

## **Abschlussbericht des StMUGV-Projekts**

### **Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung**

#### **Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen**

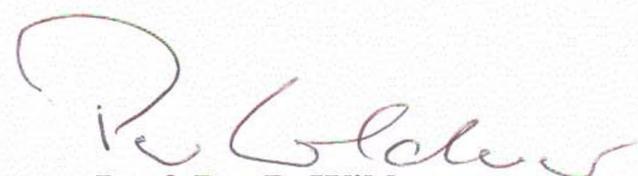
04.01.2006

überarbeitet am 25.09.2006 nach Absprache mit dem StMUGV

**Dr. Michael Lebuhn  
Prof. Dr. Peter Wilderer**

**Technische Universität München  
Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft  
Am Coulombwall  
85748 Garching**

  
**Dr. Michael Lebuhn**

  
**Prof. Dr. P. Wilderer**

## **Abschlussbericht des StMUGV-Projekts**

# **Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung**

## **Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen**

25.09.2006

**Dr. Michael Lebuhn  
Prof. Dr. Peter Wilderer**

**Technische Universität München  
Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft  
Am Coulombwall  
85748 Garching**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung: Hintergrund, Problemstellung und Zielsetzungen	1
1.1 Hintergrund der Studie	1
1.2 Problemstellung und Zielsetzungen	2
1.2.1 Routinebetrieb in der Praxis	2
1.2.2 Reduktion bakterieller Keimzahlen und geeignete Verfahren	2
1.2.3 Einsatz von Molekularbiologie, qPCR	3
1.2.4 Problematik widerstandsfähiger Krankheitserreger	4
1.2.5 Rückverkeimung im Endlager	5
1.2.6 Auswirkungen im Boden	5
1.2.7 Lysimeterstudien, Keimverlagerung in Böden und Lufthygiene	5
2 Material und Methoden	6
2.1 Beschreibung der Untersuchungsobjekte	6
2.1.1 Fermenterketten	6
2.1.1.1 Pilotanlage Berbling	6
2.1.1.2 Modellanlage	7
2.1.1.3 Modell-Endlagerversuch	8
2.1.2 Boden-Beprobung	8
2.1.2.1 Berblinger Standorte	8
2.1.2.2 Lysimeter Oberschleißheim	10
2.1.2.3 Bayerische Grünlandstandorte	10
2.2 Probenahme und -vorbehandlung	11
2.2.1 Vorgrube- Fermenter- und Endlagerproben	11
2.2.2 Bodenproben	11
2.3 Mikrobiologische und molekularbiologische (qPCR) Untersuchungen	12
2.3.1 Untersuchte Parameter	12
2.3.1.1 Berblinger Pilotanlage, Monitoring und Chargenversuche	13
2.3.1.2 Modellanlage, Keimträgerversuche, Wasserbadexperimente	14
2.3.1.3 Modell-Endlagerversuch	14
2.3.1.4 Bodenproben	14
2.3.2 Kultivierungsabhängige Verfahren	14



