zweite Ablesung der Thioglycolat- und DRCM-Medien erfolgte nach vier bis sechs Tagen zusammen mit den Eisensulfit-Agar-Röhrchen und den mCP-Selektivnährboden-Platten. Von allen Medien, die sich getrübt (Thioglycolat-Lösung) bzw. schwarz (DRCM-Bouillon und Eisensulfit-Agar) verfärbt haben, wurden 100 µl auf „Blutagar mit Neomycin“-Platten abgeimpft. Die Platten wurden in Anaerobiertöpfen bei 37 °C für zwei bis drei Tage bebrütet. Nach Ammoniumhydroxid-Bedampfung der mCP-Platten wurden die Kolonien, die sich rötlich verfärbten, auf Columbia-Agar mit Schafblut abgeimpft und ebenfalls bei 37 °C in Anaerobiertöpfen für zwei bis drei Tage im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurde eine Aerobkontrolle mitgeführt.

Nach Ablesung der „Blutagar mit Neomycin“-Platten nach circa drei Tagen wurden verdächtige Kolonien ebenfalls auf Columbia-Agar mit Schafblut abgeimpft und unter Mitführung einer Aerobkontrolle im Brutschrank bei 37 °C für zwei bis drei Tage in Anaerobiertöpfen inkubiert.

Sofern kein Wachstum auf den aerob mitgeführten „Columbia-Agar mit Schafblut“-Platten zu verzeichnen war, wurden von den Isolaten der verdächtigen Kolonien Grampräparate

erstellt und diese mikroskopisch (Durchlichtmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung) auf grampositive Färbung, Stäbchenform und Sporenbildung untersucht.

Zur Erstellung der Grampräparate wurde eine Probe der verdächtigen Kolonie mit einem kleinen Tropfen NaCl-Lösung vermischt auf einem Glasobjektträger aufgebracht und nach dem Trocknen auf diesem hitzefixiert. Bei der anschließenden Färbung nach Gram wurde der Objektträger für drei Minuten in Gentianaviolett getaucht, danach in Leitungswasser gespült und weitere drei Minuten in Lugol-Jodlösung gegeben. Danach wurde der Objektträger mehrmals in 70 %-igen Ethanol getaucht und nachfolgend mit Leitungswasser gespült. Zum Schluss wurde der Objektträger für drei Minuten in Safranin getaucht und abschließend mit Leitungswasser gespült und getrocknet.

Die verdächtigen Kolonien, die grampositive Stäbchen mit oder ohne Sporenbildung unter dem Durchlichtmikroskop zeigten, wurden anschließend in mit Leber-Bouillon gefüllte Röhrchen und auf je drei Transwab®-Amies-Transporttupfer gegeben. Die Leber-Bouillon-Röhrchen wurden bei 37 °C über drei Tage inkubiert und anschließend im Kühlschrank gelagert. Einer der Transport-Tupfer wurde danach zur Identifikation des isolierten Bakterienstamms mittels MALDI-TOF-MS an die RIPAC Labor GmbH versandt (siehe Gliederungspunkt 3.2.1.7 Externe Analyse). Die beiden anderen wurden als Rückstellproben im Kühlschrank gelagert.

3.2.1.7 Externe Analyse mittels MALDI-TOF-MS

Die Bakterienstämme wurden nach Isolierung auf Transwab®-Tupfer aufgebracht und diese an die RIPAC Labor GmbH verschickt. Die RIPAC Labor GmbH führte für alle verdächtigen isolierten Bakterienstämme eine MALDI-TOF-MS-Analyse (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry) und gegebenenfalls eine Sequenzierung durch. Alle Proben wurden dabei als Doppelproben analysiert. Die MALDI-TOF-MS lässt Analysen organischer Moleküle von Molekulargewichten zwischen 500 Da und 100kDa, also von Peptiden, Proteinen, Lipiden, Pigmenten und Toxinen zu (RIPAC, 2011). Aufgrund der MALDI-TOF-MS-Analyse erstellte die RIPAC Labor GmbH eine Clusteranalyse der identifizierten Clostridien für jede beprobte Vergärungsanlage. Die Cluster lassen sich so interpretieren, „[...] dass in der Regel alle Isolate bis zu 60 % identisch sind, die zu einer Spezies gehören. Die Trennung der Gattungen liegt in der Regel bei <50 %. Weiterhin zeigen die meisten Clostridienspezies keine Ähnlichkeiten innerhalb der Spektren zueinander, sodass die Trennung hier weit unter 50 % liegen kann. Eine Aussage zu Stammidentitäten oder zu evolutionären Verwandtschaften kann man nicht treffen“ (Kommentar von Marcel Erhard, RIPAC Labor GmbH, 12.08.2014).

3.2.2 Hygienisierungsversuche

3.2.2.1 Nährmedienherstellung

Die für die Hygienisierungsversuche genutzten Medien Leber-, DRCM-Bouillon und Columbia-Blutagar mit Schafblut Plus wurden entsprechend Punkt 3.2.1.5 hergestellt und gelagert. Das Rapsöl wurde ebenfalls in Reagenzgläser gefüllt (9 ml, später 1ml), mit Zellulosestopfen verschlossen, autoklaviert und anschließend kühl und dunkel bis zur Verwendung in den Hygienisierungsversuchen gelagert.

3.2.2.2 Kultivierung und Vermehrung der Clostridienstämme

Die verwendeten Clostridienstämme *C. perfringens* und *C. sporogenes* wurden jeweils in einer Stammkultur in Leberbouillon bei 37 °C (+/- 0,2 °C) im Brutschrank unter anaeroben Verhältnissen kultiviert. Zur Vermehrung der Bakterienmasse wurden anschließend aus der jeweiligen Stammkultur 100 µl auf Columbia-Agar-mit-Schafblut-Plus-Platten ausgespatelt und unter anaeroben Verhältnissen für fünf Tage bei 37 °C (+/- 0,2 °C) bebrütet. Zur Erhöhung der Sauerstoffkonzentration und der daraus resultierenden Anregung zur Sporenbildung wurden die Anaerobiertöpfe am vorletzten Inkubationstag kurz geöffnet und wieder luftdicht verschlossen, am letzten Inkubationstag erneut für die Entfernung der Anaerogen-Beutel geöffnet, anschließend nicht mehr luftdicht verschlossen und bis zur Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur gelagert. Sämtliche Arbeitsschritte, bei denen mit den Clostridienstämmen unmittelbar gearbeitet wurde, wurden unter der Sicherheitswerkbank Klasse 2 durchgeführt.

3.2.2.3 Bestimmung des Sporenanteils

Zur Ermittlung des Anteils an Endosporen wurde aus jeder Charge eine Probe auf einem Glasobjektträger Hitze fixiert und nach Gram gefärbt (siehe Punkt 3.2.1.6). Mit einem Durchlichtmikroskop (1000-fache Vergrößerung) wurden von den Proben je 100 Zellen gezählt und in die beiden Kategorien „Vegetative Zellen“ und „Sporen“ unterteilt. Die Zählung wurde zweimal wiederholt und jeweils von verschiedenen Personen durchgeführt, sodass unabhängige Werte gemittelt werden konnten.

3.2.2.4 Temperaturbehandlung der Clostridiensporen

Mittels Ein-Mikroliter-Impfösen wurde von den Vermehrungsplatten Bakterienmasse aufgenommen. Die Impfösen waren mit durchschnittlich 3,8 mg (Standardabweichung = 1,3 mg) mit Bakterienmasse von *C. perfringens* und durchschnittlich 1,6 mg (Standardabweichung = 0,5 mg) mit Bakterienmasse von *C. sporogenes* beladen (siehe Anhang 8). Jedes Probenröhrchen wurde mit einer Impföse bestückt.

Für die Hitzeresistenzprüfung wurden mehrere Temperaturen und verschiedene Zeitintervalle ausgewählt, die dann im Versuchsablauf iterativ angepasst werden konnten (siehe Tabelle 3 und 4). Die Zeitintervalle wurden in einstündlichen Abständen gewählt. Bei 100 °C wurden ergänzend auch Zeitintervalle unterhalb einer Stunde (in zwanzigminütigen Abständen) untersucht. Pro Zeitintervall jeder Temperatur wurden 10 Wiederholungen, also 10 Probenröhrchen, angesetzt. In den Probenröhrchen befanden sich entweder Rapsöl oder DRCM-Bouillon (siehe Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3: *C. perfringens* - untersuchte Temperaturen, Zeitintervalle und Medien

	DRCM	Rapsöl 9ml	Rapsöl 1ml
70 °C	1-12 h	1-12 h	1-10 h
90 °C	1-10 h		1-10 h
100 °C		1-10 h	20-60 min; 1-10 h
121 °C		1-10 h	1-4 h
134 °C		1-10 h	

Tabelle 4: *C. sporogenes* - untersuchte Temperaturen, Zeitintervalle und Medien

	DRCM	Rapsöl 9 ml	Rapsöl 1ml
70 °C	1-12 h	1-12 h	1-10 h
90 °C	1-10 h		1-10 h
100 °C			1-10 h
121 °C		1-10 h	1-4 h
134 °C		1-10 h	1-4 h

Die Probenröhrchen wurden erst unmittelbar vor dem Versuchsstart vorbereitet. Alle zehn Wiederholungen jedes Zeitintervalls wurden zeitgleich in das entsprechend des gewählten Versuchs temperierte Ölbad eingesetzt. Die Einwirkzeit wurde erst gemessen, als die jeweilige Temperatur in den im Ölbad befindlichen Proben erreicht war. Diese wurde in einem Kontrollröhrchen, welches zeitgleich eingesetzt wurde und welches das gleiche Medium (gleiche Temperatur und gleiche Menge) wie die zu untersuchenden Probenröhrchen, aber keine Impföse, enthielt, mittels eines Laborthermometers bestimmt. Für jede Untersuchungstemperatur wurden drei Versuchsdurchführungen an unterschiedlichen Tagen angestrebt. Um einen effizienten Versuchsablauf zu erreichen, wurden die Versuche mit Verweildauern von bis zu 10 Stunden zusammenhängend an einem Arbeitstag und die Verweildauern von 11 und 12 Stunden im Anschluss daran über Nacht durchgeführt. Nach Erreichen der jeweiligen Verweildauer der untersuchten Temperatur wurden die 10 Probenröhrchen dem Ölbad entnommen und in einem Wasserbad (23-25 °C) schnell auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Abkühlungszeiträume sind Anhang 9 zu entnehmen. Aus den abgekühlten Probenröhrchen, die mit 9 ml Öl

gefüllt waren, wurden die mit Bakterienmasse gefüllten Impfösen entnommen und in mit 10 ml DRCM-Bouillon gefüllte Reagenzröhrchen gegeben. Anschließend wurden diese Röhrchen mit 1 ml Paraffin überfüllt. Die Probenröhrchen, die zwecks Untersuchung des Wasser-/Öl-Medien-Einflusses für die Versuche bei unter 100°C eingesetzt wurden und bereits mit 10 ml DRCM-Bouillon gefüllt waren, wurden nach dem Abkühlen ebenfalls mit 1 ml Paraffin überfüllt. Aufgrund des möglichen Einflusses des Überführens der Impfösen vom Öl-Probenröhrchen zum DRCM-Bouillon-Röhrchen wurden die Versuche nach dem ersten Durchgang angepasst. Die Öl-Menge wurde von 9 ml auf 1 ml in den Probenröhrchen reduziert und die Impfösen, wie bei den vorhergehenden Versuchen, hineingegeben. Nach Versuchsdurchlauf und Abkühlung wurden die Probenröhrchen mit 10 ml DRCM Bouillon aufgefüllt und anschließend unter anaeroben Verhältnissen zehn Tage bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.5 Wachstumskontrolle nach Temperatureinwirkung

Alle mit Paraffin bzw. Öl bedeckten DRCM-Probenröhrchen wurden dann bei 37 °C im Brutschrank bis zu 10 Tage inkubiert und währenddessen mehrmals visuell auf Schwarzfärbung des Mediums kontrolliert. Der Farbumschlag der DRCM-Bouillon von rot zu schwarz reflektiert den durch auskeimende Clostridien gebildeten Schwefelwasserstoff (H₂S). Folglich wurde bei einer schwarz-verfärbten Probe die Auskeimung mit positiv und bei einer nach wie vor rotgefärbten Probe die ausgebliebene Auskeimung mit negativ gewertet.

Um das Keimwachstum an allen Versuchstagen zu garantieren, wurden Kontrollen jeder Kultur-Charge pro Tag und Keim (Impfösen mit Bakterienmasse in DRCM-Bouillon- und in Öl-Röhrchen) außerhalb des Ölbad mitgeführt und im Anschluss an die Untersuchungen wie die behandelten Proben für die anaerobe Inkubation vorbereitet und zusammen mit den behandelten Proben bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurden Röhrchen für die Negativkontrolle der eingesetzten Medien mitgeführt. Die Ergebnisse der Kontrollen sind in Anhang 10 aufgeführt.

3.2.2.6 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 11.0 verwendet. Alle Ergebnisse wurden einer deskriptiven Statistik unterzogen. Für die Hygienisierungsversuche wurden signifikante Unterschiede der verschiedenen Temperaturen und Untersuchungszeiten durch den z-Test ($p < 0,05$) ermittelt.

3.3 Untersuchungsergebnisse

3.3.1 Anlagenscreening

3.3.1.1 Befragung

Insgesamt wurden 300 Anlagenbetreiber befragt. Wobei 100 Anlagenbetreiber je untersuchtes Bundesland einen Fragebogen erhielten. Von den 300 Befragten haben 55 Anlagenbetreiber geantwortet. Dies entspricht einer Rücklaufquote von 19 %. Davon haben 23 Anlagenbetreiber aus Mecklenburg-Vorpommern, 9 Anlagenbetreiber aus Niedersachsen und 23 Anlagenbetreiber aus Schleswig-Holstein ausgefüllte Fragebögen zurück gesendet. 43 der befragten Anlagen betreiben Nassvergärung, 11 Anlagen Feststoffvergärung und eine Anlage arbeitet mit beiden Verfahren (3 Nassvergärer und 1 Feststoffvergärer). Die meisten befragten Anlagen besitzen einen Fermenter (32 Anlagen). 17 Anlagen auch zwei. Nur jeweils zwei Anlagen besitzen drei bzw. vier Fermenter. Eine Anlage gab 20 Fermenter an, eine weitere 40 Fermenter. Zwei Prozessstufen sind bei 34 der befragten Anlagen und eine Prozessstufe bei 21 Anlagen vorzufinden. Die Reaktorsysteme sind überwiegend stehend angeordnet (50 Anlagen). Sechs der befragten Anlagen werden im Temperaturbereich von 37 °C bis 39 °C gefahren. Fünf Anlagen arbeiten im Temperaturbereich von 38 °C bis 42 °C. Der überwiegende Teil der Anlagen (36) betreibt die Vergärung bei Temperaturen von 40 °C bis 42 °C. Weitere drei Anlagen geben einen Temperaturbereich von 41- 44 °C an. Eine Anlage besitzt drei Fermenter, in denen jeweils 40 °C, 45 °C und 55 °C eingestellt sind. Eine andere Anlage gibt einen Temperaturbereich von 42 °C bis 55 °C für ihren Fermenter an. Und zwei Anlagen arbeiten jeweils mit 50 °C bzw. 52 °C. Als Rührtechnik verwenden die meisten Anlagenbetreiber Propellerrührwerke (33) und Paddelrührwerke (18). Bei der Entschwefelung setzen die meisten Anlagen auf das biologische Verfahren (33). Nur vier Anlagenbetreiber gaben eine ausschließlich chemische Entschwefelung an. Die restlichen 18 Anlagen verwenden beide Verfahren. Der überwiegende Teil der Anlagen (49) wird ohne Hygienisierungseinheit betrieben, wobei vier weitere Anlagenbetreiber dazu keine Angaben machten. In zwei Vergärungsanlagen werden Hygienisierungseinheiten verwendet. Hierbei handelt es sich um Abfallvergärungsanlagen, die mit 50 °C bzw. 52 °C Betriebstemperatur arbeiten. Zwölf Anlagen nutzen eine Gärrestaufbereitung mittels Separator, Trocknungsband, Dekanter u.s.w. Zur Biogasproduktion machten drei Anlagenbetreiber keine Angaben. Die anderen befragten Anlagenbetreiber gaben an, dass täglich zwischen 600 und 252.000 m³ Biogas produziert werden (siehe Tabelle 5). Die Anlagen mit Biogasproduktionen von 600 bis

680 m³ pro Tag waren sehr kleine Anlagen mit Fermentervolumina von 400 bzw. 500 m³. Die Anlagenbetreiber, die tägliche Biogasproduktionen von 240.000 bis 252.000 m³ angaben, betreiben 20 Fermenter mit Volumina von jeweils 4500 m³ bzw. 40 Fermenter mit Volumina von jeweils 2575 m³. Zur Biogasqualität machten zwei Anlagenbetreiber keine Angaben. Bei den meisten Anlagen (44) erzielt man zwischen 51 und 55 % Methan im Biogas. Wenige Anlagen (4) erreichen nur einen Methangehalt von 44 bis 50 %. Fünf Anlagenbetreiber gaben erzielte Methangehalte von 57 bis 70 % an. Die Verwertung der Gärreste erfolgt bei 19 der 55 Anlagen im eigenen Betrieb. Weitere 23 Anlagenbetreiber gaben an, dass sie die Gärreste sowohl im eigenen Betrieb als auch extern verwerten. Hierbei werden Gärreste hauptsächlich (20) an die Zulieferbetriebe der Inputmaterialien und seltener (7) an fremde Betriebe abgeführt. Zehn Anlagenbetreiber liefern ihre Gärreste ausschließlich an externe Betriebe. Alle Anlagenbetreiber gaben an, dass ihre Anlagen keine Probleme durch festgestellte Keimbelastungen in Inputsubstraten, Fermenterinhalt und Gärrückständen haben.

Tabelle 5: tägliche Biogasproduktion in befragten Anlagen

Biogasproduktion [m ³ /d]	Anlagen
600-680	2
1.700 - 2.800	6
3.000 - 3.422	5
3.960 - 4.800	6
5.400 - 6.200	7
6.480 - 7.200	10
8.640 - 10.000	5
12.000 - 21.000	7
32.398	1
53.235	1
240.000	1
252.000	1

3.3.1.2 Probenahme

Von den 55 Anlagenbetreibern haben 48 einer Beprobung ihrer Inputsubstrate, Fermenterinhalt und Gärreste zugestimmt. Dazu gehören 20 Anlagenbetreiber aus Mecklenburg-Vorpommern, 7 aus Niedersachsen und 21 aus Schleswig-Holstein. Für die Probenahme wurden insgesamt 16 Anlagen ausgewählt. Darunter fallen reine NawaRo-Biogasanlagen, Biogasanlagen mit Gülleeinsatz und Abfallvergärungsanlagen. Des Weiteren wurden mesophil und thermophil betriebene Anlagen sowie Nass- und Feststoffvergärungsverfahren untersucht (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Anlagenauswahl für Screening

Anlagen-Nr.	Temperatur	Verfahren	Proben von
1	42 °C	Nassvergärung	Maissilage, Gärrest
2	37-38 °C	Nassvergärung	Gärrest
3	40 °C	Nassvergärung	Zuckerrübenmus, Futterreste, Maissilage, Grassilage, Vorgrube, Fermenter, Gärrest
4	45/55/40 °C	Nassvergärung	Maissilage, Fermenter Nr. 2
5	52 °C	Feststoffvergärung	Zuckerrübe, Maissilage, Maissilage+Hirse, Fermenter Nr. 1 und 2, Output fest und flüssig
6	42-44 °C	Nassvergärung	Getreideausputz, Grassilage, Festmistmischung, Fermenter, Gärrest
7	42 °C	Nassvergärung	Maissilage, Fermenter, Gärrest
8	39 °C	Nassvergärung	Maissilage, Weizenschrot, HTK, Rindergülle, Fermenter, Gärrest
9	40 °C	Feststoffvergärung	Grassilage, Maissilage, Fermenter Nr. 1 und 2, Gärrest
10	50 °C	Feststoffvergärung	Maissilage, Rindermist, Pferdemist, Fermenter, Gärrest
11	42 °C	Feststoffvergärung	Maissilage, Fermenter Nr. 1 und Nr. 2, Gärrest v. F1
12	40 °C	Nassvergärung	Input aus Vorgärer; Fermenter 1, 2, 3; Gärrest
13	41 °C	Nassvergärung	Kleegrassilage, Schweinegülle, Fermenter Nr. 1 und 2, Gärrest
14	39,5 °C	Nassvergärung	Maissilage, HTK, Rindermist, Fermenter, Gärrest
15	42-55 °C	Nassvergärung	Input unhygienisiert und hygienisiert, Fermenter, Gärrest fest und flüssig, Permeat
16	38 °C	Nassvergärung	Maissilage a, Maissilage b, Getreide-GPS, Fermenter-Mischprobe, Gärrest fest und flüssig

3.3.1.3 Screening

Mit der Analyse der beiden Input- und Output-Proben aus der ersten mesophil betriebenen Vergärungsanlage, in der Rindergülle, Rinderfestmist und Maissilage vergoren werden, wurde die RIPAC-LABOR GmbH vollumfänglich beauftragt. Die kultivierbare Mikroflora wurde hierbei quantitativ erfasst. Dafür wurde von beiden Proben 1g Untersuchungsmaterial aerob und anaerob mittels Direkt- bzw. in Anreicherung in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} auf diversen Spezialnährböden ausplattiert. Die Ergebnisse der quantitativen Anzüchtung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Es ergab sich eine anaerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) der Maissilage von $4,0 \times 10^6$ KBE/g. Die anaerobe GKZ der Gärrestprobe betrug $3,5 \times 10^5$ KBE/g. Bei der anaeroben bakteriologischen Untersuchung wurde in beiden Proben *Clostridium perfringens* bestimmt. Der in der Gärrestprobe festgestellte Typ A-Stamm mit einem α -Toxinbildungsvermögen von bis zu 64 Naglereinheiten (NE) pro ml Rohtoxin kann

C. perfringens Erkrankungen auslösen. Zudem wurde in der Gärrestprobe *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der quantitativen Anzuchtung für Vergärungsanlage Nr. 1

D12_0275 (allgemeine Angaben)	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung		
	Keimgehalt KBE/g	Erreger	Typ
-1 Biogasprobe (Gärrest)	$2,0 \times 10^4$	<i>unbekannter Erreger</i> ¹⁾	
	$3,0 \times 10^3$	<i>Yersinia enterocolitica</i> ¹⁾	
	$1,7 \times 10^5$	<i>Bacillus licheniformis</i> ¹⁾	
	$>10^2 < 10^3$	<i>Clostridium perfringens</i>	A, 64 NE, β 2 negativ
	$>10^3 < 10^4$	<i>Citrobacter amalonaticus/farmeri</i> ¹⁾	
	$>10^4 < 10^5$	<i>Citrobacter amalonaticus</i> ¹⁾	
	$>10^6$	<i>unbekannter Erreger</i> ¹⁾	
	$>10^6$	<i>Streptococcus bovis/equinus</i> ¹⁾	
-2 Futtermittel (Maissilage)	$1,0 \times 10^5$	<i>Lactobacillus buchneri/parabuchneri</i> ¹⁾	
	$1,0 \times 10^6$	<i>unbekannter Erreger</i> ¹⁾	
	$4,0 \times 10^6$	<i>Lactobacillus buchneri</i> ¹⁾	
	$>10^1 < 10^2$	<i>Clostridium tertium</i> ¹⁾	
	$>10^1 < 10^2$	<i>unbekannter Erreger</i> ¹⁾	
	$\geq 10^0$	<i>Clostridium perfringens</i> ¹⁾	A, 4 NE, β 2 negativ

(Quelle: Ergebnisbericht der RIPAC-LABOR GmbH vom 23.03.2012)

Für die weiteren beprobten Vergärungsanlagen wurden die Substrate ausschließlich auf Clostridien mikrobiologisch untersucht und die isolierten Bakterien zur eindeutigen Bestimmung mittels MALDI-TOF MS an die RIPAC-LABOR GmbH weiter geleitet. Eine Gesamtübersicht der isolierten Clostridien nach Anlagen findet sich im Anhang 5.

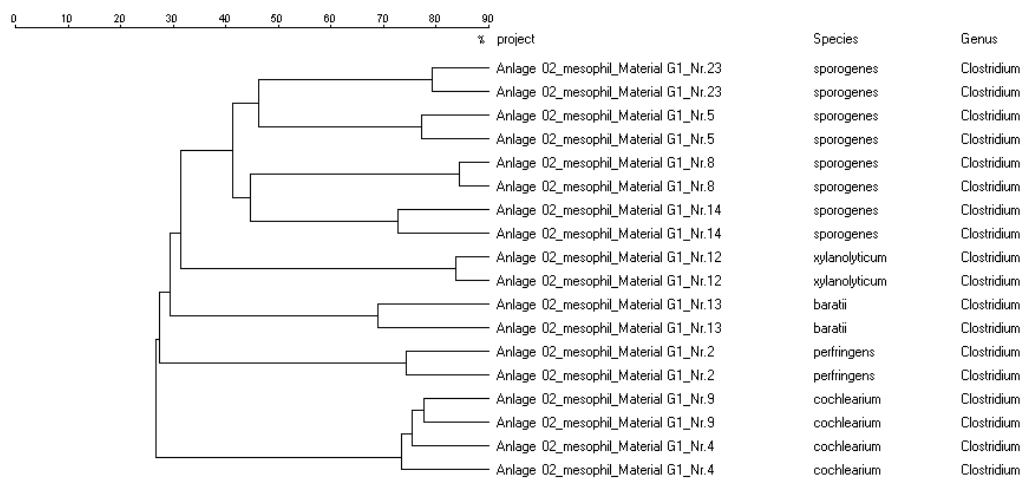


Abbildung 1: Cluster zu Anlage 2

Bei der zweiten mesophil betriebenen Vergärungsanlage, in der Silomais (90-94 %), Getreidekorn (2-3 %) und Ganzpflanzensilage (1 %) vergoren werden, durfte lediglich der Gärrest beprobt werden. Fünf Isolate konnten nicht mehr reaktiviert und nicht für die weitere Analyse an die RIPAC-LABOR GmbH verschickt werden. Die verbliebenen neun Isolate identifizierte die RIPAC-LABOR GmbH als *Clostridium sporogenes*, *C. xylanolyticum*, *C. baratii*, *C. cochlearium* und *C. perfringens* (siehe Abbildung 1).

Die dritte beprobte Vergärungsanlage wird ebenfalls mesophil betrieben. Hier werden Ringergülle, Maissilage, Grassilage, Getreidekorn, Zuckerrübenmus, Erntereste und Feuchtmals vergoren. Bei der mikrobiologischen Untersuchung der Proben konnten Clostridien erfolgreich isoliert werden. Lediglich ein Isolat konnte nicht mehr reaktiviert und nicht für die weitere Analyse an die RIPAC-LABOR GmbH verschickt werden. Sowohl im Inputbereich (Grassilage, Futterresten, Vorgrube) als auch im Fermenter und Gärrückstand konnten neben *C. sporogenes* weitere *Clostridium sp.* identifiziert werden (siehe Abbildung 2).

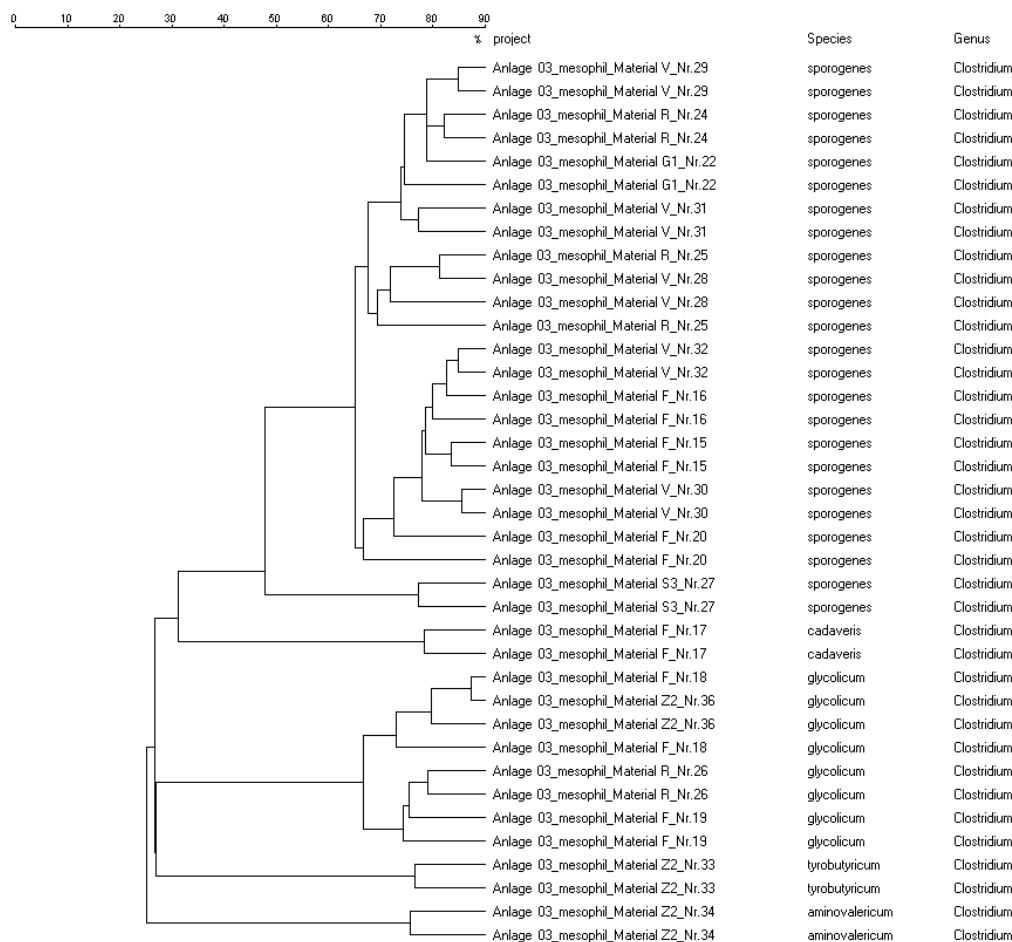


Abbildung 2: Cluster zu Anlage 3

Die vierte Vergärungsanlage besitzt drei Fermenter, die jeweils mit 45 °C, 55 °C und 40 °C betrieben werden. Es werden Rindergülle, Rinderfestmist, Maissilage und Ganzpflanzensilage vergoren. Die Proben durften aus dem Fermenter mit 55 °C Betriebstemperatur und aus der Maissilage genommen werden. Lediglich ein Isolat konnte nicht mehr reaktiviert werden. In der Maissilage konnten *Clostridium perfringens* und *C. xylanolyticum* und im Fermenter konnten *Clostridium glycolicum* und *C. sporogenes* identifiziert werden (siehe Abbildung 3).

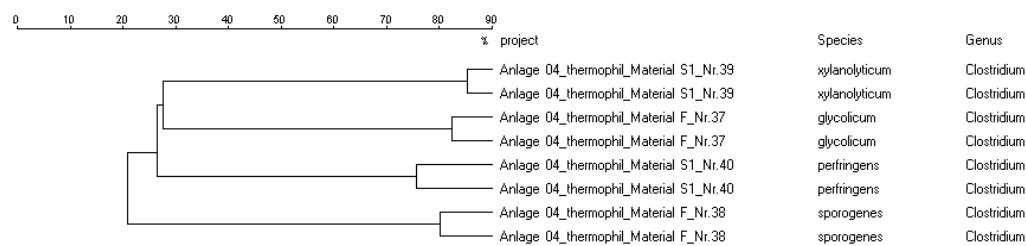


Abbildung 3: Cluster zu Anlage 4

Bei der fünften Vergärungsanlage, die thermophil betrieben wird, handelt es sich um eine Feststoffvergärungsanlage. Proben durften aus Zuckerrüben, Maissilage, Maissilage+Hirse, Fermenter Nr. 1 und 2 und festen und flüssigen Gärresten gezogen werden. Aus den Zuckerrüben, den Fermentern und Gärresten konnten mehrere Clostridien isoliert werden. Die RIPAC-LABOR GmbH identifizierte diese als *C.sporogenes*, *C. aminovalericum* und *C. sordellii* (siehe Abbildung 4). Zwei Isolate aus Fermenter Nr.1 und jeweils ein Isolat aus dem festen und flüssigen Gärrest wurden als „neu in SARAMIS“ eingestuft, da diese Muster des MALDI-TOF Massenspektrums noch nicht in der SARAMIS Datenbank der RIPAC-LABOR GmbH hinterlegt sind. Dadurch können die bekannten Spezies, welche ausreichend hinterlegt sind, ausgeschlossen werden. „Laut Färbung nach Gram, Katalasetest und aerober Kontrolle handelt es sich vermutlich um Clostridien“ (Auswertungsschreiben RIPAC-LABOR GmbH vom 23.03.2012 und 04.09.2012). Bei den Stämmen mit der RIPAC-Bezeichnung D11-0088-1-1-16 und D12-1005-78-1-1 handelt es sich somit um neue unbekannte Spezies der Gattung Clostridium.

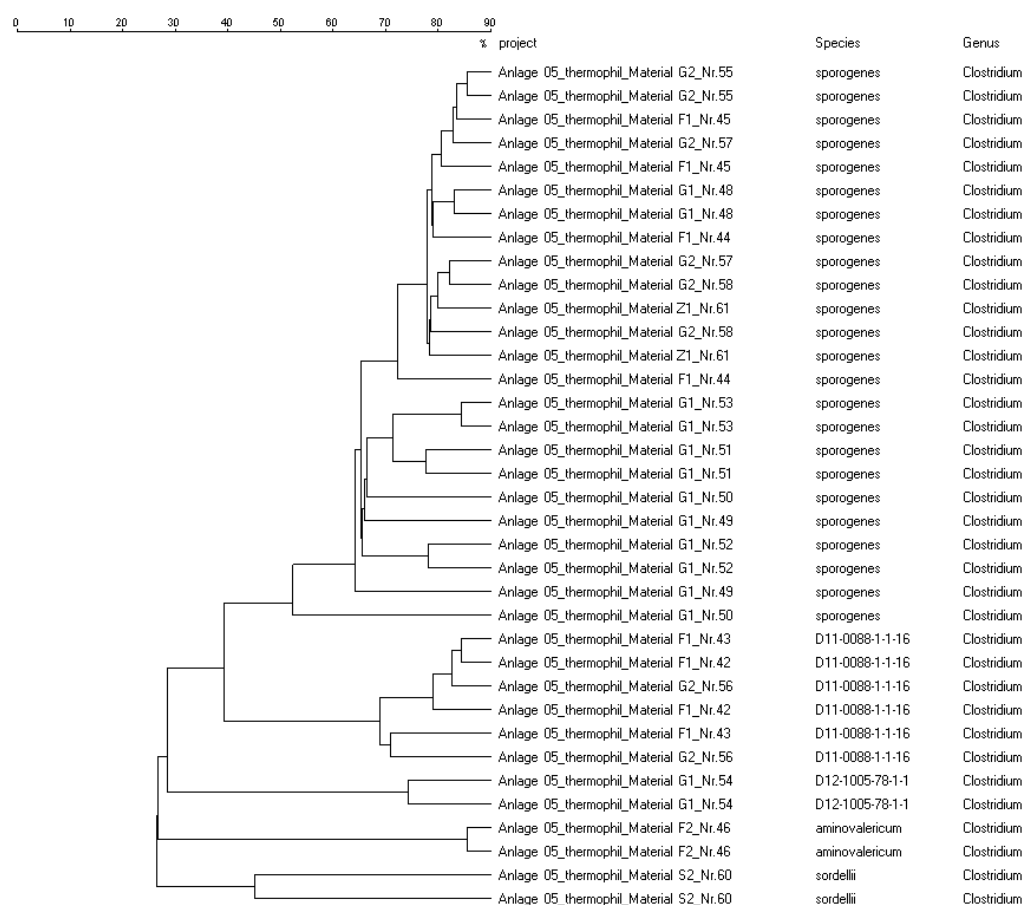


Abbildung 4: Cluster zu Anlage 5

In der sechsten Vergärungsanlage, die mesophil betrieben wird, werden Rinder- und Pferdefestmist, Hühnertrockenkot, Kleeegrassilage, Getreidekorn(Ausputz) vergoren. Mehrere Clostridienstämme konnten bei den mikrobiologischen Untersuchungen der Proben von Getreideausputz, Grassilage, Festmismischung, Fermenter und Gärrest erfolgreich isoliert werden. Lediglich zwei Isolate konnten im Nachgang nicht mehr reaktiviert werden. In der Festmismischung (Pferd/Rind), der Kleeegrassilage, im Fermenter und im Gärrest konnten *C. sporogenes*, *C.glycolicum* identifiziert werden. In der der Kleeegrassilage wurden weiterhin *C. cochlearium* und *C. aminovalericum* identifiziert. Im Fermenterinhalt, der Festmismischung und im Gärrest wurde darüber hinaus auch *C. glycolicum* identifiziert. Im Gärrest wurden weiterhin *C. cadaveris* und *C. bifermentans* sowie drei neue unbekannte Clostridienspezies (RIPAC-Bezeichnung D11-0088-1-1-16, D12-1005-78-1-1- und D13-0204-31-1-1) identifiziert (siehe Abbildung 5).

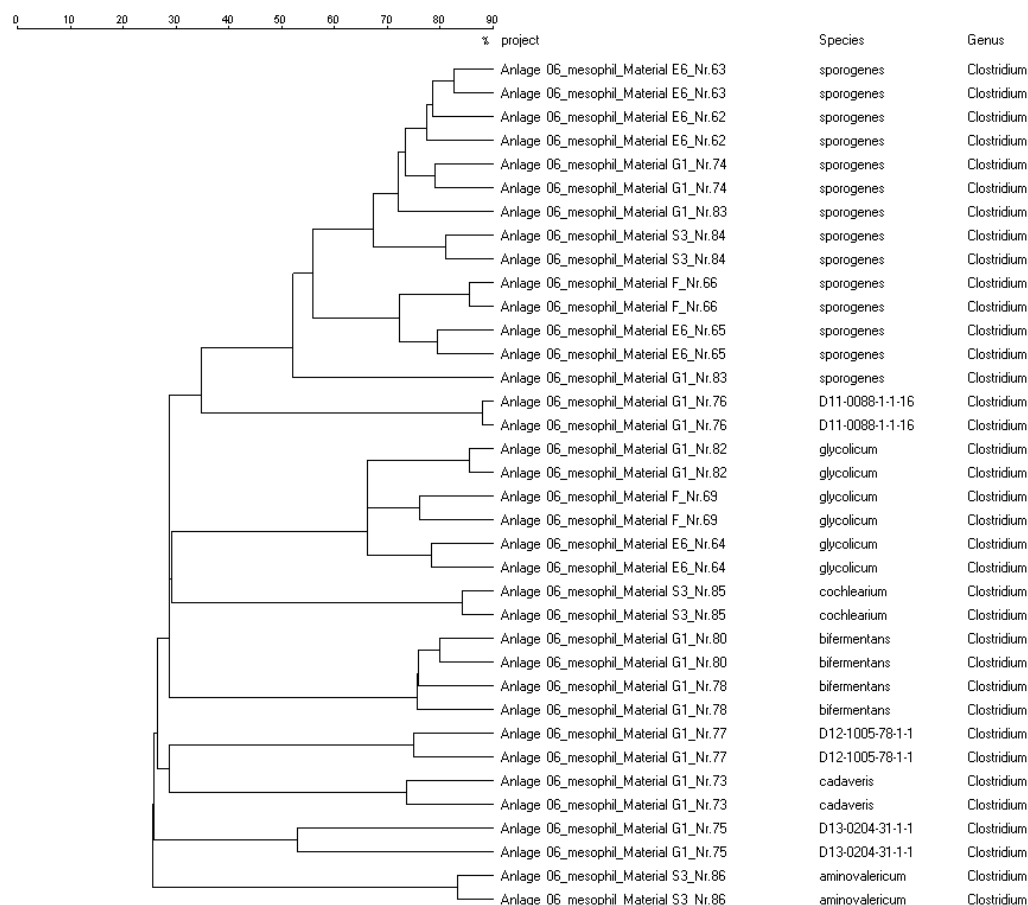


Abbildung 5: Cluster zu Anlage 6

% project	Species	Genus
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.89	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.92	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.94	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.95	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.95	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.92	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.89	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.96	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.96	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.90	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.91	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.91	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.90	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.97	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_G1_Nr.97	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.93	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.93	sporogenes	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.88	bifermentans	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.88	bifermentans	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_S1_Nr.100	D13-0204-45-1-1	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_S1_Nr.100	D13-0204-45-1-1	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_S1_Nr.99	aminovalericum	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_S1_Nr.99	aminovalericum	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.87	glycolicum	Clostridium
Anlage_07_mesophil_Material_F_Nr.87	glycolicum	Clostridium

Bei der achten Vergärungsanlage, die mesophil betrieben wird, konnten aus dem beprobten Hühnertrockenkot, der Rindergülle, Maissilage, dem Fermenterinhalt und Gärrest mehrere Clostridien erfolgreich isoliert werden. Alle Isolate konnten reaktiviert und für die weiteren Analysen an die RIPAC-LABOR GmbH verschickt werden. Diese identifizierte im Hühnertrockenkot *Clostridium sporogenes* und in der Rindergülle neben *C. bifermentans* und *C. glycolicum* auch *C. sporogenes*. In der Maissilage wurde neben *C. sporogenes* eine neue unbekannte Clostridien-Spezies (RIPAC-Bezeichnung: D11-0088-1-1-16) identifiziert. Auch im Gärrest wurde *C. sporogenes* und eine weitere unbekannte Clostridien-Spezies (RIPAC-Bezeichnung: D12-1005-78-1-1) identifiziert (siehe Abbildung 7).

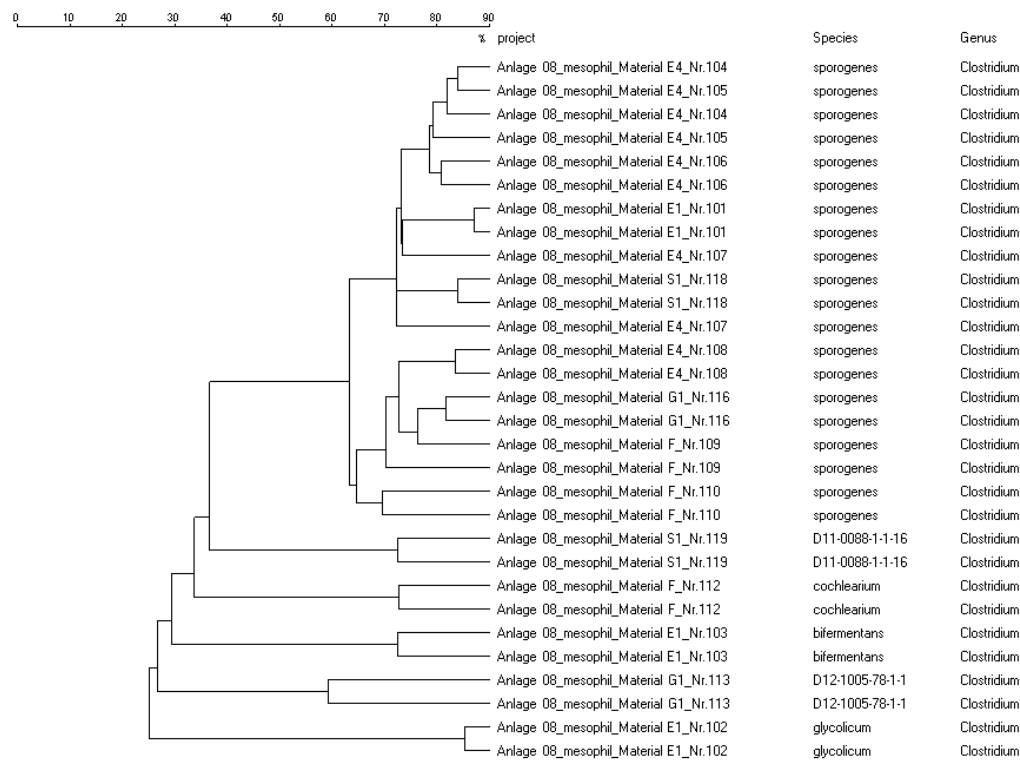


Abbildung 7: Cluster zu Anlage 8

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

% project

Species

Genus

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.135 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.127 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.135 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.125 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.123 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.127 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.125 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.134 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.134 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.123 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.130 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.130 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_S3_Nr.138 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_S3_Nr.138 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.137 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.137 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.132 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.132 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.128 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.128 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.136 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.136 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.131 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.131 sporogenes Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.122 bifementans Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.122 bifementans Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.121 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.121 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.120 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F1_Nr.120 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.129 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_F2_Nr.129 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.133 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_G1_Nr.133 glycolicum Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_S3_Nr.139 cochlearium Clostridium

Anlage_09_mesophil_Material_S3_Nr.139 cochlearium Clostridium

Bei der zehnten Vergärungsanlage, die thermophil betrieben wird, handelt es sich um eine Feststoffvergärungsanlage. Proben durften aus Maissilage, Rindermist, Pferdemist, Fermenter und Gärrest entnommen werden. Aus dem Rinderfestmist, der Maissilage, dem Fermenterinhalt und Gärrest konnten mehrere Clostridien erfolgreich isoliert werden. Alle Isolate konnten reaktiviert werden. Diese identifizierte neben *Clostridium glycolicum* im Gärrest auch *Clostridium sporogenes*, welcher ebenfalls in der Maissilage, im Rinderfestmist und im Fermenter auftrat (siehe Abbildung 9).

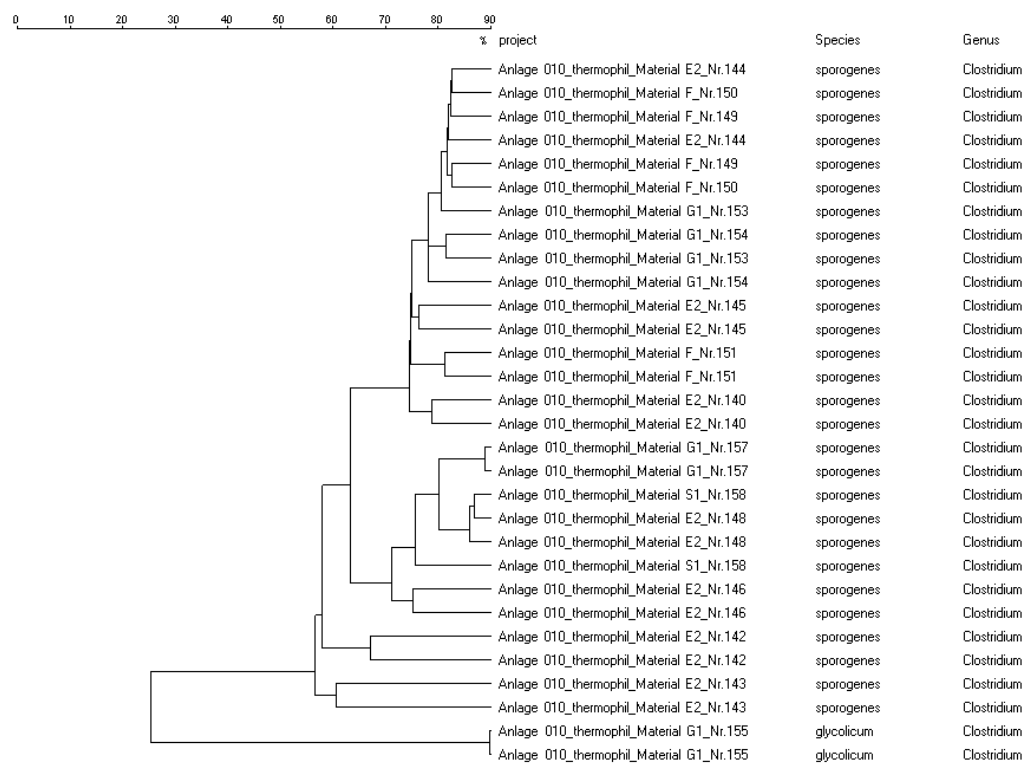


Abbildung 9: Cluster zu Anlage 10

Die elfte untersuchte Vergärungsanlage wird mesophil mit einer Feststoffvergärung für Maissilage betrieben. Proben durften von Maissilage, Maissilage mit Hirse, Fermenter Nr. 1 und Nr. 2 sowie vom Gärrest aus Fermenter Nr. 1 genommen werden. Bis auf eine verdächtige Kolonie von der Maissilage-mit-Hirse-Probe konnten aus den Input- und Output-Proben Clostridien erfolgreich isoliert werden. Diese wurden von der RIPAC-LABOR GmbH anschließend als *Clostridium sporogenes* bestimmt (siehe Abbildung 10).

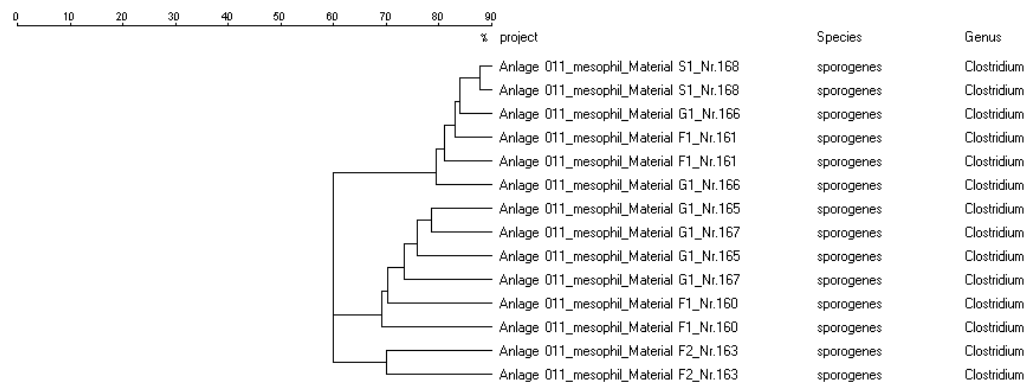


Abbildung 10: Cluster zu Anlage 11

% project	Species	Genus	
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.186	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.186	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.188	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.188	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.176	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.172	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.189	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.176	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.189	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.183	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F1_Nr.180	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F1_Nr.180	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.183	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.172	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F1_Nr.181	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.177	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.192	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.192	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.177	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F1_Nr.179	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F1_Nr.179	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.184	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.184	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F1_Nr.181	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.187	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.187	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.182	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.182	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.194	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.194	sporogenes	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.174	cochlearium	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.174	cochlearium	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.195	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.195	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.196	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.196	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.196	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.190	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.197	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material G1_Nr.197	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.185	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F3_Nr.190	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material F2_Nr.185	bifermentans	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.171	paraputrificum	Clostridium
	Anlage 012_mesophil_Material A1_Nr.171	paraputrificum	Clostridium

39

Die dreizehnte Vergärungsanlage wird mesophil mit Input aus Schweinegülle, Mais- und Kleeegrassilage betrieben. Proben durften von Kleeegrassilage, Schweinegülle, Fermenter Nr. 1 und Nr. 2 sowie Gärrest genommen werden. Aus der Kleeegrassilage und dem Gärrest konnten keine Clostridien isoliert werden. In der Schweinegülle und in beiden Fermenterinhalt wurde *Clostridium sporogenes* isoliert und bestimmt. In der Schweinegülle wurden zusätzlich *C. tyrobutyricum* und ein neue unbekannte Clostridien-Spezies (RIPAC-Bezeichnung: D13-0204-100-1-1) isoliert und identifiziert (siehe Abbildung 12).

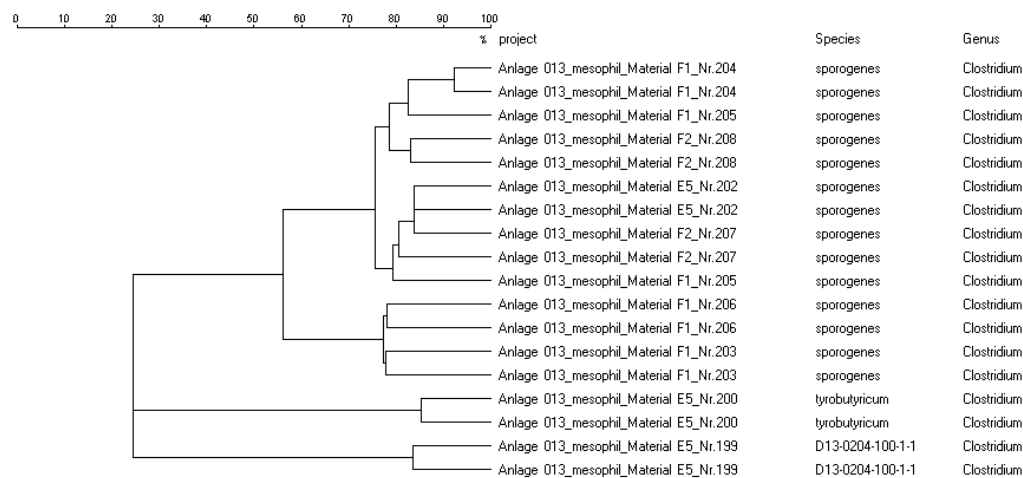


Abbildung 12: Cluster zu Anlage 13

Die vierzehnte untersuchte Vergärungsanlage wird unter Einsatz von Hühnertrockenkot, Rindermist und Maissilage mesophil betrieben. Proben durften von Maissilage, Hühnertrockenkot, Rinderfestmist, Fermenter und Gärrest genommen werden. Nach mikrobiologischer Untersuchung der Proben konnten, bis auf eine verdächtige Kolonie aus der Maissilage-Probe, Clostridien erfolgreich isoliert werden. Die Isolate im Rinderfestmist konnten als *C. cochlearium*, *C. sporogenes* und zwei unbekannte neue Clostridien-Spezies (RIPAC-Bezeichnung: D11-0088-1-1-16 und D13-0204-31-1-1) von der RIPAC-LABOR GmbH bestimmt werden. Die Isolate aus den Proben von Hühnertrockenkot, Maissilage und Fermenter wurde als *C. sporogenes* identifiziert. Im Gärrest wurde neben *C. sporogenes* und *C. bifermentans* eine weitere unbekannte neue Clostridien-Spezies (RIPAC-Bezeichnung D12-1413-1-1-3) identifiziert (siehe Abbildung 13).

Die Isolate mit den Nummern 223, 224 und 226 sind im Cluster mit „F“ dargestellt. Tatsächlich sind diese Isolate nicht dem Fermenterinhalt „F“ sondern dem Gärrest „G“ zugehörig. Hierbei handelt es sich nur um einen Tippfehler bei der Datenübermittlung an die RIPAC-LABOR GmbH.

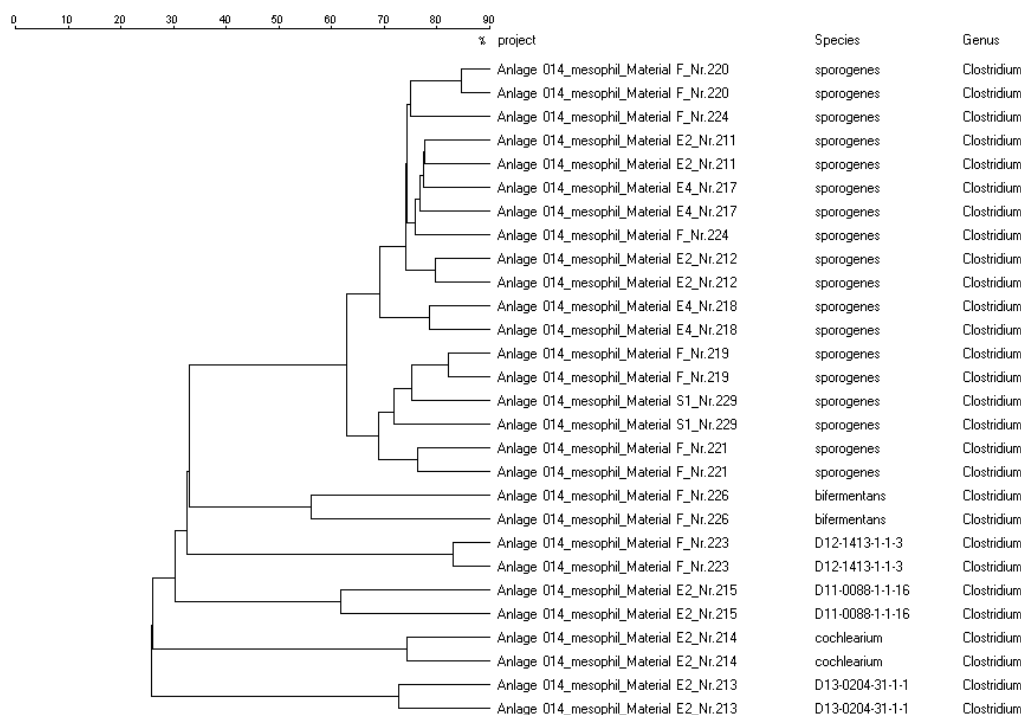


Abbildung 13: Cluster zu Anlage 14

Die fünfzehnte untersuchte Vergärungsanlage ist eine Vergärungsanlage für Bioabfall und Material der Kategorie 3, die im Temperaturbereich von 42 °C bis 55 °C mit einer Hygienisierungseinheit (drei Behälter, 70 °C für 1h) arbeitet. Proben durften aus dem unhygienisierten und hygienisierten Input, einem Fermenter, dem flüssigen und festen Gärrest und dem Permeat genommen werden. Im hygienisierten Input, flüssigen Gärrest und im Permeat konnten keine Clostridien isoliert werden. Aus dem unhygienisierten Input, dem Fermenterinhalt (bis auf eine verdächtige Kolonie) und dem festen Gärrest wurden erfolgreich Clostridien isoliert. Die RIPAC-LABOR GmbH konnte neben einem Isolat aus der Fermenterprobe, welches als *Clostridium limosum* identifiziert wurde, alle weiteren Isolate als *C. sporogenes* identifizieren. Zusätzlich wurden im festen Gärrest zwei Isolate als neue unbekannte Clostridienarten (RIPAC-Bezeichnung: D13-0204-31-1-1 und D13-0204-100-1-1) identifiziert (siehe Abbildung 14).

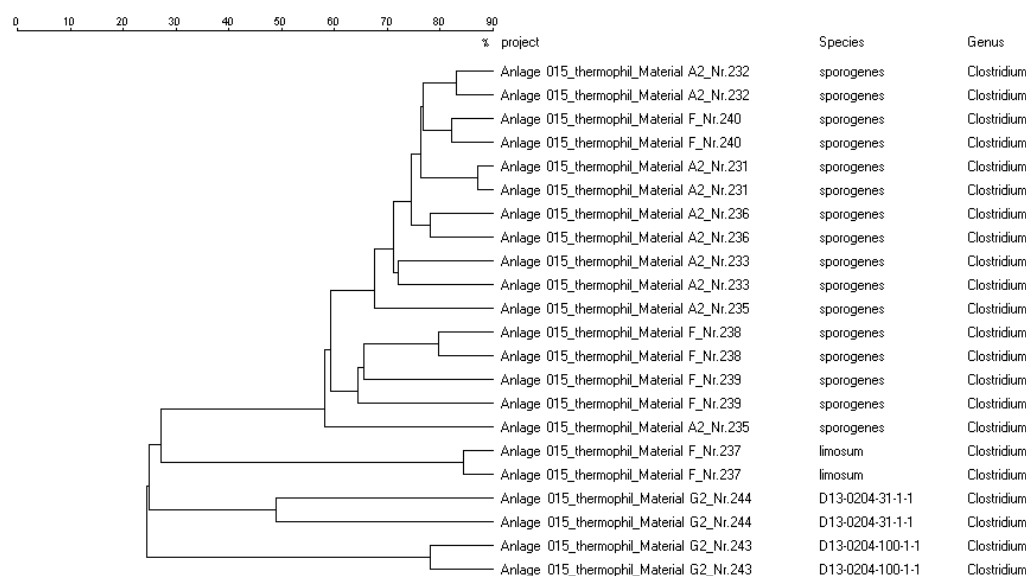


Abbildung 14: Cluster zu Anlage 15

Die sechzehnte Vergärungsanlage wird im mesophilen Temperaturbereich unter Einsatz von Mais-, Gras- und Ganzpflanzensilage betrieben. Proben durften von verschiedenen Maissilagen, Getreide-Ganzpflanzensilage, Fermenter und festem und flüssigem Gärrest genommen werden. Die RIPAC-LABOR GmbH konnte die Isolate in der Maissilage als *C. bifermentans* und *C. sporogenes* identifizieren. In der Fermenterprobe konnte ebenfalls ein Isolat als *C. sporogenes* identifiziert werden. Die Isolate im flüssigen Gärrest wurden ebenfalls als *C. sporogenes* bestätigt. Im festen Gärrest wurde neben *C. sporogenes* eine neue unbekannte Clostridien-Spezies (RIPAC-Bezeichnung: D11-0088-1-1-16) identifiziert (siehe Abbildung 15).