2.3.2.1	Coliforme und fäkalcoliforme Bakterien .....	14
2.3.2.2	Intestinale und Gesamt-Enterokokken .....	15
2.3.2.3	Thermophile <i>Campylobacter</i> .....	15
2.3.2.4	<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	16
2.3.2.5	<i>Bacillus cereus</i> (-Gruppe) .....	16
2.3.2.6	<i>Clostridium perfringens</i> .....	16
2.3.2.7	<i>Cryptosporidium parvum</i> .....	17
2.3.2.7.1	Reinigung der Oozysten über Kochsalzflotation (nach Passage).....	17
2.3.2.7.2	Exposition in Diffusions-Keimträgern .....	18
2.3.2.7.3	Reinigung der Oozysten aus den Keimträgern über Percoll-Gradienten-Zentrifugation.....	18
2.3.2.7.4	Zellkultur und Infektion in vitro.....	18
2.3.2.7.5	Zellkultur-PCR.....	19
2.3.2.7.6	Zellkultur-Immunfluoreszenz.....	19
2.3.2.7.7	(Fähigkeit zur) Exzystierung.....	20
2.3.2.7.8	Membranintegrität (Vitalfärbung).....	20
2.3.2.8	<i>Giardia duodenalis</i> .....	20
2.3.2.9	Rotaviren .....	20
2.3.2.10	<i>Enterovirus</i> .....	20
2.3.2.11	<i>Norovirus</i> .....	21
2.3.3	Molekularbiologische, (RT)qPCR basierte quantitative Nachweise.....	21
2.3.3.1	Extraktion von Nukleinsäuren.....	21
2.3.3.1.1	Extraktion von DNA .....	22
2.3.3.1.2	Extraktion von RNA (viral, eukaryontische mRNA).....	24
2.3.3.2	Quantitative Real-Time PCR (qPCR), optional mit vorgeschalteter reverser Transkription (RTqPCR).....	24
2.3.3.2.1	Phylogenetische (fluorogene) Primer und phylogenetische fluorogene Hydrolyse-Sonden.....	24
2.3.3.2.2	(RT)qPCR.....	25
2.3.3.2.3	Standard Spiking von Umweltproben und Quantifizierung.....	26
3	Ergebnisse und Diskussion .....	27
3.1	Pilotanlage Berbling .....	27
3.1.1	Fäkalcoliforme (Keimzahlen) und <i>Escherichia coli</i> (DNA) .....	27
3.1.1.1	Monitoring Pilotanlage Berbling.....	27
3.1.1.2	Monitoring Modellanlage.....	30
3.1.1.3	Chargenversuche und Wiederverkeimung .....	31
3.1.1.4	Modell-Endlagerversuch .....	33



3.1.1.5	Diskussion: Fäkalcoliforme und <i>E. coli</i> .....	34
3.1.2	Coliforme (Keimzahlen) und <i>Enterobacteriaceae</i> (DNA).....	35
3.1.3	Intestinale Enterokokken, Gesamt-Enterokokken, <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> .....	40
3.1.4	Thermophile <i>Campylobacter</i> .....	45
3.1.5	<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	46
3.1.6	<i>Bacillus cereus</i> -Gruppe .....	47
3.1.7	<i>Clostridium perfringens</i> .....	50
3.1.8	<i>Cryptosporidium parvum</i> .....	53
3.1.8.1	Monitoring, Berblinger Pilotanlage.....	53
3.1.8.2	Keimträgerexperimente und Wasserbadversuche .....	54
3.1.8.2.1	Wasserbadversuche .....	54
3.1.8.2.2	Keimträger-Experimente.....	57
3.1.9	<i>Giardia duodenalis</i> .....	60
3.1.10	Rotaviren .....	61
3.1.11	<i>Enterovirus</i> .....	61
3.1.12	<i>Norovirus</i> .....	61
3.2	Bodenproben.....	62
3.2.1	Fäkalcoliforme.....	63
3.2.2	Coliforme.....	64
3.2.3	Intestinale (und Gesamt-) Enterokokken.....	66
3.2.4	<i>Bacillus-cereus</i> (Gruppe) .....	68
3.2.5	<i>Clostridium perfringens</i> .....	70
4	Übergreifende Diskussion .....	74
4.1	Mikrobiologische Methodik .....	74
4.2	Hygienisierungsleistung der Berblinger Biogasanlage .....	74
4.3	Effekte der Gärrest-Ausbringung im Boden.....	76
4.4	Fazit.....	77
5	Referenzen.....	80