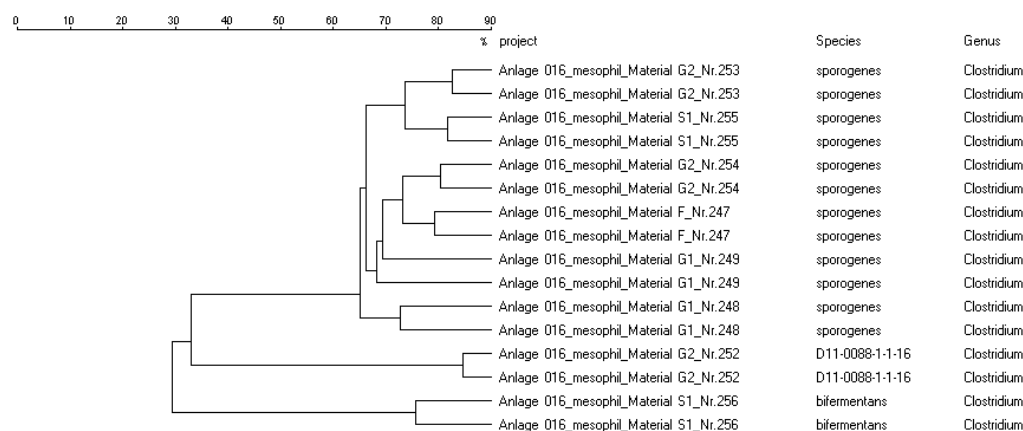


Abbildung 15: Cluster zu Anlage 16

3.3.2 Hygienisierungsversuche

Der durchschnittliche Sporenanteil, der in der Bakterienmasse vorhanden war, die auf den Impfösen in die Probenröhrchen gegeben wurde, betrug für *C. perfringens* 67,2 % (Standardabweichung = 26,3, Minimum = 13 %, Maximum = 92 %) (siehe Anhang 6). und für *C. sporogenes* 81,8 % (Standardabweichung = 9,0, Minimum = 64,5 %, Maximum = 90,7 %) (siehe Anhang 7) an allen Versuchstagen.

3.3.2.1 Versuche mit 70 °C

Für den ersten Versuchsdurchlauf der Temperaturresistenzprüfung der Sporen von *C. perfringens* bei 70 °C wurden in den Probenröhrchen jeweils 9 ml Rapsöl und 10 ml DRCM-Bouillon als Medium verwendet. In den mit DRCM gefüllten Probenröhrchen konnte in allen Wiederholungen aller zwölf untersuchten Zeitintervalle hundertprozentiges Keimwachstum festgestellt werden (siehe Abbildung 16).

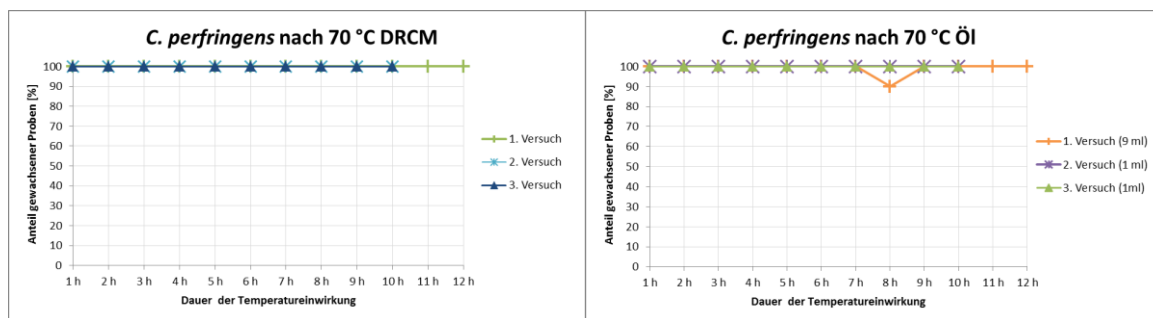


Abbildung 16: Wachstum von *C. perfringens* nach 70 °C

Ebenso konnte bei dieser Temperatur im Rapsöl in allen Zeitintervallen ein vollständiges Keimwachstum registriert werden (siehe Abbildung 16). Wobei lediglich beim Zeitintervall von 8 Stunden eine der zehn Wiederholungen kein Keimwachstum aufwies. Hierfür ergab sich aber kein signifikanter Unterschied zum gleichen Zeitintervall in DRCM ($p=1,000$, siehe Anhang 11). Der Sporenanteil der untersuchten Chargen betrug durchschnittlich 76,8 % für den Tag- und 65,5 % für den Über-Nacht-Versuch (siehe Anhang 6).

Für den zweiten und dritten Versuchsdurchlauf wurden Probenröhrchen mit 1 ml Rapsöl und 10 ml DRCM-Bouillon verwendet. Auf die Über-Nacht-Versuche mit 11 und 12 Stunden wurde aufgrund der Ergebnisse aus dem ersten Versuchsdurchlauf verzichtet. Sowohl in den mit DRCM gefüllten als auch in den mit Rapsöl gefüllten Probenröhrchen wurde in allen Wiederholungen der jeweils zehn untersuchten Zeitintervalle Keimwachstum verzeichnet (siehe Abbildung 16). Der Sporenanteil der untersuchten Chargen betrug für den zweiten Versuchsdurchlauf durchschnittlich 84,3 % und für den dritten Versuchsdurchlauf 89,2 % (siehe Anhang 6).

Der erste Versuchsdurchlauf der Temperaturreistenzprüfung der Sporen von *C. sporogenes* bei 70 °C wurde ebenfalls in 9 ml Rapsöl bzw. 10 ml DRCM als Medium durchgeführt. Der Sporenanteil der Charge für diesen Versuch betrug durchschnittlich 65,1 % (siehe Anhang 7). Bei den Proben in DRCM konnte in den zehn Wiederholungen nach einer, nach elf und nach zwölf Stunden kein Keimwachstum festgestellt werden. Von der 2. bis zur 10. Stunde wurde bei mindestens zwei und maximal sieben der jeweils zehn untersuchten Probenröhrchen Keimwachstum registriert (siehe Abbildung 17).

Im zweiten Versuch (durchschnittlicher Sporenanteil von 83,8 %, siehe Anhang 7) konnte in allen zehn untersuchten Zeitintervallen hundertprozentiges Keimwachstum registriert werden (siehe Abbildung 17).

Beim dritten Versuch (durchschnittlicher Sporenanteil von 87,0 %, siehe Anhang 7) war nach einer Stunde Verweildauer ein reduziertes Keimwachstum in Höhe von 20 % ermittelbar. Für die Verweildauern von zwei bis zehn Stunden war ein hundertprozentiges Keimwachstum wie im zweiten Versuch zu registrieren (siehe Abbildung 17).

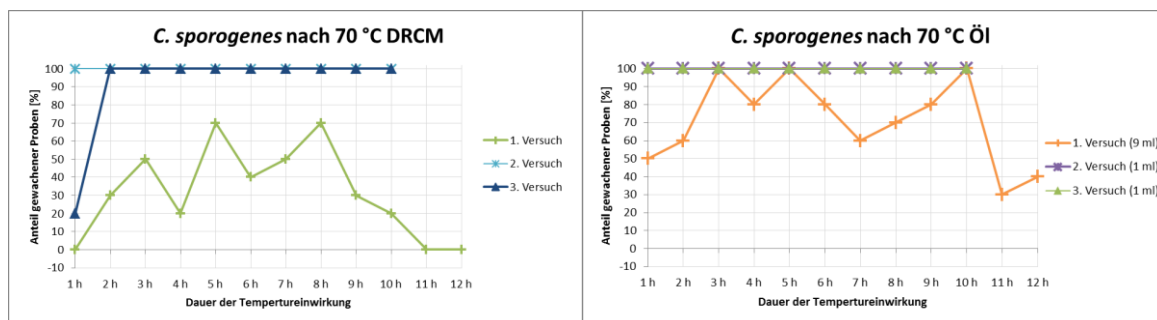


Abbildung 17: Wachstum von *C. sporogenes* nach 70 °C

Signifikante Unterschiede der Wachstumshäufigkeiten konnten zwischen dem ersten und dem zweiten Versuch bei allen Verweildauern außer nach fünf und nach acht Stunden ausgemacht werden ($p \leq 0,001$ - $0,039$, siehe Anhang 16). Ebenso ergaben sich signifikante Unterschiede im Vergleich der Wachstumshäufigkeiten des ersten Versuchs mit dem dritten Versuch nach zwei, drei, vier, sechs, sieben, neun und zehn Stunden Verweildauer ($0,001 \leq p \leq 0,039$, siehe Anhang 16).

Im Rapsöl war im ersten Versuchsdurchlauf bei 70 °C in allen untersuchten Zeitintervallen Keimwachstum zu verzeichnen, wobei ebenfalls nach einer, nach elf und nach zwölf Stunden die geringsten Wachstumsergebnisse (50 %, 30 % und 40 %) auftraten. Hundertprozentiges Wachstum konnte nach drei, nach fünf und nach zehn Stunden registriert werden (siehe Abbildung 17). Im zweiten und dritten Versuch mit Rapsöl war

ein hundertprozentiges Wachstum in allen Zeitintervallen zu verzeichnen (siehe Abbildung 17).

Signifikante Unterschiede in den Wachstumshäufigkeiten ergaben sich zwischen dem ersten Versuch und den beiden anderen Versuchen nach einer Stunde Verweildauer ($p=0,039$) (siehe Anhang 16).

Im Vergleich der eingesetzten Medien der ersten Versuchsreihe bei 70 °C ergaben sich signifikante Unterschiede nach einer, drei, vier und zehn Stunden zwischen den Wachstumshäufigkeiten in DRCM und in Rapsöl, wobei im DRCM geringere Auskeimraten zu verzeichnen waren als im Rapsöl (siehe Anhang 16).

Beim Vergleich der eingesetzten Medien im zweiten und dritten Versuch ergab sich ausschließlich für die Verweildauer von einer Stunde ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$, siehe Anhang 16).

3.3.2.2 Versuche mit 90 °C

Bei der Temperaturreistenzprüfung der Sporen von *C. perfringens* bei 90 °C wurde im ersten Versuchsdurchlauf (durchschnittlicher Sporenanteil 92,0 %, siehe Anhang 6) in DRCM erstmalig nach fünf Stunden vermindertes Keimwachstum registriert, welches nach acht Stunden vollständig ausblieb, aber noch einmal nach zehn Stunden bei 10 % lag.

Der zweite Versuchsdurchlauf (durchschnittlicher Sporenanteil von 88,6 %, siehe Anhang 6) zeigte erst nach acht Stunden ein reduziertes Keimwachstum, welches sich nach zehn Stunden bis auf 10 % absenkte. Im dritten Versuchsdurchlauf (durchschnittlicher Sporenanteil von 90,1 %, siehe Anhang 6) konnte das Absinken des Keimwachstums erstmalig nach sechs Stunden registriert werden. Es reduzierte sich nach zehn Stunden ebenfalls bis auf 10 % (siehe Abbildung 18).

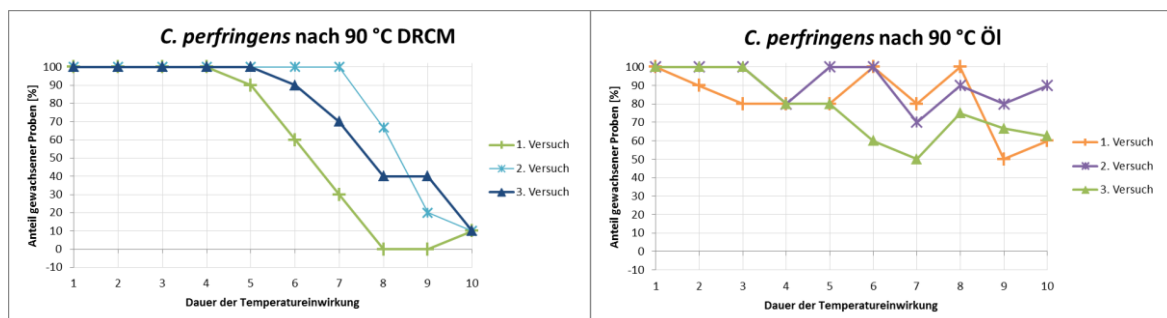


Abbildung 18: Wachstum von *C. perfringens* nach 90 °C

Signifikante Unterschiede bei den Wachstumshäufigkeiten in DRCM konnten nur für die Zeitintervalle von sieben ($p=0,005$) und acht Stunden ($p=0,009$) zwischen dem ersten und zweiten Versuchsdurchlauf ermittelt werden (siehe Anhang 12). Generell zeigt sich in

DRCM aber ein ähnlicher Verlauf in der signifikanten Reduktion des Keimwachstums nach längerer Verweildauer in allen drei Versuchen.

In Rapsöl konnte in den drei unabhängigen Versuchsdurchläufen in allen zehn untersuchten Zeitintervallen Keimwachstum festgestellt werden, wobei sich nach vier, sieben und neun Stunden stärkere Reduzierungen im Vergleich zu den anderen Zeitintervallen erkennen lassen. In Rapsöl sind die Wachstumshäufigkeiten in allen drei Versuchen starken Schwankungen unterlegen, wobei auch nur eine leichte Tendenz der Reduzierung des Keimwachstums nach längerer Verweildauer erkennbar ist (siehe Abbildung 18). Beim Herausnehmen der Röhrchenständer aus dem Ölbad nach Erreichen der jeweiligen Verweildauer konnte festgestellt werden, dass in manchen Röhrchen die Ösenspitzen aus dem Medium herausragten. Diese Röhrchen wurden bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt und verworfen. Tabelle 8 listet die in den berücksichtigten Röhrchen gewachsenen Proben des 90 °C-Versuchs mit *C. perfringens* auf.

Tabelle 8: *C. perf.* - 90 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen

C. perf. 90 °C Öl Verweildauer	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
1h	10(10)	10(10)	8(8)
2h	9(10)	10(10)	9(9)
3h	8(10)	10(10)	9(9)
4h	8(10)	8(10)	8(10)
5h	8(10)	8(8)	8(10)
6h	8(8)	8(8)	6(10)
7h	8(10)	7(10)	5(10)
8h	9(9)	9(10)	6(8)
9h	4(8)	8(10)	6(9)
10h	6(10)	9(10)	5(8)

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumshäufigkeiten in den untersuchten Zeitintervallen der drei Versuche in Rapsöl (siehe Anhang 12).

Beim Vergleich der drei Versuche zeigten sich aber signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001 - 0,031$) zwischen den verwendeten Medien DRCM und Rapsöl in den Zeitintervallen von vier, acht, neun und zehn Stunden (siehe Anhang 12). In DRCM keimten nach längerer Verweildauer deutlich weniger Proben aus als im Rapsöl (siehe Abbildung 18). Hierbei verdeutlicht sich, dass bei den 90 °C-Versuchen im öligen Medium eine schwächere Reduktion des Keimwachstums als im wässrigen Medium vorliegt (siehe Abbildung 18).

Bei allen drei Versuchsreihen mit *C. sporogenes* bei 90 °C (durchschnittliche Sporenanteile von 89,7 %, 89,2 % und 90,7 %, siehe Anhang 7) konnte hundertprozentiges Keimwachstum sowohl in DRCM als auch in Rapsöl verzeichnet werden (siehe Abbildung 19).

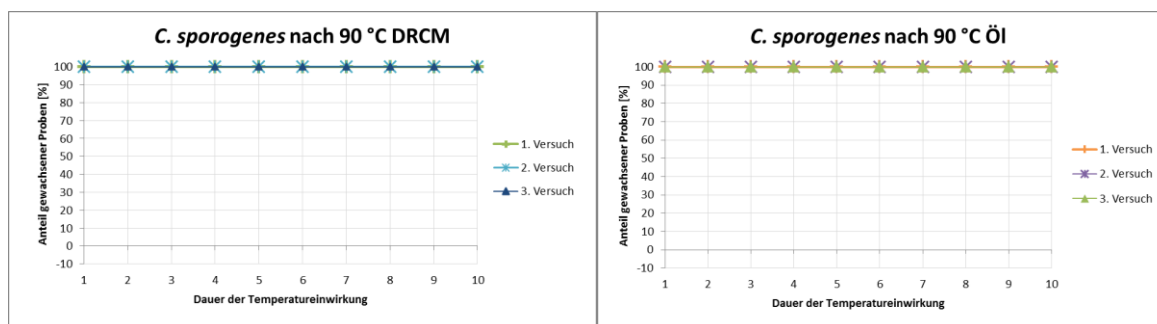


Abbildung 19: Wachstum von *C. sporogenes* nach 90 °C

Auch bei diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass in manchen Röhrchen nach der jeweiligen Verweildauer im Ölbad die Ösenspitzen aus dem Medium herausragten. Diese Röhrchen wurden bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt und verworfen. Tabelle 9 zeigt die in den berücksichtigten Röhrchen gewachsenen Proben des 90 °C-Versuchs mit *C. sporogenes*.

Tabelle 9: *C. sporo.* - 90 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen

C. sporo. 90 °C Öl Verweildauer	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
1h	10(10)	10(10)	9(9)
2h	10(10)	10(10)	8(8)
3h	10(10)	10(10)	10(10)
4h	9(9)	10(10)	10(10)
5h	10(10)	10(10)	10(10)
6h	10(10)	10(10)	9(9)
7h	10(10)	10(10)	10(10)
8h	10(10)	10(10)	10(10)
9h	10(10)	10(10)	9(9)
10h	10(10)	10(10)	10(10)

3.3.2.3 Versuche mit 100 °C

In der Versuchsreihe mit 100 °C wurden zusätzlich Verweilzeiten unterhalb einer Stunde an den Sporen von *C. perfringens* untersucht. Der Sporenanteil der eingesetzten Charge betrug durchschnittlich 35,5 % (Minimum: 3 %, Maximum: 68%; siehe Anhang 6). Nach 20 Minuten konnte ein hundertprozentiges Keimwachstum festgestellt werden. Nach 40

Minuten wuchsen die Keime im ersten und zweiten Versuchsdurchlauf noch in 70 beziehungsweise 80 % der Proben. Im dritten Versuch ergab sich nach 40 Minuten wieder ein hundertprozentiges Keimwachstum. Nach einer Stunde blieb das Keimwachstum im ersten Versuch bei 70 %, im zweiten Versuch stieg es nach einer Stunde wieder auf 90 %. Im dritten Versuch senkte es sich auf 90 % ab (siehe Abbildung 20). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumshäufigkeiten dieser Versuchsreihen (siehe Anhang 13).

In der ersten Versuchsreihe für Verweildauern von ein bis zehn Stunden bei 100 °C betrug der Sporenanteil durchschnittlich 28,3 % (Minimum: 20 %, Maximum: 40,5 %, siehe Anhang 6). Bis nach acht Stunden Verweildauer zeigte sich eine stark schwankende Reduzierung im Keimwachstum bis auf 0 %, wobei schon nach vier Stunden 80 % der Proben nicht auskeimten. Nach neun Stunden kam es wieder zu einem Anstieg auf 12,5 % und nach 10 Stunden Verweilzeit bei 100 °C konnte in 50 % der untersuchten Proben Keimwachstum ermittelt werden (siehe Abbildung 20).

Im zweiten Versuch (durchschnittlicher Sporenanteil von 79,4 %, siehe Anhang 6) reduzierte sich das Keimwachstum schwankend bis auf 10 % nach zehn Stunden Verweildauer, wobei schon stärkere Einschnitte im Keimwachstum nach drei Stunden (60 %) und nach sieben Stunden (10 %) zu verzeichnen waren (siehe Abbildung 20).

Im dritten Versuch (durchschnittlicher Sporenanteil von 89,3 %, siehe Anhang 6) zeigte sich bereits nach einer Stunde Verweilzeit bei 100 °C eine Reduzierung des Keimwachstums auf 80 %. Bis 5 Stunden reduzierte sich der Anteil auswachsender Proben auf 25 %. Nach sechs Stunden zeigte sich hingegen wieder eine höhere Wachstumsrate von 60 %, die dann bis nach neun Stunden Verweildauer bei 100 °C auf 30 % zurückging. Nach zehn Stunden konnte eine Wachstumsrate von 37,5 % ermittelt werden (siehe Abbildung 20).

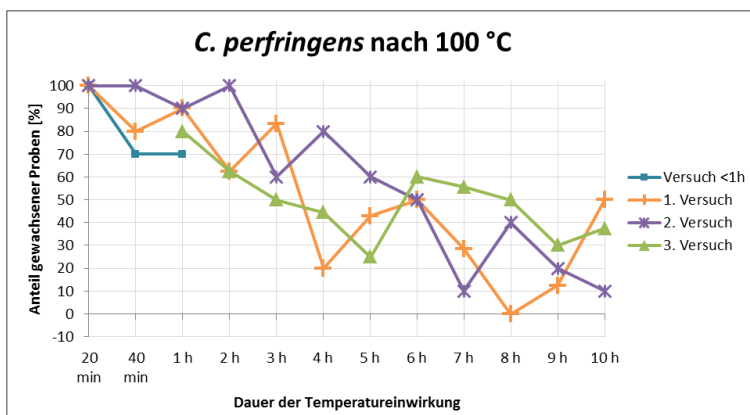


Abbildung 20: Wachstum von *C. perfringens* nach 100 °C

Die Röhrchen, bei denen nach Versuchsende die Ösenspitzen aus dem Medium ragten, wurden bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt und verworfen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: *C. perf.* - 100 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen

C. perfr. 100 °C Verweildauer	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
1h	9(10)	9(10)	8(10)
2h	5(8)	10(10)	5(8)
3h	5(6)	6(10)	5(10)
4h	1(5)	8(10)	4(9)
5h	3(7)	6(10)	2(8)
6h	4(8)	5(10)	6(10)
7h	2(7)	1(10)	5(9)
8h	0(5)	4(10)	5(10)
9h	1(8)	2(10)	3(10)
10h	4(8)	1(10)	3(8)

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumshäufigkeiten der drei Versuchsreihen bei 100 °C (siehe Anhang 13).

Signifikante Unterschiede ergaben sich aber im Vergleich der Versuchsreihen bei 90 °C mit 100 °C, wobei sich die Wachstumsraten der 90 °C-Versuche in DRCM in den Verweildauern von zwei bis sieben Stunden signifikant ($p \leq 0,001-0,019$) von den Wachstumsraten der 100 °C-Versuche in Rapsöl unterscheiden (siehe Anhang 14). Erst nach acht Stunden Verweilzeit werden deutliche Reduzierungen im Keimwachstum bei einer Temperatur von 90°C im wässrigen Medium erreicht, wobei bei 100 °C schon nach drei Stunden Reduzierungen im Keimwachstum möglich sind.

Ebenso finden sich signifikante Unterschiede zwischen den Wachstumsraten der 90 °C-Versuchsreihe mit Rapsöl und der 100°C-Versuchsreihe mit Rapsöl ($p \leq 0,001-0,012$) nach drei, fünf, sechs, sieben, neun und zehn Stunden Verweildauer (siehe Anhang 14).

Der erste Versuch zur Temperaturreistenzprüfung der Sporen von *C. sporogenes* bei 100 °C erfolgte mit einem durchschnittlichen Sporenanteil von 74,5 % (siehe Anhang 7). Nach einer bis zu drei Stunden Verweildauer konnte hundertprozentiges Keimwachstum registriert werden. Nach vier Stunden konnte in 90 % der untersuchten Proben Keimwachstum festgestellt werden und nach fünf Stunden waren wieder 100 % bewachsen. Danach reduzierte sich das Keimwachstum schwankend bis auf 60 % nach neun Stunden Verweildauer bei 100 °C. Aber nach zehn Stunden verzeichnete man schon wieder bei 90 % der untersuchten Proben Keimwachstum (siehe Abbildung 21).

Sowohl im zweiten (Sporenteil 84,8 %, siehe Anhang 7) als auch im dritten Versuch (Sporenteil 83,4 %, siehe Anhang 7) konnte über die gesamte Verweildauer hundertprozentiges Keimwachstum registriert werden (siehe Abbildung 21).

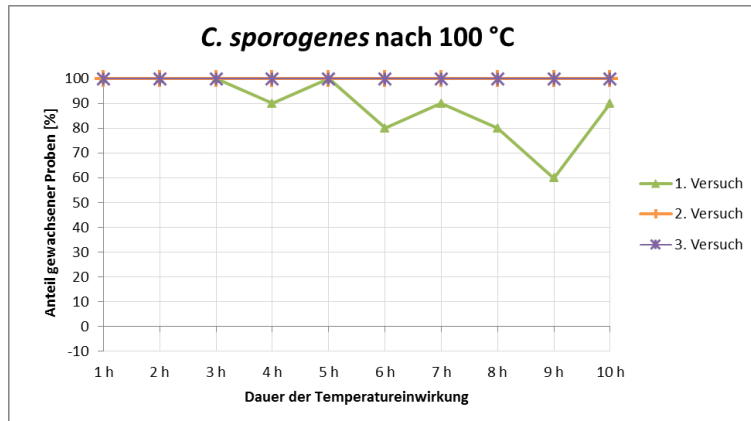


Abbildung 21: Wachstum von *C. sporogenes* nach 100 °C

Auch nach den 100 °C-Versuchen ragten manchmal Ösenspitzen aus dem Medium heraus, wodurch die betreffenden Röhrchen verworfen wurden (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: *C. sporo.* - 100 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen

<i>C. sporo.</i> 100 °C Verweildauer	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
1h	10(10)	10(10)	10(10)
2h	10(10)	9(9)	10(10)
3h	10(10)	10(10)	10(10)
4h	9(10)	10(10)	9(9)
5h	10(10)	10(10)	10(10)
6h	8(10)	10(10)	10(10)
7h	9(10)	9(9)	10(10)
8h	8(10)	10(10)	10(10)
9h	6(10)	10(10)	9(9)
10h	9(10)	9(9)	10(10)

Im statistischen Vergleich der Wachstumshäufigkeiten der einzelnen Versuche ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumshäufigkeiten innerhalb der 100 °C-Versuche (siehe Anhang 18) und auch nicht zwischen den Versuchen von 90 °C und 100 °C (siehe Anhang 17).

3.3.2.4 Versuche mit 121 °C

Es wurden zwei Versuchsreihen an den Sporen von *C. perfringens* bei 121 °C durchgeführt. Im ersten Versuch durchschnittlicher Sporenteil von 71 %, siehe

Anhang 6) wurden zehn Zeitintervalle untersucht, wobei in allen kein Keimwachstum nach der Einwirkung von 121 °C festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 22). Der Sporenanteil im zweiten Versuch betrug durchschnittlich 13 % (siehe Anhang 6). Über die gesamte Versuchsdauer von vier Stunden konnte ebenfalls kein Keimwachstum in den Proben festgestellt werden (siehe Abbildung 22).

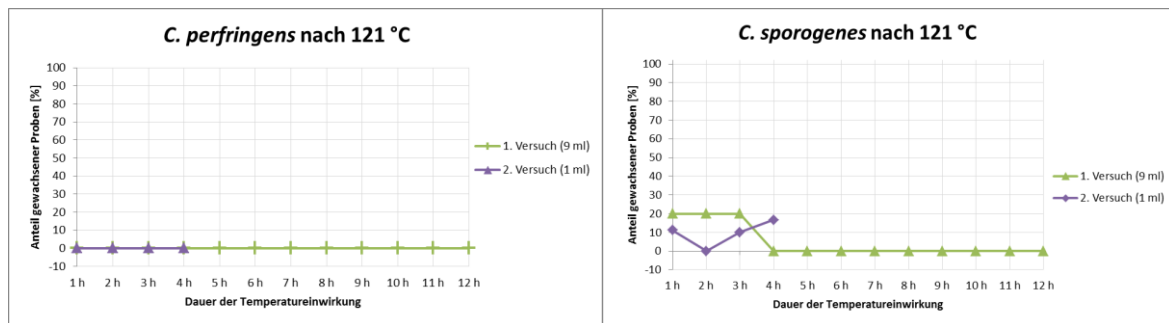


Abbildung 22: Wachstum von *C. perfringens* und *C. sporogenes* nach 121 °C

Im Vergleich der Wachstumshäufigkeiten der Versuche bei 121 °C mit den Wachstumshäufigkeiten der Versuche bei 100 °C zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Zeitintervallen von einer bis sechs Stunden ($p \leq 0,001-0,033$) (siehe Anhang 15).

In der ersten Versuchsreihe mit *C. sporogenes* bei 121 °C wurde 9 ml Rapsöl eingesetzt und für die ersten drei Zeitintervalle Keimwachstum bei jeweils zwei der zehn Wiederholungen verzeichnet. Ab der 4. Stunde wurde kein Keimwachstum mehr registriert (Siehe Abbildung 22). Der Sporenanteil belief sich für diese Versuchsreihe auf durchschnittlich 88,5 % (siehe Anhang 7).

Der zweite Versuch wurde aufgrund der Ergebnisse des ersten Versuchs in den untersuchten Verweildauern (1h bis 4h anstelle bis 10 h) angepasst und mit 1 ml Rapsöl in den Probenröhrchen durchgeführt. Hierbei ergab sich ein durchschnittlicher Sporenanteil von 72,5 % (siehe Anhang 7). In den ersten drei Zeitintervallen konnten jeweils noch 10 % der eingesetzten Sporen auskeimen. Nach vier Stunden waren es sogar 16,67 % (siehe Abbildung 22). Im Vergleich der Wachstumshäufigkeiten der Versuchsreihe mit 100 °C und der mit 121 °C ergaben sich signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$, siehe Anhang 19).

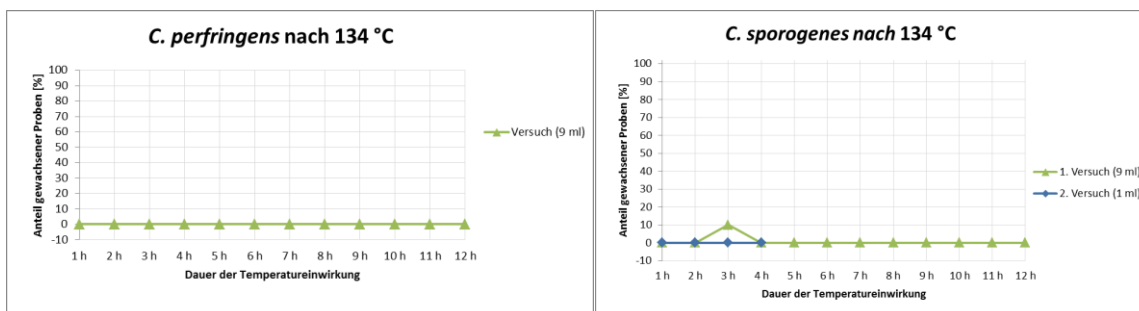
Auch nach den 121 °C-Versuchen ragten manchmal Ösenspitzen aus dem Medium heraus, wodurch die betreffenden Röhrchen verworfen wurden (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: 121 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen

121 °C Verweildauer	C. perfr 1. Versuch	C. perfr 2. Versuch	C. sporo. 1. Versuch	C. sporo. 2. Versuch
1h	10(10)	0(5)	2(10)	1(9)
2h	10(10)	0(6)	2(10)	0(5)
3h	10(10)	0(7)	2(10)	1(10)
4h	10(10)	0(8)	0(10)	1(6)
5h	10(10)		0(10)	
6h	10(10)		0(10)	
7h	10(10)		0(10)	
8h	10(10)		0(10)	
9h	10(10)		0(10)	
10h	10(10)		0(10)	

3.3.2.5 Versuche mit 134 °C

Die Temperatureinwirkung von 134 °C auf *Clostridium perfringens* wurde in einem Versuch mit zehn Zeitintervallen durchgeführt. Der durchschnittliche Sporenanteil betrug 60 % (siehe Anhang 6). Bei allen untersuchten Verweildauern konnte kein Keimwachstum festgestellt werden (siehe Abbildung 23). Im Vergleich der Wachstumshäufigkeiten der Versuche mit 134 °C und 121 °C ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Anhang 15).

**Abbildung 23:** Wachstum von *C. perfringens* und *C. sporogenes* nach 134 °C

Beim ersten 134 °C-Versuch mit *C. sporogenes* (durchschnittlicher Sporenanteil von 88,0 %, siehe Anhang 7) wurde 9 ml Rapsöl eingesetzt. Außer im dritten Zeitintervall (1 von 10 Wiederholungen positiv) konnte kein Keimwachstum für die untersuchten Zeitintervalle festgestellt werden (siehe Abbildung 23). Die zweite Versuchsreihe wurde aufgrund der Ergebnisse des ersten Versuchs ebenfalls in der untersuchten Verweildauer (1 h bis 4 h anstelle bis 10 h) angepasst und mit 1 ml Rapsöl durchgeführt. Hierfür ergab sich ein durchschnittlicher Sporenanteil von 64,5 % (siehe Anhang 7). Bei allen vier

untersuchten Verweildauern konnte kein Keimwachstum festgestellt werden (siehe Abbildung 23). Signifikante Unterschiede ergaben sich für die beiden Versuchsreihen mit 134 °C nicht (siehe Anhang 20). Beim 2. Versuch ragten einige Ösenspitzen aus dem Medium heraus, wodurch die betreffenden Röhrchen verworfen wurden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: *C. sporo.* - 134 °C - gewachsene Proben in berücksichtigten Röhrchen

134 °C Verweildauer	<i>C. sporo.</i> 2. Versuch
1h	0(2)
2h	0(3)
3h	0(6)
4h	0(3)

3.4 Diskussion

3.4.1 Material

3.4.1.1 Anlagenscreening

Nährbouillon I wurde zu Beginn der mikrobiologischen Untersuchungen als Zusatz für die Homogenisierung fester Proben und für die Eluatherstellung im Stomacher eingesetzt, da es das Wachstum von Mikroorganismen unterstützt. LUND & WYATT (1984) erkannten einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von NaCl und dem Redoxpotential auf das Auskeimen von Clostridien-Sporen. Auch TAYLOR et al. (2013) stellten in ihren Versuchen fest, dass ein stärkeres Keimwachstum von *C. sporogenes* bis zu einem NaCl-Gehalt von 0,8 % im Nährmedium zu verzeichnen ist. Daher wurde später nur NaCl-Lösung verwendet.

Die Verdünnungsreihen wurden erstellt, um die Interaktionen zwischen den anderen Bakterien und den Clostridien auf den Nährböden zu reduzieren und den Clostridien somit mehr Raum und Zeit zum Wachsen zu verschaffen.

Die alternative Thioglycolat-Lösung USP (OXOID DEUTSCHLAND GMBH, 2009) wurde für die Anzucht anaerober Mikroorganismen durch Senkung des Redoxpotentials im Nährmedium für die Proben im Rahmen des Anlagenscreenings verwendet. Für die anderen Untersuchungen im Rahmen der Hygienisierungsversuche war DRCM Bouillon (Differential Reinforced Clostridial Medium, Oxoid Deutschland GmbH, 2009) allein ausreichend für Anzucht sulfitreduzierender, sporenbildender Anaerobier. Zudem ergab sich ein besserer Wachstumsnachweis durch eindeutige Schwarzfärbung (H_2S -Bildung). Die Thioglycolat-Lösung zeigte nur eine einfache Trübung. Das Probeneluat war bereits trüb, daher waren nach der Bebrütung kaum Veränderungen sichtbar.

3.4.1.2 Hygienisierungsversuche

Die für die Hygienisierungsversuche genutzten Clostridienstämme *C. perfringens* und *C. sporogenes* wurden aufgrund ihrer starken Umweltresistenz (SETLOW, 2003; SETLOW, 2006; SCHNEIDER, 2007) und Pathogenität (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009; RODLOFF, 2012; KAYSER & BÖTTGER, 2010; NAWROCKI, 2018; POULAIN & POPOFF, 2019) ausgewählt. *C. sporogenes* wurde zudem in mehreren Studien erfolgreich aufgrund der engen Verwandtschaft zu *C. botulinum* (BYUN et al., 2011; OCIO et al., 1994; WELT et al., 1994; GUAN et al., 2003; MCGLYNN et al., 2003; TAYLOR et al., 2013), und weil der Stamm kein Botulinum-Neurotoxin produziert und seine Sporen eine höhere Hitzetoleranz aufweisen

(NAKAMURA et al., 1977; BULL et al., 2009; BROWN et al., 2012; DIAO et al., 2014; BUTLER et al., 2017), als Surrogat eingesetzt.

Die Unregelmäßigkeiten im ersten Versuch mit *C. sporogenes* bei 70 °C, die ein deutlich schlechteres Wachstum der Bakterien als in den beiden anderen Versuchen aufzeigten, können nicht auf die Nährmedien für die Anzucht zurück geführt werden, da die Anzucht von *C. perfringens* mit den gleichen Chargen von Nährmedien erfolgte und dort keine Unregelmäßigkeiten auftraten. Eine Veränderung in der Methodik ist ebenso auszuschließen. Auch geben die positiven Kontrollproben keinen Anhaltspunkt auf eine schlechte Vitalität der Bakterienstämme in den betroffenen Chargen (siehe Anhang 10).

Zur Kontrolle der Vitalität der Bakterienmasse wurden pro Tag und Keim jeweils zwei Kontrollproben ohne Temperatureinwirkung untersucht. In zwei Fällen kam es bei diesen Kontrollproben zu keinem Wachstum nach 10 Tagen (siehe Anhang 10). In den betreffenden Versuchen waren an den entsprechenden Versuchstagen die behandelten Proben positiv im Keimwachstum, wodurch von einem intakten Bakterienstamm in den betroffenen Chargen ausgegangen werden kann.

3.4.2 Methoden

3.4.2.1 Anlagenscreening

Das Untersuchungsgebiet für das Anlagenscreening umfasste die drei Bundesländer Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern, da in diesen Bundesländern oft Fälle des viszeralen Botulismus in Zusammenhang mit steigender Biogasanlagenzahl und vermehrter Gärrestausbringung benannt sind (KRÜGER, 2005; BESTE, 2007; PUBANTZ, 2010; ANONYMOUS, 2012; BÖHNEL & GESSLER, 2010; HELLWIG, 2010).

Für die Erhebung wurde ein vierseitiger Fragebogen in Anlehnung an den DBFZ-Fragebogen (2009) erstellt (siehe Anhang 3). Es erfolgte kein gesonderter Pretest, da der Fragebogen nur in einzelnen Bereichen angepasst wurde. Anschreiben (Anhang 1) und Fragebogen (Anhang 2) wurden mit einem frankierten Rückumschlag versandt, um die Rücklaufquote zu erhöhen.

Für die Probenahme wurden insgesamt 16 der 48 Anlagen, die einer Beprobung zugestimmt hatten, ausgewählt. Kosten und zeitlicher Aufwand für Reisen und Beprobung (Transportbedingungen und vor allem Transportzeiten für die Proben) spielten dabei eine wesentliche Rolle.

Neun Isolate aus allen untersuchten Anlagen konnten nach erfolgreicher Isolation nicht mehr reaktiviert und weiter mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Dies lässt Spekulationen über die Clostridienart zu. Es könnte sich um *Clostridium botulinum* gehandelt haben, welche teilweise extrem empfindlich gegenüber Sauerstoffeinfluss sind. Gemäß RODLOFF (2012) handelt es sich bei *C. botulinum* um strikte Anaerobier. Daher können die Verweilzeiten der zu isolierenden Bakterien außerhalb anaerober Verhältnisse während der mikrobiologischen Aufbereitung in Betracht gezogen werden.

Die gewählte Inkubationstemperatur von 37 °C ist für das Wachstum der vegetativen Zellen aller Gruppen von *C. botulinum* optimal (GRITZAI PARKINSON & ITO, 2002; FRANCIOSA et al., 2003). Daher können diesbezüglich keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum festgestellt werden.

Gemäß WYNNE und FOSTER (1948) ist eine Inkubationszeit von maximal drei Tagen für eine beträchtliche Kolonieentwicklung für sämtliche Anaerobier erforderlich. In ihren Untersuchungen konnten sie damit ein gutes Keimwachstum von *C. botulinum*-Kolonien verzeichnen (WYNNE & FOSTER, 1948). Auch RODLOFF (2012) gibt für die Koloniebildung von *C. botulinum* mindestens 48 h an. Daher kann auch bei der in den hier durchgeführten Untersuchungen angewendeten Inkubationszeit von drei Tagen keine Einschränkung für die Wachstumsbedingungen von *C. botulinum* nachvollzogen werden.

Das Nährmedium Leber-Bouillon wurde von Oxoid Deutschland GmbH (Code: CM0077B) bezogen. Als Verwendungshinweis gibt OXOID DEUTSCHLAND GMBH „zum Nachweis saccharolytischer oder Verwesung hervorrufender mesophiler und thermophiler Anaerobier“ an (OXOID DEUTSCHLAND GMBH, 2012). Folglich könnte es sich bei den abgestorbenen Isolatn um proteolytische *C. Botulinum*-Stämme der Gruppe 1 oder Gruppe 4 (siehe Punkt 2.1.2.2) handeln.

Die vegetativen Zellen der unbekannten Clostridienarten der Gruppe 1 oder 4 sind dann durch die Lagerung im Kühlschrank bei Temperaturen unter 10 °C im Wachstum blockiert worden (KRÄMER & PRANGE, 2017) und ggf. abgestorben ohne Sporen zu bilden.

Sechs Clostridien verdächtige Bakterienkolonien aus allen Proben der untersuchten Vergärungsanlagen konnten nicht erfolgreich isoliert werden. Ursächlich dafür waren anhaftende Kolonien anderer Bakterien, die auch nach wiederholter versuchter Trennung nicht ablösbar waren.

3.4.2.2 Hygienisierungsversuche

Um die Sporenbildung anzuregen, wurde die Sauerstoffkonzentration in den Anaerobiertöpfen erhöht, indem diese am vorletzten Inkubationstag kurz geöffnet und wieder luftdicht verschlossen wurden. Am letzten Inkubationstag wurden sie erneut für die

Entfernung der Anaerogen-Beutel geöffnet und anschließend nicht mehr luftdicht verschlossen und bis zur Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur gelagert. Durch die stufenweise Erhöhung des Sauerstoffgehaltes wurden die vegetativen Zellen, die sonst nur unter anaeroben Verhältnissen wachsen, stetig mehr gestresst und viele von ihnen zur Sporulation angeregt und nicht gleich abgetötet. Dadurch ergab sich ein hoher, durchschnittlicher Sporenanteil von 67,2 % für *C. perfringens* bzw. von 81,8 % für *C. sporogenes* an allen Versuchstagen (siehe Anhang 6 und 7).

Die DRCM-Bouillon-Röhrchen wurden nach Abschluss der Temperatureinwirkung mit 1 ml Paraffin überfüllt, um eine anaerobe Atmosphäre zu schaffen.

Die Probenröhrchen, die mit 1 ml Rapsöl gefüllt waren, wurden nach Abschluss des Versuchs zur Temperatureinwirkung mit 10 ml DRCM Bouillon aufgefüllt, wobei das aufsteigende Öl an die Stelle des Paraffins tritt und eine anaerobe Atmosphäre erzeugt.

Der mögliche Bakterienverlust bzw. möglicherweise negative Einfluss durch Sauerstoffkontakt durch die Überführung der Impfösen aus 9 ml Öl in 10 ml DRCM konnte durch die Methodenanpassung in der Reduzierung von 9 ml auf 1 ml Rapsöl ausgeschlossen werden. Wobei aber die Versuchsreihen mit 9 ml Rapsöl keine Unterschiede zu den Ergebnissen der 1 ml-Versuchsreihen aufwiesen. Folglich wurden diese in der Ergebnisauswertung weiterhin berücksichtigt.

Durch den Methodenwechsel in der Verwendung von 1 ml anstelle 9 ml Rapsöl in den Probenröhrchen, kam es bei den Versuchsreihen ab 90 °C zum Verbiegen der Plastik-Impfösen und öfters auch zum Herausragen der Ösenspitze mit Bakterienmasse aus dem Medium. Dieses konnte aber immer erst beim Herausnehmen der Probenröhrchen aus dem Ölbad nach der jeweiligen Verweildauer festgestellt werden. Somit konnte nicht sicher davon ausgegangen werden, dass sich die Bakterienmassen während der gesamten Temperatureinwirkzeit im Medium der Probenröhrchen befanden. Die Vergleichbarkeit mit den übrigen Proben war dadurch nicht mehr gewährleistet. Daher wurden die betreffenden Röhrchen bei den weiteren Untersuchungen und der statistischen Auswertung nicht mehr berücksichtigt.

Da bei der 1. Versuchsreihe mit 70 °C bei *C. perfringens* kein Unterschied im Keimwachstum im Zeitraum von 10 bis 12 Stunden zu verzeichnen und der Aufwand der Versuchsdurchführung enorm war, wurde die zu betrachtende Versuchsdauer auf 10 Stunden reduziert.

In der 90 °C-Versuchsreihe mit *C. perfringens* verdeutlichte sich, dass im öligen Medium eine schwächere Reduktion des Keimwachstums als im wässrigen Medium vorliegt (siehe Abbildung 18). Laut MARGOSCH et al. (2004) und RAJU & SARKER (2005) beeinflusst die Zusammensetzung des Mediums, in dem Sporen einer Wärmezufuhr ausgesetzt werden, die Hitzetoleranz der Sporen. Dies belegen auch Untersuchungen bezüglich pH-Wert (ITO et al., 1978) und a_w -Wert (MURREL & SCOTT, 1966; ALDERTON et al. 1980); je höher der a_w -Wert eines Mediums ist, desto geringer ist die Hitzeresistenz der Sporen. Im 90 °C-Versuch mit *C. sporogenes* konnte kein derartiger Unterschied zwischen den Medien verzeichnet werden.

In den Versuchsreihen unter 100 °C wurden ölige (Rapsöl) und wässrige Medien (DRCM-Bouillon) parallel eingesetzt, um den Einfluss dieser Medien auf die Bakterien vergleichen zu können. Da das ölige Medium bei Temperaturen über und unter 100 °C eingesetzt werden konnte, wurden auch vergleichbare Bedingungen zwischen allen untersuchten Temperaturen geschaffen. Da wässrige Lösungen bei Temperaturen über 100°C verdunsten, wurde ab dieser Temperatur ausschließlich Rapsöl als Testmedium gewählt.

3.4.3 Untersuchungsergebnisse

3.4.3.1 Anlagenscreening

Bei der Befragung ergab sich zwar eine geringe Rücklaufquote von 19%, aber die gelieferten Informationen waren hinreichend gut, um eine ausgewogene Auswahl der Anlagentypen für die nachfolgende Beprobung treffen zu können.

In der Gärrestprobe der ersten untersuchten Vergärungsanlage wurde neben mehreren unbekannten Erregern auch ein Typ A-Stamm von *C. perfringens* mit einem α -Toxinbildungsvermögen von bis zu 64 Naglereinheiten (NE) pro ml Rohtoxin festgestellt (RIPAC-Schreiben, 23.03.2012). In der Gärrestprobe der Vergärungsanlage 2 und in der Maissilageprobe der Anlage 4 wurde ebenfalls *C. perfringens* isoliert. Da es keine gesonderten Toxinbestimmungen dazu gab, kann keine Aussage zur Toxizität der isolierten Stämme in Vergärungsanlage 2 und 4 gemacht werden.

Auch in untersuchten Proben aus Inputsubstraten und Gärresten von niedersächsischen landwirtschaftlichen Biogasanlagen, in denen unter anderem Rindergülle oder Schweinegülle eingesetzt wird, hat BREVES (2011) *C. perfringens* vom Typ A-Stamm mit einem α -Toxinbildungsvermögen von bis zu 64 Naglereinheiten (NE) pro ml Rohtoxin mit Unterstützung der RIPAC-LABOR GmbH identifiziert. Stämme vom Typ A sind die

Haupterreger der Clostridienmyositis (Gasbrand) (SCHAUMANN & RODLOFF, 2009; RODLOFF, 2012).

Die untersuchten Isolate aus den Vergärungsanlagen konnten nicht immer vollumfänglich von der RIPAC-LABOR GmbH identifiziert werden. Die unbekannten Erreger der ersten Vergärungsanlage wurden nicht näher untersucht und erhielten keine gesonderte RIPAC-Bezeichnung. Daher können keine weiteren Rückschlüsse auf deren Identität gezogen werden. Die unbekannten Isolate der Vergärungsanlagen 2 bis 16 wurden in den Ergebnisberichten der RIPAC-LABOR GmbH zur MALDI-TOF-MS-Analyse mit „neu in SARAMIS“ ausgewiesen (RIPAC-Ergebnisbericht, 04.09.2012). In der beigefügten Erläuterung gab die RIPAC-LABOR GmbH an: „[...] , dass dieses Muster des MALDI-TOF Massenspektrums noch nicht in der SARAMIS Datenbank hinterlegt ist. Somit können ebenso die bekannten Spezies, welche ausreichend hinterlegt sind, ausgeschlossen werden. Es konnten somit [...] eindeutige Subgruppen identifiziert werden, welche in unserer SARAMIS Datenbank als unbekannt vorliegen. Diese entsprechen nach den derzeitigen Erkenntnissen [...] unterschiedlichen Spezies. Laut Färbung nach Gram, Katalasetest und aerober Kontrolle handelt es sich vermutlich um Clostridien.“ (RIPAC-Ergebnisbericht, 04.09.2012). Nach erfolgter Sequenzierung durch die RIPAC-LABOR GmbH verbleiben die nachfolgend aufgeführten Isolate als unbekannte neue Spezies (RIPAC-Ergebnisbericht, 05.03.2013 und 09.04.2013):

- D11-0088-1-1-16 (99,9% Clostridium, Isolat wurde sequenziert)
- D12-1005-78-1-1 (99,9% Clostridium, Isolat wurde sequenziert)
- D12-1413-1-1-3 (99,9% Clostridium, Isolat wurde sequenziert)
- D13-0204-31-1-1 (99,9% Clostridium, Isolat wurde sequenziert)
- D13-0204-45-1-1 (99,9% Clostridium, Isolat wurde sequenziert)
- D13-0204-100-1-1 (99,9% Clostridium, Isolat wurde sequenziert)

Isolat D11-0088-1-1-16 konnte später als *Clostridium tepidum* identifiziert werden (DOBRITSA et al., 2017, KÖHLER, 2018). *C. tepidum* wird laut TRBA 466 (2019) noch in Risikogruppe 1 eingestuft, aber die DSMZ (2019g) gibt im zugehörigen Datenblatt bereits Risikogruppe 2 an. Daher ist eine Pathogenität bei diesem Keim nicht mehr auszuschließen.

Clostridium tertium wurde außerdem in der ersten untersuchten Vergärungsanlage in der Maissilage identifiziert. Es wird von der DSMZ nach TRBA 466 (2019) in Risikogruppe 2 mit Hinweis „ht“ (pathogen für Menschen und Wirbeltiere, aber i.d.R. keine Übertragung zwischen diesen Wirtsgruppen) eingestuft (DSMZ, 2019a).

C. xylanolyticum wurde in zwei der untersuchten Vergärungsanlagen aus Maissilage und flüssigem Gärrest isoliert. Es erscheint nicht in der Darstellung zur phylogenetischen Verwandtschaft der pathogenen Clostridien nach LYRAS & ROOD (2006). Ebenso gibt die DSMZ keine Hinweise auf Restriktionen im Umgang mit diesem Keim (DSMZ, 2019b; TRBA 466, 2019). Folglich kann *C. xylanolyticum* als nicht pathogen und somit irrelevant für die Betrachtungen im Rahmen dieser Dissertation angesehen werden.

Clostridium baratii wurde in einer Gärrestprobe einer NaWaRo-Vergärungsanlage isoliert. Die DSMZ stuft *C. baratii* anhand der TRBA 466 (2019) in Risikogruppe 2 mit dem besonderen Hinweis „Z“ ein, da es sich hierbei um einen Zoonoseerreger handelt (DSMZ, 2019c). Laut POULAIN & POPOFF (2019) produziert *C. baratii* das Botulinum-Neurotoxin Typ F7. Zoonosen umfassen sämtliche Krankheiten und/oder sämtliche Infektionen, mit denen sich Tiere und Menschen natürlicherweise (in)direkt gegenseitig anstecken können (TRBA 466, 2019).

Clostridium cochlearium konnte in fünf mesophil betriebenen Vergärungsanlagen in Rinderfestmist, mehrfach in Kleeegrassilage, im Fermenter und im flüssigen Gärrest isoliert werden. *C. cochlearium* wurde laut TRBA 466 (2019): “[...] [in] Einzelfällen als Krankheitserreger nachgewiesen oder vermutet, überwiegend bei erheblich abwehrgehinderten Menschen[...]“. Es besteht eine nahe Verwandtschaft zu *Clostridium tetani* (NAKAMURA, 1979).

Die isolierten *Clostridium glycolicum*- Stämme in Vergärungsanlage 3, 4 und 6 bis 10 wurden vermehrt in Fermenterproben, aber auch im In- und vereinzelt im Output isoliert. In Vergärungsanlage 4 wurde *C. glycolicum* sogar im Probenmaterial des thermophil betriebenen Fermenters identifiziert. Von GERRITSEN et al. (2014) wurde dieser Clostridienstamm ein Jahr nach Abschluss der Untersuchungen zum *Terrisporobacter glycolicus* in der Familie der *Peptostreptococcaceae* reklassifiziert. Dieser wird aber weiterhin von der DSMZ (2019d) in Risikogruppe 2 nach TRBA 466 (2019) eingestuft. Da es sich nun nicht mehr um einen pathogenen Clostridienstamm handelt, wird dieser im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter betrachtet.

Clostridium tyrobutyricum wurde im Input von Vergärungsanlage 3 (Zuckerrübenmus) und 13 (Schweinegülle) identifiziert. Gemäß DSMZ (2019e) ist *C. tyrobutyricum* nicht als pathogen eingestuft. Daher wird der Keim im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter betrachtet.

Clostridium aminovalericum wurde in drei Vergärungsanlagen (3, 5, 6) im Input (Zuckerrübenmus, Kleeegrassilage) und im Fermenter gefunden. Im Zuge der Literaturrecherche konnte ermittelt werden, dass nach ein paar Jahren nach Abschluss der Untersuchungen *Clostridium aminovalericum* durch DNS-Analysen von UEKI et al.

(2016) der Familie der *Anaerocolumnae* zugeschrieben werden konnte und folglich in *Anaerocolumna aminovalerica* umbenannt wurde. Da es sich nun um keinen Keim der Familie *Clostridiaceae* handelt, wird dieser in der vorliegenden Dissertation nicht weiter betrachtet.

Clostridium cadaveris wurde in zwei mesophil betriebenen Vergärungsanlagen (3, 6) im Fermenter und im Gärrest entdeckt. Die DSMZ (2019f) stuft den Keim in Risikogruppe 2 nach TRBA 466 (2019) ein. *C. cadaveris* kommt gewöhnlich im Gastrointestinaltrakt von Menschen und anderen Säugetieren vor und kann trotzdem Infektionen, wie zum Beispiel Bakteriämie (Bakterien im Blut des Patienten; PFAFF, 2016), hervorrufen (WILLIS, 1977). Diese Clostridien Spezies produziert kein Toxin und gehört zu den Mikroben, die verantwortlich für die Gasproduktion während der menschlichen Verwesung sind (KLEIN, 1899).

Clostridium sordellii wurde lediglich in einer Inputprobe (Mais-Hirse-Silage) der fünften Vergärungsanlage identifiziert. *Clostridium bifermentans* und *Clostridium sordellii* sind laut NISIDA et al. (1964) und BROOKS et al. (1969) phylogenetisch eng miteinander verwandt. Jedoch zeigen jüngste phylogenetische Analysen, dass die 16S-rRNA-Gensequenz der Typen-Stämme von *C. bifermentans*, *C. ghonii* und *C. sordellii* außerhalb der Gruppe I der Gattung Clostridium im engeren Sinne gruppiert werden müssen (SASI JYOTHSNA et al., 2016). Darüber hinaus beträgt der ANI-Wert (Maß für genetische Ähnlichkeit auf Nucleotid-Ebene zwischen den kodierenden Regionen zweier Genome) zwischen *C. bifermentans* ATCC 638T und *C. sordellii* ATCC 9714T lediglich 82.6 %, welcher die Schaffung neuer Gattungen unterstützt (SASI JYOTHSNA et al., 2016). 2016 wurde *Clostridium sordellii* von SASI JYOTHSNA et al. aufgrund der weiterführenden phylogenetischen, biochemischen und chemotaxonomischen Analysen schließlich der Gattung Paeniclostridia (lat. paene = fast) zugeordnet und in *Paeniclostridium sordellii* umbenannt. Nach TRBA 466 (2019) wird *Paeniclostridium sordellii* weiterhin in Risikogruppe 2 mit Hinweis „ht“ (pathogen für Menschen und Wirbeltiere, aber i.d.R. keine Übertragung zwischen diesen Wirtsgruppen) eingestuft.

Clostridium bifermentans wurde in den Vergärungsanlagen 6 bis 9, sowie in 12, 14 und 16 vorrangig in Fermenterproben, aber auch in Inputsubstraten (Maissilage und Rindergülle) sowie in flüssigen Gärresten identifiziert. Bei der zwölften Vergärungsanlage handelt es sich um eine Vergärungsanlage für organische Abfälle, die mesophil mit einer Hygienisierungseinheit (5 Behälter; 75 °C für 1 h) betrieben wird. Es werden hauptsächlich Flotate (70 %), Magen- und Darminhalte aus Schlachtbetrieben sowie überalterte Lebensmittel (Material der Kategorie 3) vergoren. *Clostridium bifermentans* wurde hier in den Fermentern 2 und 3 sowie im Gärrest nachgewiesen. Wie vorhergehend

ausgeführt, wurde auch *Clostridium bifermentans* aufgrund phylogenetischer, biochemischer und chemotaxonomischer Kriterien der neuen Gattung *Paraclostridia* (para (griech.) = neben) zugeordnet und in *Paraclostridium bifermentans* umbenannt (SASI JYOTHSNA et al., 2016). Obwohl der Typen-Stamm von *Clostridium bifermentans* ATCC 638T als nicht pathogen eingestuft ist, gibt es viele Forscher, die den Keim als pathogen einstufen (WONG et al., 2014). Auch KUTSUNA et al. (2018) konnten mit ihren Ergebnissen zeigen, dass *Paraclostridium bifermentans* eine akute Verschlechterung einer Kolitis hervorrufen kann. Nach TRBA 466 (2019) wird *Paraclostridium bifermentans* weiterhin in Risikogruppe 2 mit Hinweis „ht“ (pathogen für Menschen und Wirbeltiere, aber i.d.R. keine Übertragung zwischen diesen Wirtsgruppen) eingestuft.

Clostridium paraputrificum wurde lediglich in der unhygienisierten Probe aus dem Vorgärer der 12. Vergärungsanlage identifiziert. Nach TRBA 466 (2019) wird der Keim der Risikogruppe 2 zugeschrieben.