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Biogasanlage Berbling mit Probenahmepunkten .....	6
Abbildung 2: Lageplan der Versuchsflächen für die Bodenbeprobungen .....	9
Abbildung 3: Wiederfindungsraten für <i>Cryptosporidium parvum</i> Oozysten-DNA in Abhängigkeit verschiedener Extraktion .....	23
Abbildung 4: Typische Ansätze für die (RT)qPCR .....	25
Abbildung 5: <i>Escherichia coli</i> (Genome) und Fäkalcoliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring.....	28
Abbildung 6: Fäkalcoliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage	29
Abbildung 7: Jahreszeitlicher Gang der Fäkalcoliformen, <i>E. coli</i> -Genome in der Vorgrube der Berblinger Biogasanlage .....	30
Abbildung 8: Fäkalcoliforme, Modellanlage, Monitoring .....	31
Abbildung 9: <i>Escherichia coli</i> (DNA) und Fäkalcoliforme, Chargenversuche, Pilotanlage Berbling.....	32
Abbildung 10: Fäkalcoliforme, Chargenversuche, kumulierte Reduktion, Pilotanlage Berbling .....	33
Abbildung 11: Fäkalcoliforme, Endlagerversuche.....	34
Abbildung 12: <i>Enterobacteriaceae</i> (Genome) und Coliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring.....	35
Abbildung 13: Coliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage.....	36
Abbildung 14: Coliforme, Modellanlage, Monitoring .....	36
Abbildung 15: Chargenversuche zu <i>Enterobacteriaceae</i> (DNA) und Coliformen, Pilotanlage Berbling.....	38
Abbildung 16: Coliforme in den Chargenversuchen, kumulierte Reduktion in der Berblinger Pilotanlage.....	39
Abbildung 17: Coliforme, Endlagerversuche.....	39
Abbildung 18: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> (qPCR), Pilotanlage Berbling, Monitoring.....	41
Abbildung 19: Gesamt- und intestinale Enterokokken im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage.....	42
Abbildung 20: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> (qPCR), Pilotanlage Berbling, Chargenversuche .....	43



Abbildung 21: Gesamt- und intestinale Enterokokken, kumulierte Reduktion in den Chargenversuchen, Berblinger Pilotanlage.....	44
Abbildung 22: Thermophile <i>Campylobacter</i> und <i>C. jejuni</i> , Monitoring, Pilotanlage Berbling .....	45
Abbildung 23: <i>Yersinia enterocolitica</i> , Monitoring, Pilotanlage Berbling.....	47
Abbildung 24: <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe, Kultivierung und qPCR, Pilotanlage Berbling, Monitoring.....	48
Abbildung 25: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe, Pilotanlage Berbling, Monitoring.....	49
Abbildung 26: <i>Clostridium perfringens</i> , Monitoring, Pilotanlage Berbling.....	50
Abbildung 27: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, <i>Clostridium perfringens</i> , Pilotanlage Berbling, Monitoring .....	52
Abbildung 28: <i>Cryptosporidium parvum</i> -DNA, qPCR-Monitoring, Pilotanlage Berbling.....	53
Abbildung 29: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Wasserbadexperimente, Exzystierbarkeit in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen.....	54
Abbildung 30: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Wasserbadexperimente, Infektiosität in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen.....	55
Abbildung 31: Einfluss 1-stündiger Einwirkzeit auf <i>Cryptosporidium parvum</i> Oozysten, Wasserbadexperiment .....	56
Abbildung 32: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Keimträger-Experiment 1, Modellanlage, qPCR, Exzystierbarkeit, Vitalfärbung und Zellkultur-PCR .....	57
Abbildung 33: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Keimträger-Experiment 3, Modellanlage, lichtmikroskopische Zählung, qPCR, Exzystierbarkeit und Zellkultur-Immunoassay....	59
Abbildung 34: Bodenproben Berbling, Gehalte an Fäkalcoliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen .....	63
Abbildung 35: Bodenproben Berbling, Gehalte an Coliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen.....	65
Abbildung 36: Bodenproben Berbling, Gehalte an intestinalen Enterokokken kumuliert über die analysierten Tiefenstufen .....	67
Abbildung 37: Vertreter der <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe in den Böden der Berblinger Standorte und im Lysimeter-Boden.....	69
Abbildung 38: Bodenproben Berbling, Gehalte an <i>Clostridium perfringens</i> kumuliert über die analysierten Tiefenstufen .....	71
Abbildung 39: Bodenproben Berbling, Lysimeter, Bayerische Wiesenböden, Gehalte an <i>Clostridium perfringens</i> kumuliert über die analysierten Tiefenstufen.....	73