Clostridium limosum wurde in der Fermenterprobe der 15. Vergärungsanlage (Bioabfall und Material Kategorie 3) bestimmt. LAWSON und RAINEY (2016) haben aufgrund 16S rRNA Genanalysen *C. limosum* der neuen Gattung *Hathewayae* (Namensauswahl zur Ehrung des amerikanischen Mikrobiologen Charles L. Hatheway für seine Forschung an pathogenen Clostridien) zuordnen können. Nach TRBA 466 (2019) wird auch *Hathewayae limosa* in Risikogruppe 2 mit Hinweis „ht“ (pathogen für Menschen und Wirbeltiere, aber i.d.R. keine Übertragung zwischen diesen Wirtsgruppen) eingestuft.

Clostridium sporogenes wurde sehr häufig in den Proben fast aller untersuchten Vergärungsanlagen identifiziert. Dies bestätigt das ubiquitäre Vorkommen nach NAKAMURA (1977). Nach TRBA 466 (2019) wird der Keim der Risikogruppe 2 zugeordnet. Erfolgreiche horizontale Botulinum-Neurotoxin-Gentransfers zwischen den Stämmen von Gruppe 1 von *C. botulinum* und *C. sporogenes* unterstreichen ihre nahe genetische Verwandtschaft (NAWROCKI ET AL., 2018). Hierdurch ergäbe sich im Falle von Anwesenheit von *C. botulinum* ein möglicher Übergang des Botulinum-Neurotoxin-Gens mittels Plasmid auf *Clostridium sporogenes* (NAWROCKI ET AL., 2018), welcher im Nachgang auch zur Bildung von Toxin befähigt ist. Dies ist, im Hinblick auf die in den hier durchgeführten Untersuchungen sehr häufig bestimmten *Clostridium sporogenes*-Isolate, besorgniserregend.

Alle befragten Anlagenbetreiber gaben in den ausgewerteten Fragebögen an, dass es keine Probleme mit pathogenen Clostridien in deren Anlagen gäbe. Jedoch zeigen die Untersuchungen, dass viele Clostridienarten mit pathogenem Hintergrund in den Anlagenproben (Input, Fermenter und Output) gefunden wurden.

3.4.3.2 Hygienisierungsversuche

Die 70 °C Versuche zeigten keinen negativen Einfluss auf das Auskeimen der Sporen von *C. perfringens*. Hier wurde immer 100 % Keimwachstum verzeichnet. In diversen Publikationen werden die vegetativen Zellen bei 75 °C nach 20 Minuten abgetötet, um allein die Sporen für die weiteren Untersuchungen betrachten zu können (WEISS & STRONG, 1967; ANDO et al., 1985; PAREDES-SABJA et al., 2008). Die vorgeschriebene Pasteurisierung bei 70 °C für eine Stunde (TIERNEBV, 2018) reicht folglich nicht für die Inaktivierung der Sporen von *C. perfringens* aus. Beim Herausnehmen der Probenröhrchen aus dem Ölbad konnte festgestellt werden, dass die Impfösen-Schlaufen mit der Bakterienmasse nicht in allen Probenröhrchen im Medium verblieben waren, weil sich die Plastik-Impfösen infolge der Temperatureinwirkung verbogen hatten (siehe Tabelle 8-13). Es wurden nicht alle Probenröhrchen bei der statistischen Analyse berücksichtigt.

Bei den 90 °C-Versuchen konnten für *C. perfringens* Unterschiede in der Auskeimung in den verschiedenen Medien festgestellt werden, wobei im öligen Medium eine schwächere Reduktion des Keimwachstums als im wässrigen Medium vorlag. ANDO et al. (1985) verzeichneten für *C. perfringens* erst ab 95 °C ein Absterben der Sporen, wobei diese aber zuvor hitzeaktiviert (75 °C für 20 Minuten) wurden. Erst in den 100 °C-Versuchen sprachen die Sporen des untersuchten *C. perfringens*-Stamms auf die Temperatureinwirkung mit einer deutlich reduzierten Auskeimung an. WEISS & STRONG (1967) gaben an, dass Sporen von *C. perfringens* bereits unterhalb einer Stunde bei 100 °C abgetötet werden. Diese Aussage konnte mit den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Aus den Versuchen von WANG et al. (2012), bei denen die Sporen in einem wässrigen Medium hitzebehandelt wurden, geht hervor, dass nach einer Behandlung von 100 °C für 10 bis 20 Minuten 97 bis 99 % der Sporen, mit einer Behandlung von 100 °C für 30 Minuten über 99 % der Sporen inaktiviert werden. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche bei 100 °C haben aufgrund der zu erwartenden erheblichen Verdampfungen des flüssigen Mediums bei langen Verweilzeiten in einem öligen Medium stattgefunden. Auch schon bei den 90 °C-Versuchen ist aufgefallen, dass die Sporen von *C. perfringens* im öligen Medium resistenter gegenüber der Temperatureinwirkung als im wässrigen Medium waren. Daraus kann gefolgert werden, dass die Anwesenheit von Lipiden im umgebenden Medium einen positiven Effekt auf die Hitzeresistenz der Sporen von *C. perfringens* haben kann. Eine Temperatur von 100 °C ist besser geeignet, das Keimwachstum von *Clostridium perfringens* bei längeren Verweildauern zu reduzieren. Eine gänzliche Verhinderung des Auskeimens ist aber auch nicht mit 100 °C nach 10 Stunden möglich.

Schließlich konnte nach einer Stunde bei 121 °C das Ausbleiben der Auskeimung festgestellt werden. Auch die Versuche mit 134 °C zeigten die Inaktivierung der Sporen von *C. perfringens* deutlich. Generell werden diese Temperaturbereiche unter zusätzlichem Einfluss von Druck und Wasserdampf zur Desinfektion angewendet, die sogenannte Drucksterilisation (133 °C, 2 bar, 20 min, Kantenlänge max. 50 mm) (V 142/2011/EG, V 1069/2009/EG).

Auch die Sporen von *C. sporogenes* zeigten über 10 Stunden keine negative Einwirkung bei den Versuchen mit 70 °C und keimten in 100 % der Proben aus. Auch dieser Keim kann mittels Pasteurisierung (70 °C für 1 h) nach TierNebV (2018) nicht inaktiviert werden. Die 90 °C-Versuche zeigten ebenfalls deutlich, dass die Sporen von *C. sporogenes* nicht negativ beeinflusst werden und anschließend zu 100 % auskeimten. Hierbei ergaben sich überhaupt keine Unterschiede zwischen dem wässrigen und öligen Medium. Die 100 °C-Versuche zeigten auf die Sporen von *C. sporogenes* ebenfalls keinen negativen Effekt, da auch hiernach 100 % der Proben nach 10 Stunden Einwirkdauer auskeimten. Erst Temperaturen von 121 °C zeigten nach drei bis vier Stunden und Temperaturen von 134 °C zeigten bereits nach einer Stunde kein Keimwachstum mehr. DIAO et al. (2014) konnten in ihren Versuchen mit *C. sporogenes* ebenfalls feststellen, dass die Sporen einer Klade von *C. sporogenes*, die besonders hitzeresistent ist, Temperaturen zwischen 117 °C und 121 °C überleben können, wobei die einer anderen Klade, die hitzesensitiver ist, bereits nach fünf Minuten bei 105 °C absterben.

Die Hitzeaktivierung von Sporen (70 °C für 20 min bzw. 75 °C für 20min) wird in diversen Publikationen behandelt (Keynan et al., 1964; WEISS & STRONG, 1967; GIBBS und HIRSCH, 1956; ANDO et al., 1985, WANG et al., 2011) und ist ein etabliertes Vorgehen zur Anregung der Auskeimung von Sporen (DE JONG et al., 2004; SCHNEIDER, 2007; DIAO et al. 2014; PAREDES-SABJA et al., 2008; WANG et al., 2012). Auch wenn die hier vorliegenden Untersuchungen ohne vorhergehende Hitzeaktivierung der Sporen durchgeführt wurden, spiegeln die Ergebnisse wider, dass die vorgeschriebene Pasteurisierung nicht ausreichend für eine Inaktivierung der Sporen von *C. perfringens* und *C. sporogenes* ist. Vielmehr werden die Sporen durch die Pasteurisierung zur Auskeimung angeregt. Zudem bedingt bei JUNEJA et al. (2003) und WANG et al. (2011) eine Hitzebehandlung von *C. perfringens* und *C. sporogenes* (BUTLER et al., 2017) eine signifikant höhere Hitzeresistenz der Sporen bei 100 °C.

4 Schlussfolgerungen

Das Anlagenscreening der untersuchten Vergärungsanlagen zeigte auf, dass unabhängig von der Betriebsart und –temperatur pathogene Clostridien, wie *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. cadaveris*, *C. tertium*, *C. baratii*, *C. cochlearium*, *C. tepidum* und *C. paraputrificum*, sowohl in Input-, Fermenter- als auch in Gärrestproben identifiziert werden konnten. Aber es wurden auch apathogene Clostridien, wie *C. xylanolyticum* und *C. tyrobutyricum* isoliert und fünf unbekannte neue Spezies, deren Pathogenität unklar ist. Aus allen Proben der untersuchten Vergärungsanlagen konnten sechs clostridienverdächtige Bakterienkolonien nicht erfolgreich isoliert werden. Neun Isolate aus allen untersuchten Anlagen konnten nach erfolgreicher Isolation nicht mehr reaktiviert und weiter mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Darüber hinaus wurden einige der als pathogen eingestuft isolierten Clostridienstämme von Forschern später anderen Familien und Gattungen zugeordnet, wodurch *C. glycolicum* (*Terrisporobacter glycolicus*), *C. aminovalericum* (*Anaerocolumna aminovalerica*), *C. sordellii* (*Paeniclostridium sordellii*), *C. bifermentans* (*Paraclostridium bifermentans*) und *C. limosum* (*Hathewayia limosa*) nicht mehr relevant für die Betrachtungen im Rahmen dieser Dissertation sind. *Clostridium botulinum* wurde nicht unter den Isolaten bestimmt. Hingegen wurde sein sehr naher Verwandter *Clostridium sporogenes* in fast allen untersuchten Vergärungsanlagen identifiziert.

Obwohl mit der Clusteranalyse keine Rückschlüsse auf Verwandtschaften der isolierten Clostridienspezies getroffen werden können, ist der Nachweis der Keime in fast allen Stufen der untersuchten Vergärungsanlagen ein Indiz dafür, dass die pathogenen Clostridien den gesamten Vergärungsprozess durchlaufen und bei der nachfolgenden Gärrestausbringung verschleppt werden können.

Die Hygienisierungsversuche haben gezeigt, dass der verwendete Stamm von *C. sporogenes* viel resistenter gegenüber hohen Temperaturen als der ebenfalls untersuchte Stamm von *C. perfringens* ist. Die Sporen beider pathogenen Clostridienstämme überleben die standardmäßige Hygienisierungstemperatur von 70 °C über mindestens zehn Stunden. Somit garantiert die bislang vorgeschriebene Pasteurisierung von organischem Abfall in Biogasanlagen auf 70 °C über eine Stunde nicht die vollständige Hygienisierung des Input-Materials und kann sogar zur Hitzeaktivierung der Sporen führen. Diese Hitzeaktivierung kann ein vermehrtes Wachstum pathogener Clostridien während des Fermentationsprozesses begünstigen. Eine Positionierung der Pasteurisierungseinheit im Nachgang des Fermentationsprozesses wäre denkbar, aber aufgrund der hohen Durchsatzmengen unwirtschaftlich. Zudem garantiert die

nachgeordnete Pasteurisierung weiterhin nicht die Inaktivierung der Sporen der pathogenen Clostridien.

Die Hygienisierungsversuche haben zudem gezeigt, dass durchschnittlich 32,5 % der mit *C. perfringens*-Sporen befüllten Proben und 96,7 % der mit *C. sporogenes*-Sporen befüllten Proben Erhitzen auf 100 °C über zehn Stunden überleben. Nach einer Stunde bei 121 °C unter normalem atmosphärischem Druck konnte bei den Sporen von *C. perfringens* kein Keimwachstum mehr registriert werden, während die Sporen von *C. sporogenes* erst nach drei Stunden bei 134°C unter normalem atmosphärischem Druck nicht mehr auskeimten. Standardisierte Hygienisierungssysteme für diese hohen Temperaturbereiche arbeiten zusätzlich mit hohen Drücken und Wasserdampf zur Effektivitätssteigerung. Deren Anwendung ist für Hoch-Risiko-Material (TIERNEBV 2018) bereits vorgeschrieben und wäre auch für organische Abfälle nach BIOABFV und TIERNEBV denkbar.

Um wirksam Sporen pathogener Clostridien zu inaktivieren, müssen die gesetzlichen Vorgaben für die Hygienisierung bezüglich Sporen überdacht werden. Hierbei sollten Indikatorkeime, wie *C. perfringens*, *C. sporogenes* und *C. botulinum*, herangezogen werden, um Inputmaterialien für Biogasanlagen bewerten und daraus die erforderliche Hygienisierungsmaßnahme ableiten zu können.

Es sollten zusätzlich Grenzwerte für das Vorhandensein von pathogenen *Clostridien sp.* im Gärrest festgelegt werden, wenn dieser auf Flächen zur Futtergewinnung ausgebracht werden soll. Zusätzlich müsste die Anwendung von nicht untersuchten oder Grenzwert überschreitenden Gärresten auf Flächen zur Futtergewinnung (Grünfutter/Silage/Heu) verboten werden. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die offenen Fragen (Höhe der anzusetzenden Grenzwerte, die Auswahl der Indikatorkeime und die Kontrollverfahren) zu klären. Das Thema Gärrest(aus)wirkung wird aufgrund der Anzahl und Dichte von Biogasanlagen und der verwendeten Inputmaterialien aktuell bleiben und bedarf weiterer Forschung.

5 Literaturverzeichnis

ALDERTON, G.; Chen, J.K.; Ito, K.A. **(1980):** Heat Resistance of the Chemical Resistance Forms of *Clostridium botulinum* 62A Spores over the Water Activity Range 0 to 0,9, *Applied and Environmental Microbiology*, September 1980, Ausgabe 40(3), Seite: 511-515, (zitiert aus PREISING, 2006) url: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291614/> (13.09.2019)

ANDO, Y.; TSUZUKI, T.; SUNAGAWA, H.; OKA, S. **(1985):** "Heat resistance, spore germination, and enterotoxigenicity of *Clostridium perfringens*", *Microbiology and immunology*, 29(4), S. 317-326. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/mandi1977/29/4/29_4_317/_pdf (17.02.2013)

ANONYMOUS (2000): „Gastroenteritis – Ausbruch durch *Clostridium perfringens*“, *Epidemiologisches Bulletin*, Robert Koch Institut, (41) 2000; ULR: http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/re4mThxdAoes/PDF/25DH34zHs21l.pdf (15.05.2013)

ANONYMOUS (2012): Dem Botulismus auf der Spur, in *Elite – Magazin für Milcherzeuger*, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, 25.05.2012

BARKER, G. C.; MALAKAR, P. K.; PECK, M. W. **(2005):** "Germination and growth from spores: variability and uncertainty in the assessment of food borne hazards", *International journal of food microbiology*, 100(1), 67-76. Zitiert aus: WANG et al (2012)

BESTE A. (2007): Böden leiden unter Biogas, in: *Unabhängige Bauernstimme*, S. 17, Ausgabe 6, June 2007.

BIOABFV (2017): Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung - BioAbfV), Ausfertigungsdatum: 21.09.1998, zuletzt geändert: 27.09.2017 (BGBl. I S. 3465), 2017, Berlin

BMEL (2010): Zugelassene und registrierte Betriebe für tierische Nebenprodukte gemäß Artikel 10 bis 15 der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002; Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) URL: https://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/TierischeNebenprodukte/nebenprodukte_node.html (19.01.2012)

BOLL, C. (2011). Chronischer Botulismus – Tod aus der Biogasanlage, WILD UND HUND, Ausgabe 10/2011, Paul Parey Zeitschriftenverlag GmbH, Singhofen, 6.5.2011

BÖHNEL, H., GESSLER, F. (2010): Botulinumtoxikosen – Infektionsrisiko für Mensch und Tier, Nutztierpraxis aktuell, Forum der Agrar- und Veterinär-Akademie, Ausgabe 33, S. 14-18, Juni 2010

BREVES, G. (2011): Untersuchungen zum mikrobiologischen Risikopotenzial von Gärsubstraten und Gärresten aus niedersächsischen Biogasanlagen, Vortrag beim Symposium „Biogas und Botulismus“, Hannover, 30.11.2011 <https://www.ml.niedersachsen.de/startseite/aktuelles/pressemitteilungen/100981.html> (Pressemitteilung), URL: <https://www.ml.niedersachsen.de/download/92290> (13.09.2019)

BROOKS, J. B., Moss, C. W. & Dowell, V. R. (1969): Differentiation between *Clostridium sordellii* and *Clostridium bifermentans* by gas chromatography. J Bacteriol 100, 528–530. (zitiert aus SASI JYOTHSNA et al. 2016)

BROWN, J. L., Tran-Dinh, N., and Chapman, B. (2012): *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. J. Food Prot. 75, 779–792 (zitiert aus BUTLER et al., 2017)

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. (2002): “*Clostridium perfringens* and foodborne infections”. International Journal of Food Microbiology, 74(3), 195-202; URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501006808> (16.08.2013)

BULL, M. K., OLIVIER, S. A., VAN DIEPENBEEK, R. J., KORMELINK, F., CHAPMAN, B. (2009): Synergistic inactivation of spores of proteolytic *Clostridium botulinum* strains by high pressure and heat is strain and product dependent. Appl. Environ. Microbiol. 75, 434–445. (zitiert aus BUTLER et al., 2017)

BUTLER, R.R., 3rd; SCHILL, K.M.; WANG, Y.; POMBERT, J.F. (2017): Genetic Characterization of the Exceptionally High Heat Resistance of the Non-toxic Surrogate *Clostridium sporogenes* PA 3679. Front. Microbiol. 2017, 8, 545 (zitiert aus: POULAIN & POPOFF, 2019)

BYUN, B. Y.; CHO, H. Y.; HWANG, H. J; MAH, J. H.; LIU, Y.; TANG, J.; KANG, D. H. (2011): "Optimization and evaluation of heat-shock condition for spore enumeration being used in thermal-process verification: Differential responses of spores and vegetative cells of *Clostridium sporogenes* to heat shock". Food Science and Biotechnology, 20(3), 751-757. URL:<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10068-011-0105-7.pdf> (17.02.2013)

CAYA, J.G., AGNI, R., MILLER, J.E. (2004): *Clostridium botulinum* and the clinical laboratorian - A detailed review of botulism, including biological warfare ramifications of botulinum toxin. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 128, S. 653-662, 2004

CDC (1998): Botulism in the United States, 1899-1996, Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., 1998

CHEN, D.; HUANG, S. S.; LI, Y. Q. (2006): "Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single *Bacillus* spores by laser tweezers Raman spectroscopy". Analytical chemistry, 78(19), 6936-6941. Zitiert aus: WANG et al (2012)

COLLINS, M.D.; LAWSON, P.A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J.J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J.A.E. (1994): The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations", International Journal of Systematic Bacteriology, International Union of Microbiological Societies, Ausgabe 44, Nummer 4, Seite 812-826, Oktober 1994

COLLINS, M.D., East, A.K., (1998): Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins, Journal of Applied Microbiology 84, S. 5-17, 1998

CYPIONKA, H. (2006): Grundlagen der Mikrobiologie, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-24084-5, 2006

DESTATIS (2018): Umwelt Abfallbilanz 2017, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 09.07.2019, url: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Umwelt/Abfallwirtschaft/Publikationen/Downloads-Abfallwirtschaft/abfallbilanz-pdf-5321001.pdf?__blob=publicationFile (letzter Zugriff: 01.09.2019)

DIAO, M. M., ANDRÉ, S., MEMBRÉ, J.-M. (2014): Meta-analysis of Dvalues of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 23–30 (zitiert aus BUTLER et al., 2017)

DROUIN, P.; LAFRENIÈRE, C. (2012): Clostridial spores in animal feeds and milk. In *Milk Production*; Chaiyabutr, N., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2012. (zitiert aus: POULAIN & POPOFF, 2019)

DSMZ (2013): Produktinformation des Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, URL: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/dsm-756.html>, abgerufen am 21.08.2013

DSMZ (2019a): Datenblatt für *Clostridium tertium*, url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-2485>, abgerufen am 20.09.2019

DSMZ (2019b): Datenblatt für *Clostridium xylanolyticum*, url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-6555>, abgerufen am 20.09.2019

DSMZ (2019c): Datenblatt für *Clostridium baratii*, url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-601>, abgerufen am 20.09.2019

DSMZ (2019d): Datenblatt für *Terrisporobacter glycolicus* (vormals *Clostridium glycolicum*), url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1288>, abgerufen am 20.09.2019

DSMZ (2019e): Datenblatt für *Clostridium tyrobutyricum*, url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-2637>, abgerufen am 20.09.2019

DSMZ (2019f): Datenblatt für *Clostridium cadaveris*, url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1284>, abgerufen am 20.09.2019

DSMZ (2019g): Datenblatt für *Clostridium tepidum* (RIPAC-Bezeichnung: D11-0088-1-1-16, url: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-104389>, abgerufen am 21.09.2019

Duncan, C. L.; Strong, D. H. (1968): "Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*", Applied microbiology, 16(1), 82-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547317/pdf/applmicro00237-0104.pdf> (17.02.2013)

DüMV (2012): Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV), Ausfertigungsdatum: 05.12.2012 (BGBl. I S. 2482), Berlin, 2012.

DüV (2017): Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV), Ausfertigungsdatum: 26.05.2017 (BGBl. I, S. 1305), Berlin, 2017

FAL (2007): Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Vorkommen von *Clostridium botulinum* in Substraten und Gärrückständen von Biogasanlagen, Abschlussbericht, Institut für Technologie und Biosystemtechnik und Institut für Agrarökologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Braunschweig, Juni 2007

FNR (2016): Leitfaden Biogas – von der Gewinnung zur Nutzung, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 7., überarbeitete Auflage, 2016, ISBN 3-00-014333-5, Gülzow

FRANCIOSA, G.; Aureli, P.; SCHECHTER, R. (2003): "*Clostridium botulinum*" in International Handbook of Foodborne Pathogenes; Herausgeber: Miliotis, M.D.; Bier, J.W. (Marcel Dekker, Inc.); Seite: 61-90; New York, Basel, 2003

GALEY, F.D., (2001): Botulism in the horse, Veterinary Clinics of North America-Equine Practice 17, S. 579-+, 2001

GERHARDT, P.; MARQUIS, R.E. (1989): "Spore thermoresistance mechanisms", In: SMITH, I.; SLEPECKY, R.A.; SETLOW, P.: "Regulation of Prokaryotic Development" ed. American Society for Microbiology, Washington DC, USA Zitiert aus: WANG et al (2012)

GERRITSEN, J., Fuentes, S., Grievink, W., van Niftrik, L., Tindall, B. J., Timmerman, H. M., Rijkers, G. T., Smidt, H. (2014): Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov.; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Ausgabe 64 (Pt5), Seite 1600-1616, URL: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/64/5/1600_ijs059543.pdf?expires=1569003143&id=id&accname=guest&checksum=3366AA6693AFBA53560C4A82E3EC0B73, abgerufen am 20.09.2019

GIBBS, B.M.; HIRSCH, A. (1956): „Spore formation by *Clostridium perfringens* (welchii) in four laboratory media“, J. Appl. Bacteriol. 29: 308-318; Zitiert aus: DUNCAN et STRONG (1968

GHOSH, S.; SETLOW, P. (2009): "Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species", Journal of bacteriology, 191(6), 1787-1797. Zitiert aus: WANG et al (2012)

GHOSH, S.; RAMIREZ-PERALTA, A.; GAIDAMAKOVA, E.; ZHANG, P.; LI, Y. Q.; DALY, M. J.; SETLOW, P. (2011): "Effects of Mn levels on resistance of *Bacillus megaterium* spores to heat, radiation and hydrogen peroxide", Journal of applied microbiology, 111(3), 663-670. Zitiert aus: WANG et al (2012)

GRITZAI PARKINSON, N., ITO, K. (2002): "Botulism" in Foodborne Diseases, Herausgeber: Cliver, D.O.; Riemann, H.P.; 2. Ausgabe, S. 249-259, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press; 2002

GUAN, D.; GRAY, P.; KANG, D. H.; TANG, J.; SHAFER, B.; ITO, K.; YANG, T. C. S. (2003): "Microbiological Validation of Microwave-Circulated Water Combination Heating Technology by Inoculated Pack Studies", Journal of Food Science, 68(4), 1428-1432. (zitiert aus: BYUN et al., 2011)

GUJER, W.; ZEHNDER, A.J.B. (1983): Conversion processes in anaerobic digestion, Water Science and Technology 15, ISSN 0273-1223, S. 127-167, 1983, zitiert aus Helm (2014)

HELM, M. (2014): „Wie funktionieren biologische Prozesse in Biogasanlagen?“ in „Biogasanlagen“, 3. völlig neu bearbeitete Auflage, S. 20-33, Herausgeber: Uwe Görisch, Markus Helm, Eugen Ulmer KG, Stuttgart, 2014

HELLWIG, E.-G., (2010): Botulinumtoxikosen - Chronischer Botulismus, Agrar- und Veterinär- Akademie (AVA) – Fortbildungsgesellschaft, GÖTTINGER ERKLÄRUNG anlässlich der 9. AVA-Haupttagung, Göttingen, 17. bis 21. März 2010

HILL, K.K.; Smith, T.J.; Helma, C.H.; Ticknor, L.O.; Foley, B.T.; Svensson, R.T.; Brown, J.L.; Johnson, E.A.; Smith, L.A.; Okinaka, R.T.; et al. (2007): Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. J. Bacteriol. 2007, 189, 818–832. (zitiert aus: POULAIN & POPOFF, 2019)

ITO, K.A.; Chen J.K.; Seeger, M.L.; Unverfehrt J.A.; Kimball, R.N. (1978): Effect of pH on the growth of Clostridium botulinum in canned figs, Journal of Food Science, Ausgabe 43, Seite: 1634-1635, September 1978 (zitiert aus PREISING, 2006) url: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02564.x> (13.09.2019)

JCICSB (1999): JUDICIAL COMMISSION OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, „Rejection of Clostridium putrificum and conservation of Clostridium botulinum and Clostridium sporogenes - Opinion 69“. International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49, 339 URL: <http://ijs.sgmjournals.org/content/49/1/339.long> (12.08.2013)

KAYSER, F.H.; BÖTTGER, E.C. (2010): „Clostridium“; in: KAYSER, F.H.; BÖTTGER, E.C.; ZINKERNAGEL, R.M.; HALLER, O.; ECKERT, J; DEPLAZES, P.: „Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie“, 12. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

KLEIN, E. (1899): Ein Beitrag zur Akteriologie der Leichenverwesung. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde. Infektionskrankheiten und Hygiene 1: 278-84. (zitiert in Pfaff, 2016)

KÖHLER, B., (2011): Bemerkungen zu aktuellen Problemen des Botulismus und seinen Wechselwirkungen mit der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung der Biogasanlagen, Beitrag im Veterinär Spiegel, Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart , Ausgabe 01, März 2011

KÖHLER, B. (2018): Mikrobiologische Untersuchungen und Hygienekontrollen in Biogasanlagen, Vortrag TiHo Hannover, 08.11.2018, URL: https://www.ml.niedersachsen.de/download/139234/06_KoehlerRipac_Mikrobiol._Untersuchungen__Hygienekontrollen_Biogasanlagen.pdf (15.09.2019)

KRÄMER, J.; PRANGE, A. (2017): „Clostridium perfringens“ in: „Lebensmittel-Mikrobiologie“, 7. Auflage, ISBN 978-3-8252-4658-7, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

KRÜGER, M. (2005): "Biogasgülle am besten unterpflügen" in Flur und Furche, Bd. 184, S. 19 (2005) und „Biogas: Gülle unterpflügen", dlz-Agrarmagazin, Bd. 10, S. 14, 2005.

KrWG (2017): Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Bewirtschaftung von Abfällen(Kreislaufwirtschaftsgesetz - KrWG), Ausfertigungsdatum: 24.02.2012, zuletzt geändert: 20.07.2017 (BGBl. I S. 2808), Berlin, 2017.

KUTSUNA R, Tomida J, Morita Y, Kawamura Y (2018): Paraclostridium bifermentans exacerbates pathosis in a mouse model of ulcerative colitis. PLoS ONE 13(5): e0197668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197668>

LABBÈ, R.G. (2000): "Clostridium perfringens". In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G.: "The Microbiological Safety and Quality of Food". Aspen Publishers, MD, USA, pp. 1110–1135; Zitiert aus: BRYNESTAD & GRANUM(2002)

LAWSON, P. A., RAINEY, F. A. (2016): Proposal to restrict the genus Clostridium Prazmowski to Clostridium butyricum and related species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66 (2): 1009-1016, url: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000824> (21.09.2019)

LU-ATLAS SH, (2011): Bioabfallbehandlungsanlagen; URL: <http://www.umweltdaten.landsh.de/atlas/script/printmap.php> (10.01.2012)

LYRAS, D.; ROOD, J.I. (2006): Gram-positive Pathogenes, 2nd edition, Hrsg. V. A. Fischetti et al.; ASM Press, ISBN 13-978-1-55581-343-7, Washington, D.C.; 2006, S. 672-687

JOHNSON, J.L.; FRANCIS, B.S. (1975): Taxonomy of the Clostridia: Ribosomal Ribonucleic Acid Homologies among the Species, Journal of General Microbiology, Great Britain, Ausgabe 88, S. 229-244

LUND, B. M.; WYATT, G. M. (1984): The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of clostridium botulinum type E from spore inocula; Food microbiology, received: 24 October 1983, Ausgabe 1, S. 49-65, 1984

LUNG (2011): Biogas-Biomasse-Biokraftstoffanlagen (in Betrieb) in Mecklenburg-Vorpommern (Stand 10.03.2011), URL: <https://www.regierung-mv.de/Landesregierung/lm/Umwelt/Immissionsschutz/Biomasseanlagen-in-MV> (10.01.2012)

MARGOSCH, D.; Ehrmann, M.A.; Gänzle, M.G.; Vogel, R.F.; (2004): Comparison of Pressure and Heat Resistance of Clostridium botulinum and Other Endospores in Mashed Carrots, Journal of Food Protection, Ausgabe 67, Seite 2530-2537 (zitiert aus PREISING, 2006) url: <https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-67.11.2530> (13.09.2019)

MCGLYNN, W. G.; DAVIS, D. R.; JOHNSON, M. G.; CRANDALL, P. G. (2003): "Modified Spore Inoculation Method for Thermal-Process Verification of Pinto Beans and Green Beans Canned in Two Large Reusable Containers.", Journal of food science 68.3 (2003): 988-991; (zitiert aus: *BYUN et al., 2011*)

MT-ENERGIE GMBH (2011): Referenzanlagen der MT-Energie GmbH in Deutschland, Stand 03/11, URL: <https://www.yumpu.com/de/document/read/24814603/mt-referenzen-ger-mt-energie-gmbh> (11.09.2019)

MURREL, W.G.; SCOTT, W.J. (1966): The heat resistance of bacterial spores at various water activities, Journal of general Microbiology, Ausgabe 43(3), Seite 411-425, Juni 1966

(zitiert aus PREISING, 2006), url: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-43-3-411> (13.09.2019)

NAKAMURA, S.; Okado, I.; Nakashio, S.; Nishida, S. **(1977)**: Clostridium sporogenes isolates and their relationship to C. botulinum based on deoxyribonucleic acid reassociation. J. Gen. Microbiol. 1977, 100, 395–401. (zitiert aus POULAIN & POPOFF, 2019)

NAKAMURA, S., Okado, I., Abe, T., Nishida, S. **(1979)**: Taxonomy of Clostridium tetani and related species, J.Gen.Microbiol, Ausgabe: 113, Seite: 29-35, url: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/113/1/mic-113-1-29.pdf?expires=1568996359&id=id&accname=guest&checksum=9AA4FBA29218767CF1683F33069ACF7C>, abgerufen: 20.09.2019

NAWROCKI, E.M.; Bradshaw, M.; Johnson, E.A. **(2018)**: Botulinum neurotoxin-encoding plasmids can be conjugatively transferred to diverse clostridial strains. Sci. Rep. 2018, 8, 3100 (zitiert aus POULAIN & POPOFF, 2019)

NIEDMINUK (2009): Biogasanlagen in Niedersachsen (für die Behandlung von Bioabfällen zugelassen), Niedersächsisches Ministerium für Umwelt und Klimaschutz, Stand 01. September 2009; URL https://www.ngsmbh.de/bin/pdfs/Abfallwirtschaftsplan_Siedlungsabfaelle.pdf (11.09.2019)

NISIDA, S., Tamai, K. & Yamagishi, T. **(1964)**: Taxonomy of Clostridium bifermentans and Clostridium sordellii. J Bacteriol 88,1641–1646 (zitiert aus SASI JYOTHSNA, 2016)

OCIO, M.; SANCHEZ, T.; FERNANDEZ, P. S.; RODRIGO, M.; MARTINEZ, A. **(1994)**: „Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110–121 C as affected by pH, type of acidulant and substrate”, International journal of food microbiology, 22(4), 239-247; URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160594901759> (15.05.2013)

ORSBURN, B.; MELVILLE, S. B.; POPHAM, D. L. **(2008)**: “Factors contributing to heat resistance of Clostridium perfringens endospores”. Applied and environmental microbiology, 74(11), 3328-3335. Zitiert aus WANG et al (2012)

OXOID DEUTSCHLAND GMBH (2012): Produkte für die Mikrobiologie, Preisliste 2012, Oxoid Deutschland GmbH Deutschland GmbH, Wesel, 01.01.2012

PAREDES-SABJA, D.; Setlow, B.; Setlow, P.; Sarker, M.R. **(2008):** Characterization of *Clostridium perfringens* Spores That Lack SpoVA Proteins and Dipicolinic Acid, *Journal of Bacteriology*, Vol. 190, No. 13, Seite 4648-4659, July 2008

PAREDES-SABJA, D., SETLOW, P. and SARKER, M.R. (2010): “Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved”, *Trends in microbiology*, 19(2), 85-94. *Zitiert aus WANG et al (2012)*

PFAFF, (2016): *Clostridium cadaveris* bacteremia in a critically ill surgical patient with septic shock after total abdominal colectomy: a case report and review of literature, ISSN: 2399-9098, veröffentlicht: December 26, 2016 URL: https://www.oatext.com/Clostridium-cadaveris-bacteremia-in-a-critically-ill-surgical-patient-with-septic-shock-after-total-abdominal-colectomy-a-case-report-and-review-of-literature.php#Article_Info, abgerufen 20.09.2019

PREISING, C. (2006): Literaturstudie zum Vermehrungs- und Toxinbildungsvermögen von *Clostridium botulinum*, zu den Eigenschaften des Botulinumtoxins sowie zum Vorkommen und zur Tenazität der *Clostridium botulinum*-Sporen, Inaugural-Dissertation, Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Lebensmittelhygiene, verteidigt am 24.10.2006, url: <http://ul.qucosa.de/api/qucosa%3A10669/attachment/ATT-0/> (13.09.2019)

POULAIN, B., POPOFF, M.R. (2019): Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic?, *MDPI, Toxins* 2019, 11(1), 34; url: <https://doi.org/10.3390/toxins11010034>, 11.01.2019

PUBANTZ, F. (2010): Der Bauer und das tote Vieh, in SVZ – Schweriner Volkszeitung, p. 18, 15. October 2010.

RAJU, D.; SARKER, M. R. (2005): „Comparison of the levels of heat resistance of wild-type, cpe knockout, and cpe plasmid-cured *Clostridium perfringens* type A strains”, *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7618-7620; *Zitiert aus WANG et al (2012)*

RIPAC (2011): Leistungsinformation der RIPAC-LABOR GmbH, URL: <http://www.ripac-labor.de/de/leistung.html#MALDI-TOF>, abgerufen am 13.01.2011

RL 2008/98/EG (2008): RICHTLINIE 2008/98/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 19. November 2008 über Abfälle und zur Aufhebung bestimmter Richtlinien, Bekanntgabe: 22.11.2008, Amtsblatt der Europäischen Union, L312/3-30, Straßburg

RODLOFF, A.C. (2012): Obligat anaerobe, sporenbildende Stäbchen (Clostridien), Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, S. Suerbaum et al. (Hrsg.), DOI 10.1007/978-3-642-24167-3_39, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Kap. 39, S. 324-332

SANCHEZ-SALAS, J. L.; SETLOW, B.; ZHANG, P.; LI, Y. Q.; SETLOW, P. (2011): "Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation", *Applied and environmental microbiology*, 77(19), 6746-6754; Zitiert aus WANG et al (2012)

SARKER, M. R.; SHIVERS, R. P.; SPARKS, S. G.; JUNEJA, V. K.; MCCLANE, B. A. (2000): "Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes". *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3234-3240. URL: <http://aem.asm.org/> (17.02.2013)

SASI JYOTHSNA, T. S., Tushar, L., Sasikala, C., Ramana, C. V. (2016): *Paraclostridium benzoelyticum* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment and reclassification of *Clostridium bifermentans* as *Paraclostridium bifermentans* comb. nov. Proposal of a new genus *Paeniclostridium* gen. nov. to accommodate *Clostridium sordellii* and *Clostridium ghonii*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (3): 1268-1274, 2016, url: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/66/3/1268_ijsem000874.pdf?expires=1569008890&id=id&accname=guest&checksum=64AAE3DBD9274EB655017DEB462DE667, abgerufen: 20.09.2019

SCHAUMANN, R.; RODLOFF, A.C. (2009): „*Clostridium* spp.“, in: „Mikrobiologische Diagnostik, Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie“, Neumeister, B.; Geiss, H.K.; Braun, R.W.; Kimmig, P.; Burkhardt, F. (Hrsg.); 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Kapitel 23.7; S. 539-550

SCHÖN, G. (1999): BAKTERIEN – Die Welt der kleinsten Lebewesen, ISBN 3-406-41046-4, Verlag C.H. Beck, , München

SCHNEIDER,, E. (2007): „Endosporen und andere Dauerformen“; in: FUCHS: „Allgemeine Mikrobiologie“, 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

SELBITZ, H.-J.; TRUYEN, U.; VALENTIN-WEIGAND, P. (2010): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, M. Rolle und A. Mayer (Hrsg.), Enke Verlag, 9. Auflage, ISBN 978-3-8304-1080-5

SETLOW, P. (2003): “Spore germination”. Current opinion in microbiology, 6(6), 550-55; Zitiert aus WANG et al (2012)

SETLOW, P. (2006): “Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals”. Journal of applied microbiology, 101(3), 514-525; Zitiert aus WANG et al (2012)

SETLOW, P.; JOHNSON, E. A.; DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (2007): “Spores and their significance”. Food microbiology: fundamentals and frontiers, (Edn. 3), 35-67; Zitiert aus WANG et al (2012)

SEYFRIED, C.F. et al. (1990): Anaerobe Verfahren zur Behandlung von Industrieabwässern. Korrespondenz Abwasser 37, S. 1.247–1.251, 1990, Zitiert aus FNR (2016)

SONENSHEIN, A. (2000): Bacterial Sporulation: a Responce to Environmental Signals, Bacterial Stress Responses, G. Storz und R. Hengge-Aronis, ASM Press, ISBN 1-55581-192-2, Washington, D.C., S. 199-216

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A. (1997): Phylogenetic Relationships, The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis, Hrsg. J.I. Rood et al.; Academic Press Limited, London, ISBN 0-12-595020-9, Kapitel 1, S. 3-19

STRINGER, S. C.; WEBB, M. D.; GEORGE, S. M.; PIN, C.; PECK, M. W. (2005): “Heterogeneity of times required for germination and outgrowth from single spores of nonproteolytic

Clostridium botulinum”. Applied and environmental microbiology, 71(9), 4998-5003. Zitiert aus: WANG et al (2012).

TAYLOR, R.H.; Dunn, M.L.; Ogden, L.V.; Jefferies, L.K.; Eggett, D.L.; Steele, F.M. **(2013)**: Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. J. Dairy Sci. 2013, 96, 2754–2764. . (zitiert aus POULAIN & POPOFF, 2019)

TIERNEBG (2016): Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG) vom 25. Januar 2004 (BGBl. I S. 82), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 4. August 2016 (BGBl. I S. 1966) geändert worden ist, Berlin, 2016

TIERNEBV (2018): Verordnung zur Durchführung des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes (Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsverordnung - TierNebV) vom 27. Juli 2006 (BGBl. I S. 1735), die zuletzt durch Artikel 3des Gesetzes vom 4. Dezember 2018 (BGBl. I S. 2254) geändert worden ist, Berlin, 2018

TRBA 466 (2019): Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe, Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, Ausgabe August 2015, GMBI. Nr. 46-50 vom 25.8.2015, 4. Änderung: GMB. Nr. 25-31 vom 14. August 2019, S. 478
URL: https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf?__blob=publicationFile&v=6 (20.09.2019)

UEKI, A., Ohtaki, Y., Kaku, N., Ueki, K. **(2016)**: Descriptions of *Anaerotaenia torta* gen. nov., sp. nov. and *Anaerocolumna cellulositytica* gen. nov., sp. nov. isolated from a methanogenic reactor of cattle waste and reclassification of *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium jejuense* and *Clostridium xylanovorans* as *Anaerocolumna* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66 (8): 2936-2943, url: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/66/8/2936_ijsem001123.pdf?expires=1569005831&id=id&accname=guest&checksum=FCE4E26AE23569BC8561A390128A96DD, abgerufen am 20.09.2019

V 1069/2009/EG (2009): Verordnung DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr.

1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte), 21.10.2009, L300/1-33, Amtsblatt der Europäischen Union, Straßburg, veröffentlicht 14.11.2009.

V 142/2011/EG (2011): Verordnung (EU) Nr. 142/2011 der Kommission vom 25. Februar 2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren; 25. Februar 2011, L54/1-254, Amtsblatt der Europäischen Union, Straßburg, veröffentlicht am 26.02.2011

WANG, G.; ZHANG, P.; PAREDES-SABJA, D.; GREEN, C.; SETLOW, P.; SARKER, M.R.; LI, Y.Q (2011): "Analysis of the germination of individual *Clostridium perfringens* spores and its heterogeneity". *Journal of Applied Microbiology*. 111, S. 1212-1223; ULR: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2011.05135.x/pdf> (17.02.2013)

WANG, G.; PAREDES-SABJA, D.; SARKER, M. R.; GREEN, C.; SETLOW, P.; LI, Y. Q. (2012): "Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*". *Journal of Applied Microbiology*, 113(4), 824-836. ULR: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2012.05387.x/pdf> (17.02.2013)

WEBB, M. D.; PIN, C.; PECK, M. W.; STRINGER, S. C. (2007): "Historical and contemporary NaCl concentrations affect the duration and distribution of lag times from individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*", *Applied and environmental microbiology*, 73(7), 2118-2127; Zitiert aus WANG et al (2012)

WEIGAND, M.R.; Pena-Gonzalez, A.; Shirey, T.B.; Broeker, R.G.; Ishaq, M.K.; Konstantinidis, K.T.; Raphael, B.H. (2015): Implications of Genome-Based Discrimination between *Clostridium botulinum* Group I and *Clostridium sporogenes* Strains for Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 5420–5429. (zitiert aus POULAIN & POPOFF, 2019)

WEILAND, P. (2001): Grundlagen der Methangärung – Biologie und Substrate; VDI-Berichte, Nr. 1620 „Biogas als regenerative Energie – Stand und Perspektiven“; S. 19-32; VDI-Verlag, 2001

WEISS, K.F.; STRONG, D.H. (1967): Some Properties of Heat-Resistant and Heat-Sensitive Strains of *Clostridium perfringens*, I. Heat Resistance and Toxigenicity; *Journal of Bacteriology*, 93(1):21, Seite 21-26, url: <http://jb.asm.org/content/93/1/21> (17.02.2013)

WELT, B. A.; TONG, C. H.; ROSSEN, J. L.; LUND, D. B. (1994): "Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores", *Applied and environmental microbiology*, 60(2), 482-488; (zitiert aus BYUN et al., 2011)

Willis, A.T. (1977): Characteristics of pathogenic and related clostridia. In: *Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice*. Butterworth Boston: 111-66. (zitiert in PFAFF, 2016)

WOESE, C.R.; FOX, G.E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*. November 1977;74(11); S. 5088-5090

WONG, Y. M., Juan, J. C., Gan, H. M. & Austin, C. M. (2014): Draft genome sequence of *Clostridium bifermentans* strain WYM, a promising biohydrogen producer isolated from landfill leachate sludge. *Genome Announc* 2, e00077-14. (zitiert aus SASI JYOTHSNA et al., 2016)

WYNNE, E.S.; FOSTER, J.W. (1948): Physiological Studies On Spore Germination With Special Reference To *Clostridium Botulinum*, I. Development Of A Quantitative Method, *Journal of Bacteriology*, Ausgabe 55(1), Seite 61-68, Januar 1948

ZHANG, P.; GARNER, W.; YI, X.; YU, J.; LI, Y. Q.; SETLOW, P. (2010): "Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of *Bacillus* species", *Journal of bacteriology*, 192(14), 3608-3619; Zitiert aus WANG et al (2012)

6 Anhangsverzeichnis

Anhang 1	Fragebogen – Anschreiben.....	85
Anhang 2	Fragebogen.....	86
Anhang 3	DBFZ-Fragebogen.....	90
Anhang 4	Nomenklatur der Materialien in Probenbezeichnung der Cluster-Isolate.....	92
Anhang 5	Übersicht der isolierten Clostridien nach Anlagen.....	93
Anhang 6	Sporenanteil Clostridium perfringens.....	98
Anhang 7	Sporenanteil Clostridium sporogenes.....	99
Anhang 8	Gewicht der Bakterienmasse auf einer 1µl-Impföse.....	100
Anhang 9	Abkühlung der Proben nach Versuchsdurchführung.....	100
Anhang 10	Keimwachstum der Kontrollproben.....	101
Anhang 11	<i>C. perfringens</i> : statistisch signifikante Unterschiede 70 °C.....	102
Anhang 12	<i>C. perfringens</i> : statistisch signifikante Unterschiede bei 90 °C.....	102
Anhang 13	<i>C. perfringens</i> : statistisch signifikante Unterschiede bei 100 °C.....	106
Anhang 14	<i>C. perfringens</i> : statistisch signifikante Unterschiede zwischen 90 °C und 100 °C....	108
Anhang 15	<i>C. perfringens</i> : statistisch signifikante Unterschiede 100 °C, 121 °C und 134 °C.....	108
Anhang 16	<i>C. sporogenes</i> : statistisch signifikante Unterschiede 70 °C.....	109
Anhang 17	<i>C. sporogenes</i> : statistisch signifikante Unterschiede bei 90 °C und 100 °C.....	110
Anhang 18	<i>C. sporogenes</i> : statistisch signifikante Unterschiede bei 100 °C.....	111
Anhang 19	<i>C. sporogenes</i> : statistisch signifikante Unterschiede bei 100 °C und 121 °C.....	111
Anhang 20	<i>C. sporogenes</i> : Statistisch signifikante Unterschiede bei 134 °C.....	111
Anhang 21	Thesen.....	112

7 Anhang

Anhang 1 Fragebogen – Anschreiben



AGRAR- UND
UMWELTWISSEN-
SCHAFTLICHE
FAKULTÄT

Universität Rostock | AUF | Abfall- und Stoffstromwirtschaft
18059 Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6

M. Sc. Beatrix Lüdecke

Professur für Abfall- und
Stoffstromwirtschaft

Sitz Justus-von-Liebig-Weg 6
D- 18059 Rostock

Fon +49(0)381 498-34 14
Fax +49(0)381 498-34 02

Mail beatrix.luedecke@uni-rostock.de

Rostock, 24.01.2012

Befragung

Sehr geehrte Anlagenbetreiber,

im Rahmen meiner Doktorarbeit an der Professur für Abfall- und Stoffstromwirtschaft der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock führe ich Stoffstromanalysen verschiedener Biogasanlagen und Abfallvergärungsanlagen durch und untersuche die substratabhängige mikrobielle Zusammensetzung in den Fermentern.

Um die möglichen Substratkombinationen und Gärrestverwertungen zu ermitteln, führe ich eine Befragung von Betreibern von Biogasanlagen und Abfallvergärungsanlagen durch.

Anhand Ihrer Antworten kann ich Stoffströme von Substraten, die in Biogasanlagen eingebracht werden, und von Gärresten ermitteln.

Durch die mikrobiologische Analyse der Inputsubstrate, der Fermenterinhalt und der Gärreste können eventuelle Zusammenhänge der mikrobiellen Zusammensetzung aufgrund der unterschiedlichen Substrateinsätze abgeleitet werden. Daher würde ich mich auch über die Möglichkeit freuen, Proben von Ihren Inputsubstraten, aus Ihren Fermentern und Gärrestlagern entnehmen und analysieren zu dürfen. Dazu werde ich Sie gesondert kontaktieren. Ihnen entstehen keine Kosten! Die Ergebnisse Ihrer Proben stelle ich Ihnen natürlich gern zur Verfügung.

Ihre Angaben werden vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben. Die Ergebnisse der Befragung und der mikrobiologischen Analytik werden anonymisiert und verallgemeinert in meine Dissertation eingebunden.

Bitte senden Sie den vollständig ausgefüllten Fragebogen im beigefügten kostenfreien Rückumschlag bis spätestens **06. Februar 2012** zurück.

Sofern Sie Fragen oder Anregungen haben, stehe ich Ihnen unter der oben aufgeführten Telefonnummer oder Emailadresse gern zur Verfügung.

Vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Mit freundlichen Grüßen

Beatrix Lüdecke

Einbringtechnik			
11.	Vorlager	Volumen: m ³ Oberfläche: m ²	Abdeckung: ☐ ja ☐ Ausrichtung nach Süden ☐ nein
12.	Hygienisierung	☐ ja wenn ja, welche: ☐ nein	
13.	Einbringtechnik	☐ Schnecke ☐ Kratzboden ☐ Sonstiges:	
14.	Einbringintervalle:	Anzahl: Menge: [kg/Intervall]	
15.	Rezirkulat:	Menge:	☐ aus Hauptfermenter ☐ aus Nachgärer
Siliertechnik			
Erntetechnik			
16.	Häcksler (Häcksellänge, etc)		
17.	Silierzusatz	Produkt:	Dosierart:
Silierkette			
18.	Verdichtung:	Fahrzeuggewicht: [t]	
19.	Ernte und Silierzeitraum (Beginn bis Abdeckung)		
Silo			
20.	Art des Silos	☐ Fahrsilo ☐ Silohaufen ☐ Sonstiges:	
21.	Abmessungen des Silos	Breite: m Höhe: m Länge: m	
22.	Abdeckung	☐ nein ☐ Folie ☐ Zwischenfolie ☐ Vogelschutz ☐ Sonstiges:	
23.	Entnahmetechnik	☐ Fräse ☐ Radlader ☐ Sonstiges:	
24.	Anschnitt	Vorschub: [m/Tag]	
25.	Anschnitt Aussehen	☐ locker ☐ fest	
26.	Öffnungsdatum (Zeitraum nach Abdeckung)		
Siloskizze:			

Gärrestlager (nicht beheizt)			
27.	Volumen: m ³ Oberfläche: m ²	☐ offen ☐ abgedeckt ☐ gasdicht abgedeckt	☐ Ausrichtung nach Süden
28.	Nutzen Sie eine Gärrestauffbereitung? ☐ ja wenn ja, welche: ☐ nein		
29.	Verwertung der Gärreste	☐ im eigenen Betrieb: ha, davon Grünland: ha ☐ extern: ☐ in Zulieferbetrieben der Inputsubstrate (Anzahl: ha, davon Grünland: ha durchschnittliche Transportentfernung: km ☐ in anderen Betrieben (Anzahl: ha, davon Grünland: ha durchschnittliche Transportentfernung: km	
Biogasqualität			
30.	Methan:	[Vol.-%]	
31.	Kohlendioxid:	[Vol.-%]	
32.	Sauerstoff:	[Vol.-%]	
33.	Schwefelwasserstoff:	[ppm]	
Gasverwertung			
34.	Abgasbehandlung	☐ nein ☐ Oxidationskatalysator ☐ therm. Nachverbrennung	
35.	Entschwefelung/ Gasreinigung	☐ Lufteinblasung ☐ biol. Wäscher ☐ Aktivkohle ☐ Eisenzudosierung ☐ andere	
36.	BHKW:	Anzahl der Aggregate: Größe: [kW _{el}] ☐ Zündstrahl ☐ Gas	
37.	Auslastung	[h/Jahr]	
38.	eingespeister Strom	[kWh/Jahr]	
Probleme			
39.	Was verursachte im vergangenen Jahr Ausfallzeiten?	☐ Eintragstechnik ☐ Rührtechnik ☐ Schwimmschicht ☐ BHKW ☐ Schaum ☐ Übersäuerung ☐ Korrosion ☐ _____ Tage/Jahr	
40.	Wurden in Ihren Inputsubstraten, Fermenterhalten oder Gärresten Keimbelastungen festgestellt?	☐ nein ☐ ja welche: ☐ nein ☐ ja welche: ☐ nein ☐ ja welche: mögliche Ursache:	

Substrateinsatz								
	Eigenproduktion / Anbau			Zukauf / von extern				mittlere Transport- entfernung [km]
	Anteil [Gew.-%]	Menge [t/Tag]	Menge [t/Jahr]	Anteil [Gew.-%]	Menge [t/Tag]	Menge [t/Jahr]	Herkunft	
Rindergülle								
Schweinegülle								
Festmist von: _____								
Hühnertrockenkot								
Maissilage								
Grassilage								
Kleegrassilage								
Gras, frisch: _____								
Getreidekorn								
GPS (Hauptfrucht) _____								
Zwischenfrucht: _____								
Bioabfall								
Material der Kategorie 3								
weiteres Substrat _____								
weiteres Substrat _____								
weiteres Substrat _____								
Prozesshilfsstoff _____								
Wurde der Gülleeinsatz seit 2009 (Gülle-Bonus) verändert?				☐ nein ☐ ja, mehr Gülle ☐ nein, weniger Gülle		% Veränderung (ggü. 2008) % Veränderung (ggü. 2008)		
Sind Sie mit einer Probenahme aus Ihren Inputsubstraten, Fermenterhalten und Gärresten einverstanden?							☐ ja ☐ nein	

Vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Anhang 3 DBFZ-Fragebogen

Deutsches BiomasseForschungsZentrum
German Biomass Research Centre



DBFZ • Torgauer Straße 116 • D-04347 Leipzig

Deutsches
BiomasseForschungsZentrum
gemeinnützige GmbH
Torgauer Straße 116
D-04347 Leipzig
Tel.: +49 341 2434 - 112
Fax: +49 341 2434 - 133
info@dbfz.de
www.dbfz.de

Bearbeiter: Nadja Rensberg
Tel.: +49 341 2434 - 459
biogas@dbfz.de

Status	☐ in Betrieb ☐ in Planung ☐ in Bau ☐ z.Zt. außer Betrieb ☐ stillgelegt				
Branche	☐ Landwirtschaft ☐ Abfallwirtschaft ☐ Industrie ☐ Kläranlagen				
Jahr der Inbetriebnahme	Anlagenerweiterungen: _____				
Genehmigung	☐ Baurecht ☐ BImSchG ☐ UVP-Gesetz ☐ Abfallrecht				
Privilegiert gebaut (§ 35 BauGB)	☐ ja ☐ nein				
Wie ist Ihre Anlage nach EEG eingestuft?	☐ Grundvergütung NawaRo-Bonus: ☐ 2004 ☐ 2009 ☐ Gülle-Bonus KWK-Bonus: ☐ 2004 ☐ 2009 ☐ Emissions-Bonus Innovationsbonus: ☐ 2004 ☐ 2009 ☐ Landschaftspflege-Bonus				

Installierte elektrische Leistung	_____ kW _{el}	eingespeiste Strommenge:	_____ kWh _{el} /Jahr
Produzierte Strommenge (inkl. Eigenstrombedarf)	_____ kWh/Jahr		
Betriebsstunden	_____ h/Jahr	Volllaststunden:	_____ h/Jahr
Wie erfolgt die Gasnutzung? (Mehrfachnennung möglich)	☐ Zündstrahl-BHKW ☐ Gaseinspeisung ☐ Satelliten-BHKW ☐ Gasmotor-BHKW ☐ Fahrzeug-Kraftstoff ☐ Wärme/Brennkessel ☐ Mikrogasturbine ☐ Mikrogasleitung ☐ sonstige: _____		
Wirkungsgrad (Gasnutzung)	elektrisch: _____ % thermisch: _____ %		
Fackel vorhanden?	☐ nein ☐ ja wenn, ja: ☐ stationär ☐ mobil		

Eigenstromverbrauch der Anlage	_____ kWh _{el} /Jahr	bzw. _____ % (bezogen auf die prod. Strommenge)
Eigenwärmeverbrauch	_____ kWh _{th} /Jahr	bzw. _____ % (bezogen auf die prod. Wärmemenge)
Wie viel der produzierten Wärme wird extern genutzt?	_____ kWh _{th} /Jahr	bzw. _____ % (KWK-Anteil)
Wärmeerlöse	Wärme genutzt für: _____ _____ ct/ kWh _{th}	

Verfahren	☐ Nassvergärung ☐ Feststoff/Trockenvergärung ☐ sonstige: _____	
Anzahl der Fermenter	_____	Fermentervolumen (ohne Gärrestlager): _____ m ³
Aufenthaltszeit/ Verweildauer der Substrate (ohne Gärrestlager)	_____ Tage	

Gärrestlager (nicht beheizt)	☐ offen ☐ abgedeckt ☐ gasdicht abgedeckt
Nutzen Sie eine Gärrestaufbereitung?	☐ nein ☐ ja wenn ja, welche: _____
Verwertung der Gärreste	☐ im eigenen Betrieb: _____ ha ☐ extern: _____ ha

Abgasbehandlung	☐ nein ☐ Oxidationskatalysator ☐ therm. Nachverbrennung
Entschwefelung/ Gasreinigung	☐ Luftereinblasung ☐ Biol. Wäscher ☐ Aktivkohle ☐ Eisenzudosierung ☐ andere
Was verursachte im vergangenen Jahr Ausfallzeiten?	☐ Eintragstechnik ☐ Rührtechnik ☐ Schaum ☐ Schwimmschicht ☐ Übersäuerung ☐ Korrosion ☐ BHKW _____ Tage/ Jahr

Substrateinsatz Biogasanlage (landwirtschaftl. Biogasanlage, Abfallanlage, andere Anlage)					
	Eigenproduktion/Anbau		Zukauf/von extern		mittlere Transportentfernung [km]
	Menge [t/Jahr] Frischmasse	Kosten [€/t] frei BGA	Menge [t/Jahr] Frischmasse	Preis [€/t] frei BGA	
Gülle (☐ Rind ☐ Schwein) :					
Festmist (☐ Rind ☐ Schwein) :					
Geflügelmist/-kot:					
Silomais:					
Getreidekorn:					
Gras, frisch ☐ Grünland ☐ Ackerland:					
Grassilage :					
GPS (Hauptfrucht), welche : _____					
Zwischenfrucht, welche: _____					
Substrat: _____					
Substrat: _____					
Substrat: _____					
Wurde der Gülleeinsatz seit 2009 (Gülle-Bonus) verändert ?		☐ nein ☐ ja, mehr Gülle _____ % Veränderung (ggü. 2008) ☐ nein, weniger Gülle _____ % Veränderung (ggü. 2008)			
Siloart: _____	Folienabdeckung: ☐ ja ☐ nein		Sickersaft in Anlage genutzt: ☐ ja ☐ nein		

Fläche <u>aller</u> am Betrieb der Anlage beteiligten Betriebe: _____ ha	davon: Ackerland: _____ ha / Grünland: _____ ha
Anbaufläche zur Biogasproduktion ? _____ ha	davon: Ackerland: _____ ha / Grünland: _____ ha
Erfolgte nach Bau der Biogasanlage eine Nutzungsänderung im Grünland?	☐ nein ☐ ja welche: _____
Verbesserungswünsche hinsichtlich der Novellierung des EEG 2012?	_____

Ansprechpartner	_____	Telefon	_____
Adresse	_____	E-Mail	_____

Vielen Dank für die Beantwortung der Fragen!