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: gesicherte minimale Verweilzeit und mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern .....	7
Tabelle 2: Termine der Probenahmen und jeweils letzten Düngung für die Versuchsvarianten mit Lage der Entnahmestellen.....	10
Tabelle 3: Bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage des Lysimeters und der Bayerischen Wiesenstandorte .....	11
Tabelle 4: Untersuchte mikrobiologische und virale Parameter .....	13



## Abkürzungsverzeichnisverzeichnis

ABNC: Active but not cultivable, aktiv aber nicht kultivierbar

AK: Antikörper

ANOVA: One-way analysis of variance, einfaktorielle Varianzanalyse

BB: Bead-beating

BcG: *Bacillus cereus*-Gruppe

BHKW: Blockheizkraftwerk

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol

dH<sub>2</sub>O: Destilliertes Wasser

DüV: Düng-Verordnung

EHEC: Enterohämorrhagische *Escherichia coli*

EIA: Enzym-Immunoassay

EMBL-EBI: European Bioinformatics Institute

6-FAM: 6-carboxyfluorescein

FB: Feuchtboden

FCV: Felines Calicivirus

FITC: Fluoreszein-Isothiocyanat

Gg: Genogruppe

GITC: Guanidinium-Isothiocyanat

HBSS: Hank's balanced salt solution

IAB-1f: Institut für Agrarökologie, Ökologischer Landbau und Bodenschutz an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft

IPL: Institut für Parasitologie, Leipzig

LfL-ILT: Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft

KBE: koloniebildende Einheiten

KuLaP: Kulturlandschaftspflege-Programm

LGL: Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim

mAK: monoklonaler Antikörper

MGRT: Minimal guaranteed retention time, Minimale gesicherte Verweilzeit

MPN: Most probable number, höchst wahrscheinliche (Keim)Zahl

MPN-qPCR: qPCR mit vorgeschalteter (selektiver) Kultivierung und MPN-Auswertung

PBS: Phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR: Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion

pv.: Pathovar

PI: Propidium-Iodid



qPCR: Quantitative Real-Time-PCR, Echtzeit-PCR

ROX: 6-carboxyrhodamine X

RT: Reverse Transkription

RTqPCR: Quantitative Real-Time-PCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription

sPCA: selektives Preston *Campylobacter* Anreicherungsmedium

STEC: Shiga-toxinogene *Escherichia coli*

StMLF: Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten

StMLU: Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen (jetzt StMUGV)

StMUGV: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz

StwRo: Stadtwerke Rosenheim

TAMRA: 6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine

TB: Trockenboden

TMR: Total mixed ration

TUM-SWW: Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (vormals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der Technischen Universität München

WZ: Wasserschutzgebiets-Zone



## Zusammenfassung

Zentraler Inhalt des Kooperationsprojekts war es, die speziell für Hygienisierung konzipierte Pilot-Biogasanlage bei Berbling im Praxisbetrieb auf Hygienisierungsleistung zu evaluieren. Fragen der Prozesseffizienz, der Dynamik von Gülle und Gärrest im Boden von Lysimetern sowie der Lyfthygiene wurden von den Kooperationspartnern bearbeitet. Die Ergebnisse dazu finden sich in separaten Berichten der Partner. Die wesentliche mikrobiologische Fragestellung war, ob der produzierte Gärrest eine hygienische Qualität aufwies, die nach wissenschaftlichen Erkenntnissen eine Ausbringung in sensiblen Gebieten wie (bestimmten Ausgleichsflächen in) der Wasserschutzzone II (WZ II) ermöglichen könnte. Bei verbesserter hygienischer Gärrest-Qualität könnte die Technik auch wesentlich zur Umsetzung von Forderungen der Wasserrahmenrichtlinie beitragen. Sie könnte z.B. im Zustrombereich von Badegewässern sowie in weiteren Schutzzonen in Karstgebieten eingesetzt werden, um die diffuse landwirtschaftliche Belastung zu verringern und den hygienischen Status der Einzugsgebiete zu verbessern.