Anhang 4 Nomenklatur der Materialien in Probenbezeichnung der Cluster-Isolate

Materialgruppe	
A-Abfall	1- Input aus Vorgärer (unhygienisiert)
	2- Input unhygienisiert
	3- Input hygienisiert
C-Cerealien (Getreide)	1- Ausputz
	2- Weizenschrot
Z- Zuckerrübe	1- Schnitzel
	2- Mus
R- Restfutter	
E-Exkremente	1- Rindergülle
	2- Rinderfestmist
	3- Pferdefestmist
	4- Hühnertrockenkot
	5- Schweinegülle
	6- Festmismischung(Pferd/Rind)
V- Vorgrube	
S- Silage	1- Mais
	2- Mais + Hirse
	3- Gras
	4- Ganzpflanzen
	5- Kleegrassilage
F- Fermenter	1- Behälter 1
	2- Behälter 2
G- Gärrest	1- flüssig
	2- fest
	3- Zentrat
P- Permeat	

Anhang 5 Übersicht der isolierten Clostridien nach Anlagen

Anlage Nr.	Temperaturbereich	Material	Stammnummer	RIPAC-Identifizierung	RIPAC-Nummer
1	mesophil	S1		<i>C. perfringens</i>	D12-0275-1
		G1		<i>C. perfringens</i>	D12-0275-2
2	mesophil	G1	2	<i>C. perfringens</i>	D13-0204-1
			4	<i>C. cochlearium</i>	D12-1005-1
			5	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-2
			8	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-3
			9	<i>C. cochlearium</i>	D12-1005-4
			12	<i>C. xylanolyticum</i>	D13-0204-4
			13	<i>C. baratii</i>	D12-1005-6
			14	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-5
			23	<i>C. sporogenes</i>	D13-1079-2
3	mesophil	F	15	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-6
			16	<i>C. sporogenes</i>	D13-1079-
			17	<i>C. cadaveris</i>	D12-1005-8
			18	<i>C. glycolicum</i>	D12-1005-9
			19	<i>C. glycolicum</i>	D12-1005-10
			20	<i>C. sporogenes</i>	D12-1005-11
		G1	22	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-7
		R	24	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-8
			25	<i>C. sporogenes</i>	D12-1005-12
			26	<i>C. glycolicum</i>	D12-1005-13
		S3	27	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-9
		V	28	<i>C. sporogenes</i>	D12-1005-14
			29	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-10
			30	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-11
			31	<i>C. sporogenes</i>	D13-1079-3
			32	<i>C. sporogenes</i>	D13-1079-4
		Z2	33	<i>C. tyrobutyricum</i>	D12-1005-92
			34	<i>C. aminovalericum</i>	D13-0204-12
			36	<i>C. glycolicum</i>	D12-1005-17
4	thermophil	F	37	<i>C. glycolicum</i>	D13-0204-14
			38	<i>C. sporogenes</i>	D13-0204-15
		S1	39	<i>C. xylanolyticum</i>	D13-0204-4
			40	<i>C. perfringens</i>	D12-1005-19
5	thermophil	F1	42	<i>C. tepidum</i>	D11-0088-1-1-16
			43	<i>C. tepidum</i>	D11-0088-1-1-16
			44	<i>C. sporogenes</i>	D12-1005-23

			45	C. sporogenes	D13-0204-17
		F2	46	C. aminovalericum	D13-0204-18
		G1	48	C. sporogenes	D13-0204-19
			49	C. sporogenes	D13-1079-5
			50	C. sporogenes	D12-1005-24
			51	C. sporogenes	D13-1079-6
			52	C. sporogenes	D13-0204-20
			53	C. sporogenes	D13-1079-7
			54	C. D12-1005-78-1-1	D12-1005-78
			55	C. sporogenes	D13-0204-21
		G2	56	C. tepidum	D11-0088-1-1-16
			57	C. sporogenes	D13-0204-22
			58	C. sporogenes	D13-0204-23
		S2	60	C. sordellii	D12-1005-28
		Z1	61	C. sporogenes	D13-0204-24
6	mesophil	E6	62	C. sporogenes	D13-0204-25
			63	C. sporogenes	D13-0204-26
			64	C. glycolicum	D13-0204-27
			65	C. sporo. + bifermentans	D13-0204-28
		F	66	C. sporogenes	D13-0204-29
			69	C. glycolicum	D13-0204-30
		G1	73	C. cadaveris +sordellii	D12-1005-29
			74	C. sporogenes	D12-1005-30
			75	C. D13-0204-31-1-1	D13-0204-31
			76	C. D11-0088-1-1-16	D11-0088-1-1-16
			77	C. D12-1005-78-1-1	D12-1005-78
			78	C. bifermentans	D13-0204-33
			80	C. bifermentans	D13-0204-34
			82	C. glycolicum	D13-0204-35
			83	C. sporogenes	D12-1005-34
		S3	84	C. sporogenes	D13-0204-36
			85	C. cochlearium	D12-1005-35
			86	C. aminovalericum	D13-0204-37
7	mesophil	F	87	C. glycolicum	D13-0204-38
			88	C. bifermentans	D12-1005-36
			89	C. sporogenes	D13-0204-39
			90	C. sporogenes	D13-1079-8
			91	C. sporogenes	D13-1079-9
			92	C. sporogenes	D12-1005-37
			93	C. sporogenes	D13-0204-40
		G1	94	C. sporogenes	D13-0204-41
			95	C. sporogenes	D13-0204-42
			96	C. sporogenes	D13-1079-10
			97	C. sporogenes	D13-0204-43

		S1	99	C. aminovalericum	D13-0204-44
			100	C. D13-0204-45-1-1	D13-0204-45
8	mesophil	E1	101	C. sporogenes	D13-0204-46
			102	C. glycolicum	D13-0204-47
			103	C. bifermentans	D13-0204-48
		E4	104	C. sporogenes	D13-1079-11
			105	C. sporogenes	D13-1079-12
			106	C. sporogenes	D13-1079-13
			107	C. sporogenes	D13-0204-49
			108	C. sporogenes	D13-0204-50
		F	109	C. sporogenes	D13-0204-51
			110	C. sporogenes	D13-1354-1-1-1
			112	MK C. cochlearium, Bacillus cereus	D12-1005-39
		G1	113	C. D12-1005-78-1-1	D12-1005-78
			116	C. sporogenes	D13-0204-52
		S1	118	C. sporogenes	D13-0204-53
			119	C. tepidum	D11-0088-1-1-16
9	mesophil	F1	120	C. glycolicum	D13-0204-55
			121	C. glycolicum	D13-1079-14
			122	C. bifermentans	D13-0204-56
			123	C. sporogenes	D13-0204-57
		F2	125	C. sporogenes	D13-0204-58
			127	C. sporogenes	D13-0204-59
			128	C. sporogenes	D13-1079-15
			129	C. glycolicum	D13-1079-16
			130	C. sporogenes	D12-1005-42
			131	C. sporogenes	D13-0204-60
		G1	132	C. sporogenes	D13-0204-61
			133	C. glycolicum	D12-1005-43
			134	C. sporogenes	D13-0204-62
			135	C. sporogenes	D13-0204-63
			136	C. sporogenes	D13-1079-17
			137	C. sporogenes	D13-0204-64,65,66
		S3	138	C. sporogenes	D12-1005-44
			139	C. cochlearium	D13-0204-67
10	thermophil	E2	140	C. sporogenes	D13-0204-68
			142	C. sporogenes	D12-1005-45
			143	C. sporogenes	D13-0204-69
			144	C. sporogenes	D13-0204-70
			145	C. sporogenes	D13-0204-71
			146	C. sporogenes	D13-0204-72
			148	C. sporogenes	D13-0204-73
		F	149	C. sporogenes	D13-0204-74
			150	C. sporogenes	D13-0204-75

		G1	151	C. sporogenes	D13-1079-18
			153	C. sporogenes	D13-0204-76
			154	C. sporogenes	D13-0204-77
			155	C. glycolicum	D13-0204-78
			157	C. sporogenes	D13-0204-79
11	mesophil	S1	158	C. sporogenes	D13-0204-80
			160	C. sporogenes	D12-1005-46
		F1	161	C. sporogenes	D13-0204-81
			163	C. sporogenes	D12-1005-47
		G1	165	C. sporogenes	D13-0204-82
			166	C. sporogenes	D13-0204-83
			167	C. sporogenes	D13-0204-84
		S1	168	C. sporogenes	D13-0204-85
12	mesophil	A1	171	C. paraputrificum	D13-0204-86
			172	C. sporogenes	D13-0204-87
			174	C. cochlearium	D12-1005-49
			176	C. sporogenes	D13-0204-88
			177	C. sporogenes	D12-1005-50
		F1	179	C. sporogenes	D13-0204-89
			180	C. sporogenes	D13-0204-90
			181	C. sporogenes	D12-1005-51
		F2	182	C. sporogenes	D13-1079-19
			183	C. sporogenes	D13-0204-91
			184	C. sporogenes	D13-0204-92
			185	C. bifermentans	D13-0204-93
			186	C. sporogenes	D13-1079-20
		F3	187	C. sporogenes	D13-0204-94
			188	C. sporogenes	D13-1079-21
			189	C. sporogenes	D13-0204-95
			190	C. bifermentans	D12-1005-52
		G1	192	C. sporogenes	D13-0204-96
			194	C. sporogenes	D13-0204-97
			195	C. bifermentans	D13-0966-2
			196	C. bifermentans	D12-1005-55
			197	C. bifermentans	D13-0204-99
13	mesophil	E5	199	C. D13-0204-100-1-1	D13-0204-100
			200	C. tyrobutyricum	D12-1005-57
			202	C. sporogenes	D13-0204-101
		F1	203	C. sporogenes	D12-1005-58
			204	C. sporogenes	D13-0204-102
			205	C. sporogenes	D13-0204-103
			206	C. sporogenes	D12-1005-59
		F2	207	C. sporogenes	D13-0204-104
			208	C. sporogenes	D13-0204-105

14	mesophil	E2	211	C. sporogenes	D13-0204-106
			212	C. sporogenes	D13-0204-107
			213	C. D13-0204-31-1-1	D13-0204-108
			214	C. cochlearium	D12-1005-61
			215	C. D11-0088-1-1-16	D11-0088-1-1-16
		E4	217	C. sporogenes	D13-0204-109
			218	C. sporogenes	D13-1079-22
		F	219	C. sporogenes	D13-0204-110
			220	C. sporogenes	D13-0204-111
			221	MK C. sporogenes, C. bifermentans	D13-1079-23
		G1	223	C. D12-1413-1-1-3	D12-1413-1-1-3
			224	C. sporogenes	D13-0204-113
			226	C. bifermentans	D12-1005-64
		S1	229	C. sporogenes	D13-0204-114
15	thermophil	A2	231	C. sporogenes	D13-0204-115
			232	C. sporogenes	D13-0204-116
			233	C. sporogenes	D13-1079-24
			235	C. sporogenes	D12-1005-65
			236	C. sporogenes	D13-1079-25
		F	237	C. limosum	D13-0204-117
			238	C. sporogenes	D13-0204-118
			239	C. sporogenes	D13-0204-119
			240	C. sporogenes	D13-0204-120
		G2	243	C. D13-0204-100-1-1	D13-0204-100
			244	C. D13-0204-31-1-1	D13-0204-31
16	mesophil	F	247	C. sporogenes	D12-1005-68
		G1	248	C. sporogenes	D13-0204-121
			249	C. sporogenes	D13-1079-26
		G2	252	C. tepidum	D11-0088-1-1-16
			253	C. sporogenes	D13-0204-122
			254	C. sporogenes	D13-0204-123
		S1	255	C. sporogenes	D13-0204-124
			256	C. bifermentans	D12-1005-70

Anhang 6 Sporenanteil Clostridium perfringens

(üN= über Nacht; V = vegetative Zelle; S = Spore; 1 = 1. Zählung, 2 = 2. Zählung)

Datum	Temperatur	Probe	V 1	S 1	V 2	S 2	Vegetativanteil	Sporenanteil	Sporenanteil Versuchstag [%]
09.04.2013	70 °C	1	24	76	7	93	15,5	85	76,8
		2	34	66	35	65	34,5	66	
		3	26	74	12	88	19	81	
		4	32	68	22	78	27	73	
		5	29	71	11	89	20	80	
09.04.13 üN	70 °C	1	24	76	45	55	34,5	66	65,5
15.04.13 üN	121 °C	1	24	76	10	90	17	83	83,0
16.04.2013	121 °C	1	34	66	24	76	29	71	71,0
17.04.2013	134 °C	1	79	21	56	54	67,5	38	60,0
		2	26	74	9	91	17,5	83	
29.05.2013	100 °C	1	32	68	97	3	64,5	36	35,5
04.06.2013	121 °C	2	86	14	88	12	87	13	13,0
13.01.2014	100 °C	1a	84	16	70	30	77	23	28,3
		1b	57	43	62	38	59,5	41	
		2a	82	18	63	37	72,5	28	
		2b	78	22	82	18	80	20	
		3	62	38	77	23	69,5	31	
14.01.2014	100 °C	1a	36	64	19	81	27,5	73	79,4
		1b	25	75	20	80	22,5	78	
		2a	18	82	26	74	22	78	
		2b	22	78	14	86	18	82	
		3	11	89	15	85	13	87	
15.01.2014	70 °C	1	20	80	16	84	18	82	84,3
		2	18	82	18	82	18	82	
		3	23	77	6	94	14,5	86	
		4	19	81	16	84	17,5	83	
		5	9	91	12	88	10,5	90	
21.01.2014	90 °C	1	14	86	7	93	10,5	90	92,0
		2	9	91	8	92	8,5	92	
		3	4	96	5	95	4,5	96	
		4	11	89	7	93	9	91	
		5	8	92	6	94	7	93	
		6	9	91	8	92	8,5	92	
22.01.2014	70 °C	1	12	88	9	91	10,5	90	89,2
		2	14	86	6	94	10	90	
		3	21	79	11	89	16	84	
		4	9	91	13	87	11	89	
		5	11	89	7	93	9	91	
		6	11	89	6	94	8,5	92	
27.01.2014	90 °C	1	23	77	17	83	20	80	88,6
		2	13	87	12	88	12,5	88	
		3	7	93	13	87	10	90	
		4	8	92	6	94	7	93	
		5	10	90	5	95	7,5	93	
01.04.2014	90 °C	1	14	86	13	97	13,5	92	90,1
		2	12	88	7	93	9,5	91	
		3	13	87	9	91	11	89	
		4	9	91	12	88	10,5	90	
		5	11	89	9	91	10	90	
02.04.2014	100 °C	1	8	92	8	92	8	92	89,3
		2	15	85	12	88	13,5	87	
		3	10	90	11	89	10,5	90	

Anhang 7 Sporenanteil Clostridium sporogenes

(üN= über Nacht; V = vegetative Zellen; S = Sporen; 1 = 1. Zählung, 2 = 2. Zählung)

Datum	Temperatur	Probe	V 1	S 1	V 2	S 2	Vegetativanteil	Sporenanteil	Sporenanteil Versuchstag [%]	
10.04.2013	70 °C	1	62	38	25	75	43,5	56,5	67,0	
		2	42	58	8	92	25	75		
		3	47	53	22	78	34,5	65,5		
		4	39	61	18	82	28,5	71,5		
		5	46	54	21	79	33,5	66,5		
16.04.2013	121 °C	1	14	86	9	91	11,5	88,5	88,5	
17.04.2013	134 °C	1	15	85	10	90	12,5	87,5	88,0	
		2	12	88	9	91	10,5	89,5		
		3	21	79	5	95	13	87		
29.05.2013	100 °C	1	42	58	9	91	25,5	74,5	74,5	
04.06.2013	121 °C	1	45	55	10	90	27,5	72,5	72,5	
05.06.2013	134 °C	1	44	56	27	73	35,5	64,5	64,5	
13.01.2014	100 °C	1a	19	81	13	87	16	84	84,8	
		1b	15	85	18	82	16,5	83,5		
		2a	10	90	14	86	12	88		
		2b	12	88	23	77	17,5	82,5		
		3.	9	91	19	81	14	86		
14.01.2014	100 °C	1a	7	93	10	90	8,5	91,5	83,4	
		1b	29	71	21	79	25	75		
		2a	12	88	13	87	12,5	87,5		
		2b	21	79	22	78	21,5	78,5		
		3.	19	81	12	88	15,5	84,5		
20.01.2014	70 °C	1.	16	84	20	80	18	82	83,8	
		2.	11	89	16	84	13,5	86,5		
		3.	21	79	21	79	21	79		
		4.	13	87	11	89	12	88		
		5.	12	88	14	86	13	87		
		6.	19	81	21	79	20	80		
28.01.2014	70 °C	1.	9	91	6	94	7,5	92,5	87,0	
		2.	22	78	14	86	18	82		
		3.	12	88	8	92	10	90		
		4.	16	84	9	91	12,5	87,5		
		5.	23	77	11	89	17	83		
03.02.2014	90 °C	1.	12	88	5	95	8,5	91,5	89,7	
		2.	10	90	12	88	11	89		
		3.	14	86	7	93	10,5	89,5		
		4.	5	95	6	94	5,5	94,5		
		5.	18	82	15	85	16,5	83,5		
		6.	11	89	9	91	10	90		
04.02.2014	90 °C	1.	12	88	12	88	12	88	89,2	
		2.	13	87	6	94	9,5	90,5		
		3.	12	88	10	90	11	89		
		4.	16	84	9	91	12,5	87,5		
		5.	7	93	11	89	9	91		
05.02.2014	90 °C	1.	6	94	4	96	5	95	90,7	
		2.	20	80	7	93	13,5	86,5		
		3.	23	77	6	94	14,5	85,5		
		4.	5	95	5	95	5	95		
		5.	11	89	6	94	8,5	91,5		
									Mittelwert	81,8
									Varianz	75,4
									Standardabweichung	9,0
									Maximum	90,7
									Minimum	64,5

Anhang 8 Gewicht der Bakterienmasse auf einer 1µl-Impföse

(Eigengewicht der Impföse wurde abgezogen)

Wiederholung	<i>C. perfringens</i> [g]	<i>C. sporogenes</i> [g]
1	0,0013	0,0013
2	0,0026	0,0014
3	0,0023	0,001
4	0,0032	0,0008
5	0,0036	0,0008
6	0,0024	0,0011
7	0,0039	0,0019
8	0,0039	0,0016
9	0,0029	0,0014
10	0,0039	0,0019
11	0,0032	0,0016
12	0,0034	0,0015
13	0,0046	0,0021
14	0,0057	0,0016
15	0,0027	0,0017
16	0,0052	0,0024
17	0,0049	0,0015
18	0,0059	0,0016
19	0,0058	0,0022
20	0,0051	0,0022
Mittelwert	0,003825	0,00158
Maximum	0,0059	0,0024
Minimum	0,0013	0,0008
Standardabweichung	0,00130540	0,00045143

Anhang 9 Abkühlung der Proben nach Versuchsdurchführung

Temperatur	Abkühlungsdauer [min]	Abkühlung auf
90 °C (DRCM)	01:15	25°C
90 °C (Öl, 9 ml)	02:40	25°C
100 °C	03:00	23°C
121 °C	03:50	23°C
134 °C	04:30	23°C

Anhang 10 Keimwachstum der Kontrollproben

(üN = über Nacht, P = *C. perfringens*; S = *C. sporogenes*; Wachstum = Nachweis Keimwachstum nach Ausbringen auf Columbia-Agar mit Schafblut⁺)

Datum	Keim	T im Versuch	Wachstum Positivkontrolle DRCM	Wachstum Positivkontrolle ÖI	Wachstum Negativkontrolle DRCM	Wachstum Negativkontrolle ÖI
09.04.2013	P	70	positiv	positiv	negativ	negativ
10.04.2013	S	70	positiv	positiv	negativ	negativ
15.04.2013 üN	P	121	positiv	positiv	negativ	negativ
16.04.2013	S	121	positiv	positiv	negativ	negativ
16.04.2013 üN	P	134	positiv	positiv		
17.04.2013	S	134	negativ	positiv	negativ	negativ
17.04.2013	P	134	positiv	positiv		
29.05.2013	P	100	positiv	positiv	negativ	negativ
29.05.2013	S	100	positiv	positiv		
04.06.2013	P	121	positiv	positiv	negativ	negativ
04.06.2013	S	121	positiv	positiv		
05.06.2013	S	134	positiv	positiv	negativ	negativ
13.01.2014	P	100	positiv	positiv	negativ	negativ
13.01.2014	S	100	positiv	positiv		
14.01.2014	P	100	positiv	positiv	negativ	negativ
14.01.2014	S	100	positiv	positiv		
15.01.2014	P	70	positiv	positiv	negativ	negativ
20.01.2014	S	70	positiv	positiv	negativ	negativ
21.01.2014	P	90	positiv	positiv	negativ	negativ
21.01.2014	S	90	positiv	positiv		
22.01.2014	P	70	positiv	positiv	negativ	negativ
27.01.2014	P	90	positiv	positiv	negativ	negativ
28.01.2014	S	70	positiv	positiv	negativ	negativ
03.02.2014	S	90	positiv	positiv	negativ	negativ
04.02.2014	S	90	negativ	positiv	negativ	negativ
05.02.2014	S	90	positiv	positiv	negativ	negativ
01.04.2014	P	90	positiv	positiv	negativ	negativ
02.04.2014	P	100	positiv	positiv	negativ	negativ

Anhang 11 *C. perfringens*: statistisch signifikante Unterschiede 70 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

70°C	70°C Öl / 8h (9/10)
70 °C DRCM 8h (10/10)	p=1,000

Anhang 12 *C. perfringens*: statistisch signifikante Unterschiede bei 90 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

90°C 21/01/14	90°C Öl / 1h (10/10)	90°C Öl / 2h (9/10)	90°C Öl / 3h (8/10)	90°C Öl / 4h (8/10)	90°C Öl / 5h (8/10)	90°C Öl / 6h (8/8)	90°C Öl / 7h (8/10)	90°C Öl 8h (9/9)	90°C Öl / 9h (4/8)	90°C Öl / 10h (6/10)
90° DRCM / 1h (10/10)	p=1,000									
90° DRCM / 2h (10/10)		p=1,000								
90° DRCM / 3h (10/10)			p=0,456							
90° DRCM / 4h (10/10)				p=0,456						
90° DRCM / 5h (9/10)					p=1,000					
90° DRCM / 6h (6/10)						p=0,094				
90° DRCM / 7h (3/10)							p=0,072			
90° DRCM / 8h (0/10)								p=<0,001		
90° DRCM / 9h (0/10)									p=0,049	
90° DRCM / 10h (1/10)										p=0,061

90 °C Vergleich DRCM innerhalb 21/1/14	90°C 5h (9/10)	90°C 6h (6/10)	90°C 7h (3/10)	90°C 8,9h (0/10)	90°C 10h (1/10)
90°C 1-4h (10/10)	p=1,000	p=0,094	p=0,005	p=<0,001	p=<0,001
90°C 5h (9/10)		p=0,302	p=0,025	p=<0,001	p=0,002
90°C 6h (6/10)			p=0,369	p=0,015	p=0,061
90°C 7h (3/10)				p=0,210	p=0,576
90°C 8,9h (0/10)					p=1,000

90 °C Vergleich Öl innerhalb 21/1/14	90°C 2h (9/10)	90°C 3,4,5,7h (8/10)	90°C 9h (4/8)	90°C 10h (6/10)
90°C 1,6,8h (10/10), (8/8), (9/9)	p=1,000	p=0,456	p=0,049	p=0,094
90°C 2h (9/10)		p=1,000	p=0,061	p=0,302
90°C 3,4,5,7h (8/10)			p=0,171	p=0,626
90°C 9h (4/8)				p=0,958
90°C 10h (6/10)				

90°C 27/01/14	90°C Öl 1h (10/10)	90°C Öl 2h (10/10)	90°C Öl 3h (10/10)	90°C Öl 4h (8/10)	90°C Öl 5h (8/8)	90°C Öl 6h (8/8)	90°C Öl 7h (7/10)	90°C Öl 8h (9/10)	90°C Öl 9h (8/10)	90°C Öl 10h (9/10)
90°C DRCM 1h(10/10)	p=1,000									
90°C DRCM 2h(10/10)		p=1,000								
90°C DRCM 3h(10/10)			p=1,000							
90°C DRCM 4h(10/10)				p=0,456						
90°C DRCM 5h(10/10)					p=1,000					
90°C DRCM 6h(10/10)						p=1,000				
90°C DRCM 7h(10/10)							p=0,210			
90°C DRCM 8h(6/9)								p=0,495		
90°C DRCM 9h(2/10)									p=0,025	
90°C DRCM 10h(1/10)										p=0,002

90 °C Vergleich DRCM innerhalb 27/1/14	90°C 8h (6/9)	90°C 9h (2/10)	90°C 10h (1/10)
90°C 1-7h (10/10)	p=0,174	p=0,001	p=<0,001
90°C 8h (6/9)		p=0,111	p=0,009
90°C 9h (2/10)			p=1,000

90 °C Vergleich Öl innerhalb 27/1/14	90°C 4,9h (8/10)	90°C 8,10h (9/10)	90°C 7h (7/10)
90°C 1,2,3,5,6h (10/10), (8/8)	p=0,456	p=1,000	p=0,210
90°C 4,9h (8/10)		p=1,000	p=1,000
90°C 8,10h (9/10)			p=0,576

90°C 01/04/14	90°C Öl / 1h (8/8)	90°C Öl / 2h (9/9)	90°C Öl / 3h (9/9)	90°C Öl / 4h (8/10)	90°C Öl / 5h (8/10)	90°C Öl / 6h (6/10)	90°C Öl / 7h (5/10)	90°C Öl / 8h (6/8)	90°C Öl / 9h (6/9)	90°C Öl / 10h (5/8)
90° DRCM / 1h (10/10)	p=1,000									
90° DRCM / 2h (10/10)		p=1,000								
90° DRCM / 3h (10/10)			p=1,000							
90° DRCM / 4h (10/10)				p=0,456						
90° DRCM / 5h (10/10)					p=0,456					
90° DRCM / 6h (9/10)						p=0,302				
90° DRCM / 7h (7/10)							p=0,648			
90° DRCM / 8h (4/10)								p=0,314		
90° DRCM / 9h (4/10)									p=0,482	
90° DRCM / 10h (1/10)										p=0,065

90 °C Vergleich DRCM innerhalb 01/04/14	90°C 6h (9/10)	90°C 7h (7/10)	90°C 8-9h (4/10)	90°C 10h (1/10)
90°C 1-5h (10/10)	p=1,000	p=0,210	p=0,015	p=<0,001
90°C 6h (9/10)		p=0,576	p=0,061	p=0,002
90°C 7h (7/10)			p=0,369	p=0,022
90°C 8-9h (4/10)				p=0,302

90 °C Vergleich Öl innerhalb 01/04/14	90°C 4-5h (8/10)	90°C 6h (6/10)	90°C 7h (5/10)	90°C 8h (6/8)	90°C 9h (6/9)	90°C 10h (5/8)
90°C 1-3h (8/8), (9/9)	p=0,557	p=0,145	p=0,068	p=0,450	p=0,245	p=0,200
90°C 4-5h (8/10)		p=0,626	p=0,348	p=0,751	p=0,891	p=0,769
90°C 6h (6/10)			p=1,000	p=0,867	p=0,861	p=0,705
90°C 7h (5/10)				p=0,522	p=0,788	p=0,958

90°C DRCM 21/01/14 mit 27/01/14	90°C 1h 27/1 (10/10)	90°C 2h (10/10)	90°C 3h (10/10)	90°C 4h (10/10)	90°C 5h (10/10)	90°C 6h (10/10)	90°C 7h (10/10)	90°C 8h (6/9)	90°C 9h (2/10)	90°C 10h (1/10)
90°C DRCM 1h (10/10) 21/1	p=1,000									
90°C DRCM 2h (10/10)		p=1,000								
90°C DRCM 3h (10/10)			p=1,000							
90°C DRCM 4h (10/10)				p=1,000						
90°C DRCM 5h (9/10)					p=1,000					
90°C DRCM 6h (6/10)						p=0,094				
90°C DRCM 7h (3/10)							p=0,005			
90°C DRCM 8h (0/10)								p=0,009		
90°C DRCM 9h (0/10)									p=0,456	
90°C DRCM 10h (1/10)										p=1,000

90°C DRCM 01/04/14 mit 21/01/14	90°C 1h 21/1 (10/10)	90°C 2h (10/10)	90°C 3h (10/10)	90°C 4h (10/10)	90°C 5h (9/10)	90°C 6h (6/10)	90°C 7h (3/10)	90°C 8h (0/10)	90°C 9h (0/10)	90°C 10h (1/10)
90°C DRCM 1h (10/10) 1/4	p=1,000									
90°C DRCM 2h (10/10)		p=1,000								
90°C DRCM 3h (10/10)			p=1,000							
90°C DRCM 4h (10/10)				p=1,000						
90°C DRCM 5h (10/10)					p=1,000					
90°C DRCM 6h (9/10)						p=0,302				
90°C DRCM 7h (7/10)							p=0,180			
90°C DRCM 8h (4/10)								p=0,094		
90°C DRCM 9h (4/10)									p=0,094	
90°C DRCM 10h (1/10)										p=1,000

90°C DRCM 01/04/14 mit 27/01/14	90°C 1h 27/1 (10/10)	90°C 2h (10/10)	90°C 3h (10/10)	90°C 4h (10/10)	90°C 5h (10/10)	90°C 6h (10/10)	90°C 7h (10/10)	90°C 8h (6/9)	90°C 9h (2/10)	90°C 10h (1/10)
90°C DRCM 1h (10/10) 1/4	p=1,000									
90°C DRCM 2h (10/10)		p=1,000								
90°C DRCM 3h (10/10)			p=1,000							
90°C DRCM 4h (10/10)				p=1,000						
90°C DRCM 5h (10/10)					p=1,000					
90°C DRCM 6h (9/10)						p=1,000				
90°C DRCM 7h (7/10)							p=0,210			
90°C DRCM 8h (4/10)								p=0,482		
90°C DRCM 9h (4/10)									p=0,626	
90°C DRCM 10h (1/10)										p=1,000

90°C Öl 21/01/14 mit 27/01/14	90°C Öl / 1h 27/1 (10/10)	90°C Öl / 2h (10/10)	90°C Öl / 3h (10/10)	90°C Öl / 4h (8/10)	90°C Öl / 5h (8/18)	90°C Öl / 6h (8/8)	90°C Öl / 7h (7/10)	90°C Öl / 8h (9/10)	90°C Öl / 9h (8/10)	90°C Öl / 10h (9/10)
90° Öl / 1h (10/10) 21/1	p=1,000									
90° Öl / 2h (9/10)		p=1,000								
90° Öl / 3h (8/10)			p=0,456							
90° Öl / 4h (8/10)				p=1,000						
90° Öl / 5h (8/10)					p=0,456					
90° Öl / 6h (8/8)						p=1,000				
90° Öl / 7h (8/10)							p=1,000			
90° Öl / 8h (9/9)								p=1,000		
90° Öl / 9h (4/8)									p=0,402	
90° Öl / 10h (6/10)										p=0,302

90°C Öl 01/04/14 mit 21/01/14	90°C Öl / 1h 21/1 (10/10)	90°C Öl / 2h (9/10)	90°C Öl / 3h (8/10)	90°C Öl / 4h (8/10)	90°C Öl / 5h (8/10)	90°C Öl / 6h (8/8)	90°C Öl / 7h (8/10)	90°C Öl / 8h (9/9)	90°C Öl / 9h (4/8)	90°C Öl / 10h (6/10)
90°C Öl / 1h (8/8) 01/04/14	p=1,000									
90°C Öl / 2h (9/9)		p=1,000								
90°C Öl / 3h (9/9)			p=0,456							
90°C Öl / 4h (8/10)				p=1,000						
90°C Öl / 5h (8/10)					p=1,000					
90°C Öl / 6h (6/10)						p=0,094				
90°C Öl / 7h (5/10)							p=0,348			
90°C Öl / 8h (6/8)								p=0,399		
90°C Öl / 9h (6/9)									p=0,839	
90°C Öl / 10h (5/8)										p=0,705

90°C Öl 01/04/14 mit 27/01/14	90°C Öl / 1h 27/1 (10/10)	90°C Öl / 2h (10/10)	90°C Öl / 3h (10/10)	90°C Öl / 4h (8/10)	90°C Öl / 5h (8/18)	90°C Öl / 6h (8/8)	90°C Öl / 7h (7/10)	90°C Öl / 8h (9/10)	90°C Öl / 9h (8/10)	90°C Öl / 10h (9/10)
90°C Öl / 1h (8/8) 01/04/14	p=1,000									
90°C Öl / 2h (9/9)		p=1,000								
90°C Öl / 3h (9/9)			p=1,000							
90°C Öl / 4h (8/10)				p=1,000						
90°C Öl / 5h (8/10)					p=0,456					
90°C Öl / 6h (6/10)						p=0,145				
90°C Öl / 7h (5/10)							p=1,000			
90°C Öl / 8h (6/8)								p=0,832		
90°C Öl / 9h (6/9)									p=0,891	
90°C Öl / 10h (5/8)										p=0,410

90°C alle DRCM zu Öl	Öl 1h 28/28	Öl 2h 28/29	Öl 3h 27/29	Öl 4h 24/30	Öl 5h 24/28	Öl 6h 22/26	Öl 7h 20/30	Öl 8h 24/27	Öl 9h 18/27	Öl 10h 20/28
DRCM 1h 30/30	p=1,000									
DRCM 2h 30/30		p=0,986								
DRCM 3h 30/30			p=0,457							
DRCM 4h 30/30				p=0,031						
DRCM 5h 29/30					p=0,309					
DRCM 6h 25/30						p=0,815				
DRCM 7h 20/30							p=1,000			
DRCM 8h 10/29								p=<0,001		
DRCM 9h 6/30									p=<0,001	
DRCM 10h 3/30										p=<0,001

Anhang 13 *C. perfringens*: statistisch signifikante Unterschiede bei 100 °C

(Legende: Temperatur Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

100°C 29/05/13 1ml	100°C Öl 20min (10/10)	100°C Öl 30min (8/10)	100°C Öl 40min (7/10)	100°C Öl 50min (6/10)	100°C Öl 1h (7/10)
100° Öl / 10min (10/10)	p=1,000	p=0,456	p=0,210	p=0,094	p=0,210
100° Öl / 20min (10/10)		p=0,456	p=0,210	p=0,094	p=0,211
100° Öl / 30min (8/10)			p=1,000	p=0,626	p=1,000
100° Öl / 40min (7/10)				p=1,000	p=1,000
100° Öl / 50min (6/10)					p=1,000

100°C 13/01/14 1ml	100°C Öl / 40min (8/10)	100°C Öl / 1h (9/10)	100°C Öl / 2h (5/8)	100°C Öl / 3h (5/6)	100°C Öl / 4h (1/5)	100°C Öl / 5h (3/7)	100°C Öl / 6,10 h (4/8)	100°C Öl / 7h (2/7)	100°C Öl / 8h (0/5)	100°C Öl / 9h (1/8)
100° Öl / 20min (10/10)	p=0,456	p=1,000	p=0,138	p=0,788	p=0,007	p=0,031	p=0,049	p=0,008	p=<0,001	p=<0,001
100° Öl / 40min (8/10)		p=1,000	p=0,769	p=0,619	p=0,094	p=0,288	p=0,402	p=0,105	p=0,017	p=0,018
100° Öl / 1h (9/10)			p=0,410	p=0,698	p=0,033	p=0,119	p=0,176	p=0,036	p=0,005	p=0,005
100° Öl / 2h (5/8)				p=0,799	p=0,356	p=0,809	p=1,000	p=0,426	p=0,095	p=0,121
100° Öl / 3h (5/6)					p=0,136	p=0,356	p=0,470	p=0,157	p=0,031	p=0,035
100° Öl / 4h (1/5)						p=0,836	p=0,620	p=0,735	p=1,000	p=0,671
100° Öl / 5h (3/7)							p=0,809	p=1,000	p=0,310	p=0,458
100° Öl / 6h (4/8)								p=0,751	p=0,200	p=0,281
100° Öl / 7h (2/7)								p=0,751	p=0,601	p=0,897
100° Öl / 8h (0/5)							p=0,200			p=0,805
100° Öl / 9h (1/8)							p=0,281			
100° Öl / 10h (4/8)										

100°C 14/01/14 1ml	100°C Öl 40min (10/10)	100°C Öl 1h (9/10)	100°C Öl 2h (10/10)	100°C Öl 3h (6/10)	100°C Öl 4h (8/10)	100°C Öl 5h (6/10)	100°C Öl 6h (5/10)	100°C Öl 7h (1/10)	100°C Öl 8h (4/10)	100°C Öl 9h (2/10)	100°C Öl 10h (1/10)
20min (10/10)	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=0,094	p=0,456	p=0,094	p=0,039	p=<0,001	p=0,015	p=0,001	p=<0,001
40min (10/10)		p=1,000	p=1,000	p=0,094	p=0,456	p=0,094	p=0,039	p=<0,002	p=0,015	p=0,001	p=<0,002
1h (9/10)			p=1,000	p=0,302	p=1,000	p=0,302	p=0,143	p=0,002	p=0,061	p=0,007	p=0,002
2h (10/10)				p=0,094	p=0,456	p=0,094	p=0,039	p=<0,002	p=0,015	p=0,001	p=<0,002
3h (6/10)					p=0,626	p=1,000	p=1,000	p=0,061	p=0,655	p=0,171	p=0,061
4h (8/10)						p=0,626	p=0,348	p=0,007	p=0,171	p=0,025	p=0,007
5h (6/10)							p=1,000	p=0,061	p=0,655	p=0,171	p=0,061
6h (5/10)								p=0,143	p=1,000	p=0,348	p=0,143
7h (1/10)									p=0,302	p=1,000	p=1,000
8h (4/10)										p=0,626	p=0,302
9h (2/10)											p=1,000

100°C 02/04/14 1ml	100° Öl / 2 h (5/8)	100° Öl / 3h (5/10)	100° Öl / 4h (4/9)	100° Öl / 5h (2/8)	100° Öl / 6h (6/10)	100° Öl / 7h (5/9)	100° Öl / 8h (5/10)	100° Öl / 9h (3/10)	100° Öl 10h (3/8)
100° Öl 02/04/14 1 h (8/10)	p=0,769	p=0,348	p=0,259	p=0,063	p=0,626	p=0,516	p=0,348	p=0,072	p=0,177
100° Öl / 2 h (5/8)		p=0,958	p=0,797	p=0,313	p=0,705	p=0,839	p=0,958	p=0,367	p=0,617
100° Öl / 3h (5/10)			p=0,828	p=0,552	p=1,000	p=0,828	p=1,000	p=0,648	p=0,958
100° Öl / 4h (4/9)				p=0,742	p=0,827	p=1,000	p=0,828	p=0,861	p=0,839
100° Öl / 5h (2/8)					p=0,314	p=0,433	p=0,552	p=0,769	p=1,000
100° Öl / 6h (6/10)						p=0,787	p=1,000	p=0,369	p=0,635
100° Öl / 7h (5/9)							p=0,828	p=0,508	p=0,797
100° Öl / 8h (5/10)								p=0,648	p=0,958
100° Öl / 9h (3/10)									p=0,867
100° Öl 10h (3/8)									

100°C 13/01/14 mit 14/01/14	100° Öl 14/01/14 20min (10/10)	100° Öl 40min (10/10)	100° Öl 1h (9/10)	100° Öl 2h (10/10)	100° Öl 3h (6/10)	100° Öl 4h (8/10)	100° Öl 5h (6/10)	100° Öl 6h (5/10)	100° Öl 7h (1/10)	100° Öl 8h (4/10)	100° Öl 9h (2/10)	100° Öl 10h (1/10)
100° Öl / 20min (10/10)	p=1,000											
100° Öl / 40min (8/10)		p=0,456										
100° Öl / 1h (9/10)			p=1,000									
100° Öl / 2h (5/8)				p=0,138								
100° Öl / 3h (5/6)					p=0,677							
100° Öl / 4h (1/5)						p=0,094						
100° Öl / 5h (3/7)							p=0,839					
100° Öl / 6h (4/8)								p=0,635				
100° Öl / 7h (2/7)									p=0,732			
100° Öl / 8h (0/5)										p=0,302		
100° Öl / 9h (1/8)											p=0,832	
100° Öl / 10h (4/8)												p=0,176

100°C 13/01/14 mit 02/04/14	100° Öl 02/04 1h (8/10)	100° Öl 2h (5/8)	100° Öl 3h (5/10)	100° Öl 4h (4/9)	100° Öl 5h (2/8)	100° Öl 6h (6/10)	100° Öl 7h (5/9)	100° Öl 8h (5/10)	100° Öl 9h (3/10)	100° Öl 10h (3/8)
100° Öl / 1h (9/10)	p=1,000									
100° Öl / 2h (5/8)		p=1,000								
100° Öl / 3h (5/6)			p=0,425							
100° Öl / 4h (1/5)				p=0,740						
100° Öl / 5h (3/7)					p=0,855					
100° Öl / 6h (4/8)						p=0,958				
100° Öl / 7h (2/7)							p=0,568			
100° Öl / 8h (0/5)								p=0,175		
100° Öl / 9h (1/8)									p=0,751	
100° Öl / 10h (4/8)										p=1,000

100°C 02/04/14 mit 14/01/14	100° Öl 1h (9/10)	100° Öl 14/01/14 2h (10/10)	100° Öl 3h (6/10)	100° Öl 4h (8/10)	100° Öl 5h (6/10)	100° Öl 6h (5/10)	100° Öl 7h (1/10)	100° Öl 8h (4/10)	100° Öl 9h (2/10)	100° Öl 10h (1/10)
100° 02/04 1h (8/10)	p=1,000									
100° Öl / 2h (5/8)		p=0,138								
100° Öl / 3h (5/10)			p=1,000							
100° Öl / 4h (4/9)				p=0,259						
100° Öl / 5h (2/8)					p=0,314					
100° Öl / 6h (6/10)						p=1,000				
100° Öl / 7h (5/9)							p=0,101			
100° Öl / 8h (5/10)								p=1,000		
100° Öl / 9h (3/10)									p=1,000	
100° Öl 10h (3/8)										p=0,410

Anhang 14 *C. perfringens*: statistisch signifikante Unterschiede zwischen 90 °C und 100 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

90 DRCM zu 100 Öl	100° Öl / 1h (26/30)	100°C Öl / 2h (20/26)	100°C Öl / 3h (16/26)	100°C Öl / 4h (13/24)	100°C Öl / 5h (11/25)	100°C Öl / 6h (15/28)	100°C Öl / 7h (7/26)	100°C Öl / 8h (9/25)	100°C Öl / 9h (6/28)	100°C Öl / 10h (8/26)
90°C DRCM 1h 30/30	p=0,121									
DRCM 2h 30/30		p=0,019								
DRCM 3h 30/30			p=<0,001							
DRCM 4h 30/30				p=<0,001						
DRCM 5h 29/30					p=<0,001					
DRCM 6h 25/30						p=0,030				
DRCM 7h 20/30							p=0,007			
DRCM 8h 10/29								p=0,865		
DRCM 9h 6/30									p=0,849	
DRCM 10h 3/30										p=0,107

90 Öl zu 100 Öl	100° Öl / 1h (26/30)	100°C Öl / 2h (20/26)	100°C Öl / 3h (16/26)	100°C Öl / 4h (13/24)	100°C Öl / 5h (11/25)	100°C Öl / 6h (15/28)	100°C Öl / 7h (7/26)	100°C Öl / 8h (9/25)	100°C Öl / 9h (6/28)	100°C Öl / 10h (8/26)
90°C Öl 1h 28/28	p=0,138									
Öl 2h 28/29		p=0,076								
Öl 3h 27/29			p=0,012							
Öl 4h 24/30				p=0,083						
Öl 5h 24/28					p=0,004					
Öl 6h 24/26						p=0,004				
Öl 7h 20/30							p=0,007			
Öl 8h 24/27								p=<0,001		
Öl 9h 18/27									p=0,002	
Öl 10h 20/28										p=0,007

Anhang 15 *C. perfringens*: statistisch signifikante Unterschiede 100 °C, 121 °C und 134 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

100 Öl zu 121 Öl	121°C Öl 1h (0/15)	121°C Öl 2h (0/16)	121°C Öl 3h (0/17)	121°C Öl 4h (0/18)	121°C Öl 5-10h (0/10)
100° Öl / 1h (26/30)	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	
100°C Öl / 2h (20/26)		p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	
100°C Öl / 3h (16/26)			p=<0,001	p=<0,001	
100°C Öl / 4h (13/24)				p=<0,001	
100°C Öl / 5h (11/25)					p=0,033
100°C Öl / 6h (15/28)					p=0,009
100°C Öl / 7h (7/26)					p=0,174
100°C Öl / 8h (9/25)					p=0,076
100°C Öl / 9h (6/28)					p=0,276
100°C Öl / 10h (8/26)					p=0,123

121 °C zu 134 °C Öl	134 °C Öl 1-12h (0/10)
121°C Öl 1h (0/15)	p=1,000
121°C Öl 2-4h (0/16-0/18)	p=1,000
121°C Öl 5-12h (0/10)	p=1,000

Anhang 16 *C. sporogenes*: statistisch signifikante Unterschiede 70 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

70°C DRCM 10/04/13	70°C DRCM 2h (3/10)	70°C DRCM 3h (5/10)	70°C DRCM 4h (2/10)	70°C DRCM 5h (7/10)	70°C DRCM 6h (4/10)	70°C DRCM 7h (5/10)	70°C DRCM 8h (7/10)	70°C DRCM 9h (3/10)	70°C DRCM 10h (2/10)	70°C DRCM 11,12h (0/10)
70°C 1h (0/10)	p=0,210	p=0,039	p=0,456	p=0,005	p=0,094	p=0,039	p=0,005	p=0,210	p=0,456	p=1,000
70°C 2h (3/10)		p=0,648	p=1,000	p=0,180	p=1,000	p=0,648	p=0,180	p=0,626	p=1,000	p=0,210
70°C 3h (5/10)			p=0,348	p=0,648	p=1,000	p=0,655	p=0,648	p=0,648	p=0,348	p=0,039
70°C 4h (2/10)				p=0,072	p=0,626	p=0,348	p=0,072	p=1,000	p=0,576	p=0,456
70°C 5h (7/10)					p=0,369	p=0,648	p=0,626	p=0,180	p=0,072	p=0,005
70°C 6h (4/10)						p=1,000	p=0,369	p=1,000	p=0,626	p=0,094
70°C 7h (5/10)							p=0,648	p=0,648	p=0,348	p=0,039
70°C 8h (7/10)								p=0,180	p=0,072	p=0,005
70°C 9h (3/10)									p=1,000	p=0,210

70°C Öl 10/04/13	70°C Öl 2h (6/10)	70°C Öl 3h (10/10)	70°C Öl 4h (8/10)	70°C Öl 5h (10/10)	70°C Öl 6h (8/10)	70°C Öl 7h (6/10)	70°C Öl 8h (7/10)	70°C Öl 9h (8/10)	70°C Öl 10h (10/10)	70°C Öl 11h (3/10)	70°C Öl 12h (4/10)
70°C 1h (5/10)	p=1,000	p=0,039	p=0,348	p=0,039	p=0,348	p=1,000	p=0,648	p=0,348	p=0,039	p=0,648	p=1,000
70°C 2h (6/10)		p=0,094	p=0,626	p=0,094	p=0,626	p=1,000	p=1,000	p=0,626	p=0,094	p=0,369	p=0,655
70°C 3h (10/10)			p=0,456	p=1,000	p=0,456	p=0,094	p=0,210	p=0,456	p=1,000	p=0,005	p=0,015
70°C 4h (8/10)				p=0,456	p=1,000	p=0,626	p=1,000	p=1,000	p=0,456	p=0,072	p=0,171
70°C 5h (10/10)					p=0,456	p=0,094	p=0,210	p=0,456	p=1,000	p=0,005	p=0,015
70°C 6h (8/10)						p=0,626	p=1,000	p=1,000	p=0,456	p=0,072	p=0,171
70°C 7h (6/10)							p=1,000	p=0,626	p=0,094	p=0,369	p=0,655
70°C 8h (7/10)								p=1,000	p=0,210	p=0,180	p=0,369
70°C 9h (8/10)									p=0,456	p=0,072	p=0,171
70°C 10h (10/10)										p=0,005	p=0,015
70°C 11h (3/10)											p=1,000

70°C DRCM mit Öl 10/04/13	70°C Öl 1h (5/10)	70°C Öl 2h (6/10)	70°C Öl 3h (10/10)	70°C Öl 4h (8/10)	70°C Öl 5h (10/10)	70°C Öl 6h (8/10)	70°C Öl 7h (6/10)	70°C Öl 9h (8/10)	70°C Öl 10h (10/10)	70°C Öl 11h (3/10)	70°C Öl 12h (4/10)
DRCM 1h (0/10)	p=0,039										
DRCM 2h (3/10)		p=0,369									
DRCM 3h (5/10)			p=0,039								
DRCM 4h (2/10)				p=0,025							
DRCM 5h (7/10)					p=0,210						
DRCM 6h (4/10)						p=0,171					
DRCM 7h (5/10)							p=1,000				
DRCM 9h (3/10)								p=0,072			
DRCM 10h (2/10)									p=0,001		
DRCM 11h (0/10)										p=0,210	
DRCM 12h (0/10)											p=0,094

70°C DRCM und Öl 28/01/14	70°C DRCM 2-10h (10/10)	70°C Öl 1-10h (10/10)
70°C DRCM 1h (2/10)	p=0,001	p=0,001
70°C DRCM 2, 4-10h (10/10)		p=1,000
70°C DRCM 3h (9/9)	p=1,000	p=1,000

70°C DRCM 10/04/13 mit 20/01/14 und 28/01/14	20/01/14 70°C DRCM 1-10h (10/10)	28/01/14 70°C DRCM 1h (2/10)	28/01/14 70°C DRCM 2-10h (10/10)
70°C DRCM 1h (0/10) 10/04/13	p=<0,001	p=0,456	
70°C DRCM 2h (3/10)	p=0,005		p=0,005
70°C DRCM 3h (5/10)	p=0,039		p=0,039
70°C DRCM 4h (2/10)	p=0,001		p=0,001
70°C DRCM 5h (7/10)	p=0,210		p=0,210
70°C DRCM 6h (4/10)	p=0,015		p=0,015
70°C DRCM 7h (5/10)	p=0,039		p=0,039
70°C DRCM 9h (3/10)	p=0,005		p=0,005
70°C DRCM 10h (2/10)	p=0,001		p=0,001

70°C Öl 10/04/13 mit 20/01/14 und 28/01/14	20+28/01/14 70°C Öl 1-10h (10/10)
70°C Öl 1h (5/10) 10/04/13	p=0,039
70°C Öl 2h (6/10)	p=0,094
70°C Öl 3h (10/10)	p=1,000
70°C Öl 4h (8/10)	p=0,456
70°C Öl 5h (10/10)	p=1,000
70°C Öl 6h (8/10)	p=0,456
70°C Öl 7h (6/10)	p=0,094
70°C Öl 8h (7/10)	p=0,210
70°C Öl 9h (8/10)	p=0,456
70°C Öl 10h (10/10)	p=1,000

Anhang 17 *C. sporogenes*: statistisch signifikante Unterschiede bei 90 °C und 100 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei p < 0,05)

90 °C zu 100 °C Öl 1ml	90°C Öl/DRCM 1-10h (25/25) / (30/30)
100°C 1-3,5h (30/30), (29/29)	p=1,000
100°C 4,7,10h (28/29)	p=0,986
100°C 6,8h (28/30)	p=0,472
100°C 9h (25/29)	p=0,112

Anhang 18 *C. sporogenes*: statistisch signifikante Unterschiede bei 100 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

100°C 1ml 29/05/13 innerhalb	100°C 2h (10/10)	100°C 3h (10/10)	100°C 4h (9/10)	100°C 5h (10/10)	100°C 6h (8/10)	100°C 7h (9/10)	100°C 8h (8/10)	100°C 9h (6/10)	100°C 10h (9/10)
100°C 1h (10/10)	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=0,456	p=1,000	p=0,456	p=0,094	p=1,000
100°C 2h (10/10)		p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=0,456	p=1,000	p=0,456	p=0,094	p=1,000
100°C 3h (10/10)			p=1,000	p=1,000	p=0,456	p=1,000	p=0,456	p=0,094	p=1,000
100°C 4h (9/10)				p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=1,000	p=0,302	p=1,000
100°C 5h (10/10)					p=0,456	p=1,000	p=0,456	p=0,094	p=1,000
100°C 6h (8/10)						p=1,000	p=1,000	p=0,626	p=1,000
100°C 7h (9/10)							p=1,000	p=0,302	p=1,000
100°C 8h (8/10)								p=0,626	p=1,000
100°C 9h (6/10)									p=0,302

100°C 1ml 29/05/13 mit 13+14/01/14	100°C 1-10h (10/10 bzw. 9/9)
100°C 1h (10/10) 29/05	p=1,000
100°C 2h (10/10)	p=1,000
100°C 3h (10/10)	p=1,000
100°C 4h (9/10)	p=1,000
100°C 5h (10/10)	p=1,000
100°C 6h (8/10)	p=0,456
100°C 7h (9/10)	p=1,000
100°C 8h (8/10)	p=0,456
100°C 9h (6/10)	p=0,094
100°C 10h (9/10)	p=1,000

Anhang 19 *C. sporogenes*: statistisch signifikante Unterschiede bei 100 °C und 121 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

100 zu 121	100°C 1ml 1,3,5h (30/30) 2h (29/29)	100°C 1ml 4,7,10h (28/29)	100°C 1ml 6,8h (28/30)	100°C 1ml 9h (25/29)
121°C 1ml 1h (3/19)	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001
121°C 1ml 2h (2/15)	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001
121°C 1ml 3h (3/20)	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001
121°C 1ml 4h (1/16)	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001
121°C 1ml 5-12h (0/10)	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001	p=<0,001

Anhang 20 *C. sporogenes*: Statistisch signifikante Unterschiede bei 134 °C

(Legende: Temperatur Medium / Zeitintervall (Wachstum/gültige Wiederholungen), signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$)

134°C 9ml 17/04/13 und 1ml 05/06/14	134°C 1ml 1-4h (0/10)
134°C 9ml 17/04/13 1,2,4h (0/10)	p=1,000
134°C 9ml 17/04/13 3h (1/10)	p=1,000

Anhang 21 Thesen

1. Zielstellung der Arbeit

Immer wieder gibt es in der Presse Meldungen, dass von Biogasanlagen ein Gesundheitsrisiko für Menschen und landwirtschaftliche Nutztiere durch die unbeabsichtigte Vermehrung pathogener Clostridien während der Fermentation in Biogasreaktoren ausgehen kann. Ziel der Promotion war die Untersuchung von Biogasanlagen (Substrate/Gärreste) auf das Vorhandensein vermehrungsfähiger Clostridien und die Klärung der Frage, ob die Hygienisierungsmaßnahmen für das Substrat ausreichend für die Inaktivierung pathogener Clostridien sind. Dazu wurde

- mittels eines Anlagenscreenings die In- und Outputs mikrobiologisch auf Vorhandensein pathogener Clostridien untersucht. Die Ergebnisse sollten die Eintrags- und Verbreitungswege pathogener Clostridien in Vergärungsanlagen aufzeigen.

und

- die Empfindlichkeit von Sporen pathogener Clostridien sollte in Hygienisierungsversuchen gegenüber hohen Temperaturen in Abhängigkeit verschiedener Verweildauern geprüft. Die Ergebnisse sollten die Wirksamkeit aktuell angewandter Hygienisierungsverfahren abklären und ggf. Anregungen zur Anpassung dieser Verfahren geben.

2. Hauptaussagen der Arbeit

Das Anlagenscreening ergab:

- Unabhängig von der Betriebsart und –temperatur sind pathogene Clostridien, wie *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. cadaveris*, *C. tertium*, *C. baratii*, *C. cochlearium*, *C. tepidum* und *C. paraputrificum*, sowohl in Input-, Fermenter- als auch in Gärrestproben nachweisbar.
- Als naher Verwandter von *C. botulinum* wurde *Clostridium sporogenes* in fast allen untersuchten Vergärungsanlagen identifiziert.
- Der Nachweis der Keime in fast allen Stufen der untersuchten Vergärungsanlagen ein Indiz dafür, dass die pathogenen Clostridien den gesamten Vergärungsprozess durchlaufen und bei der nachfolgenden Gärrestausbringung verschleppt werden könnten.

Aus den Hygienisierungsversuchen lässt sich ableiten, dass:

- der verwendete Stamm *C. sporogenes* eine höhere Toleranz gegenüber hohen Temperaturen aufweist als der genutzte Stamm *C. perfringens*.
- Die Sporen beider pathogenen Clostridien-Stämme überleben die standardmäßige Hygienisierungstemperatur von 70 °C über mindestens zehn Stunden.
- Die bislang vorgeschriebene Erhitzung von organischem Abfall in Biogasanlagen auf 70 °C über eine Stunde führt nicht zur Inaktivierung von Clostridiensporen, sie kann im Gegenteil sogar zur Hitzeaktivierung der Sporen führen.
- Bei *C. perfringens* war unter normalem Druck eine Temperatur von 121 °C über eine Zeit von einer Stunde zur einhundertprozentigen Inaktivierung erforderlich.
- Für *C. sporogenes* ergab sich bei normalem Druck eine Temperatur von 134 °C über eine Zeit von drei Stunden zur vollständigen Inaktivierung der Sporen.

3. Wissenschaftliche Wertung der Ergebnisse

Die Nachweise der Clostridien wurden durch die Verwendung des MALDI-TOFF-Verfahrens verifiziert.

Das Vorhandensein von *C. botulinum* kann nicht ausgeschlossen werden (Die Arbeiten liefen nicht komplett unter anaeroben Bedingungen, was zum Absterben empfindlicher *C. botulinum*-Subtypen vor der Isolation führen könnte. Oder die Anzahl war zu gering, um erfasst zu werden.).

Die Hitzeaktivierung von Sporen (Temperaturbereich der vorgeschriebenen Pasteurisierung) ist ein etabliertes mikrobiologisches Vorgehen zur Anregung der Auskeimung von Sporen.

Die Hitzeaktivierung kann zur Anreicherung der pathogenen Clostridien im anschließenden Fermentationsprozess führen (Temperaturbereich im Fermenter bietet optimale Bedingungen für Wachstum).

4. Allgemeine Bedeutung der Ergebnisse und Forderungen

Um wirksam Sporen pathogener Clostridien zu inaktivieren, müssen die gesetzlichen Vorgaben für die Hygienisierung bezüglich Sporen überdacht werden.

- Gegebenenfalls sind diese Hygienisierungsmaßnahmen nur bei Substraten, die besonderes Gefahrenpotential in sich tragen (wie zum Beispiel Bioabfall, tierische Exkremente, Schlachtabfälle) anzuwenden, um den Energieverbrauch zu minimieren.
- Es sollten Indikatorkeime, wie *C. perfringens*, *C. sporogenes* und *C. botulinum*, herangezogen werden, um Inputmaterialien für Biogasanlagen bewerten und daraus die erforderliche Hygienisierungsmaßnahme ableiten zu können.
- Grenzwerte für das Vorhandensein von pathogenen *Clostridien sp.* im Gärrest sollten festgelegt werden, wenn dieser auf Flächen zur Futtergewinnung ausgebracht werden soll.
- Die Anwendung von nicht untersuchten oder Grenzwert überschreitenden Gärresten auf Flächen zur Futtergewinnung (Grünfutter/Silage/Heu) müsste verboten werden.

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die offenen Fragen (Höhe der anzusetzenden Grenzwerte, die Auswahl der Indikatorkeime und die Kontrollverfahren) zu klären. Das Thema Gärrest(aus)wirkung wird aufgrund der Anzahl und Dichte von Biogasanlagen und der verwendeten Inputmaterialien aktuell bleiben und bedarf weiterer Forschung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Retgendorf, 27. September 2019