Die untersuchten Kompartimente der Berblinger Biogasanlage bestanden aus einer Vorgrube, einem mesophilen Fermenter (F1) und in der Folge einem länglichen thermophilen Fermenter (F2), einem weiteren mesophilen Fermenter (F3) und dem Endlager. Das entscheidende Glied für die Hygienisierungseffizienz war der F2, der etwa ab Mitte der Projektlaufzeit mit optimaler Temperaturführung (55°C gesichert) betrieben werden konnte. Bis Mitte Februar 2004 wurden für den F2 immer wieder Ausfälle der Beheizung (Abfall teilweise auf 48°C), der Rührung und der Beschickung festgestellt, weshalb die Ergebnisse für diesen Zeitraum als Unfall-Szenario betrachtet werden können. Die gesicherte Verweilzeit im F2 betrug 8 - 9 h.

Die mikrobiologischen Untersuchungen sollten nach Möglichkeit anhand der nativen Populationen in Gülle durchgeführt werden. Dabei sollten klassische und parallel quantitative molekularbiologische Methoden eingesetzt werden, zum einen, um die Ergebnisse gegenseitig zu bestätigen, zu anderen, um eine Bildung aktiver aber nicht-kultivierbarer Zellen (ABNC) durch den Stress in den Fermentern zu evaluieren. Untersuchte Parameter waren Coliforme, *Enterobacteriaceae*, Fäkalcoliforme, *Escherichia coli*, intestinale Enterokokken, *Enterococcus faecalis* + *E. faecium*, thermophile *Campylobacter*, *Bacillus cereus*-Gruppe, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium parvum*, Rotaviren, *Enterovirus* und *Norovirus*. Zum Methodischen zeigte sich, dass über quantitative Real-Time PCR mit DNA als Zielmolekül (qPCR) zwar spezifische DNA präzise auch in Umweltproben quantifiziert werden kann und sich die Methode daher hervorragend zum Screening in äquilibrierten Systemen eignet. Die Methode differenziert jedoch bei direkter Extraktion von DNA aus den Proben nicht zwischen DNA aus toten und lebenden Zellen, weswegen sich nach (lethalem) Stress eine Überschätzung um den Anteil abgestorbener Zellen ergibt. Bei starkem Stress kann diese massiv sein. Der Einsatz von MPN-qPCR nach (selektiver) Voranreicherung erwies sich hier als zielführend. Den Daten für (Fäkal)Coliforme zufolge unterschätzte konventionelle (selektive) Kultivierung ABNC um 1 log<sub>10</sub>-Stufe, der genaue Betrag der Unterschätzung muss allerdings (noch) offen bleiben.

Zusätzlich zur Berblinger Pilotanlage wurde eine maßstäblich 1:6 reduzierte Modellanlage (ohne Endlager, konstant optimaler Betrieb des F2 bei 55°C) betrieben und zur Absicherung der Ergebnisse für die Pilotanlage auf Coliforme und Fäkalcoliforme untersucht. In der Modellanlage wurden auch Diffusions-Keimträger-Versuche zur Inaktivierung von Kryptosporidien-Oozysten durchgeführt. Dabei wurden verschiedene etablierte und neue Techniken eingesetzt, von denen sich vor allem ein vom Institut für Parasitologie, Leipzig, entwickelter und durchgeführter Zellkultur-Immunfluoreszenzassay als zuverlässig und zur Dokumentation einer Infektiositäts-Reduzierung um mehrere log-Stufen als geeignet erwies.



Da Gülle von gesundem Milchvieh vergoren wurde, konnten im Praxis-Material keine Krankheitserreger oder nur eine geringe Konzentration Pathogener nachgewiesen werden. Damit ließ sich für diese Pathogenen auch nicht die gewünschte Reduktion um 4 - 5 log-Stufen durch die Berblinger Anlage dokumentieren. Der Gärrest war jedoch in allen Proben frei von thermophilen *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium parvum*, Rotaviren, *Enterovirus* und *Norovirus*. Infektiöse *C. parvum*-Oozysten wurden im Wasserbad bereits nach 1 h 55°C um über 5 log-Stufen reduziert. In Gülle bzw. Fermentermaterial lagen die Inaktivierungsraten prinzipiell höher als bei Verwendung reiner Suspension, entsprechend wurde in den Keimträgerversuchen in allen untersuchten Varianten mit 55°C-Phase (getestet 4 h, 12 h) eine Inaktivierung infektiöser *C. parvum*-Oozysten um > 5 log-Stufen erzielt. Die Temperatur war der dominante Inaktivierungsfaktor, eine entsprechende mesophile Behandlung war generell wesentlich ineffizienter.

In der Berblinger Pilotanlage (sowie der Modellanlage) wurden bei gesicherten 55°C im F2 Fäkalcoliforme von ca.  $10^5$  MPN / mL um 4,5 – 5 log-Stufen und Coliforme von ca.  $10^5$  MPN / mL um ca. 4 log-Stufen reduziert. Für beide Parameter ergab sich dabei Badegewässerqualität. Die Wiederverkeimung im mesophilen F3 bzw. im Endlager war bei optimalem Betrieb mit < 0,5 log-Stufen vernachlässigbar. Bei suboptimaler Temperaturführung im F2 ergab sich dagegen teilweise eine erhebliche Wiederverkeimung um über 2 log-Stufen im F3 bzw. Endlager. Wegen ihrer ausgeprägten Fähigkeit zu Rückverkeimung wird vorgeschlagen, Coliforme/Fäkalcoliforme als Parameter zur Prozessüberwachung im Gärrest zu untersuchen, wenn dieser in sensiblen Gebieten ausgebracht werden soll.

Intestinale Enterokokken wurden bei gesicherten 55°C im F2 von ca.  $10^{4,3}$  KBE / mL um 2,5 – 3 log-Stufen reduziert, bei suboptimalem Betrieb des F2 um 2,5 log-Stufen, wobei im Endlager Wiederverkeimung um etwa 0,5 log-Stufen (bei suboptimalem etwas mehr als bei optimalem Betrieb) auftrat. Badegewässergüte wurde hier nicht erreicht, die intestinalen Enterokokken wurden aber bei optimalem Betrieb des F2 auf eine offenbar sehr thermotolerante und stabile Fraktion von etwa 50 KBE / mL reduziert, was betragsmäßig auch der natürlichen Hintergrundbelastung in Dränwässern ungedüngter Ackerstandorte entspricht. Bei suboptimalem Betrieb des F2 lagen die intestinalen Enterokokken mit ca. 100 - 200 KBE / mL etwas über dieser Hintergrundbelastung. Die relativ geringen für die Berblinger Pilotanlage gemessenen Reduktionsraten sind über die geringen Anfangsgehalte in der Rohgülle, die 2-phasige Inaktivierungskinetik intestinaler Enterokokken und die Höhe der thermostabilen Residualfraktion zu erklären. Anhand bekannter D-Werte (unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommen) ließ sich errechnen, dass der Berblinger F2 bei optimalem Betrieb (55°C, gesicherte Verweilzeit 8,5 h) und entsprechend hohem Anfangsgehalt eine Reduktion intestinaler Enterokokken um 5 log-Stufen bewirkt hätte. Den Erkenntnissen zufolge eignen sich die intestinalen Enterokokken wegen ihrer höheren Tenazität hervorragend als Indikator für die Inaktivierung praktisch aller hygienerelevanter Viren, Parasiten und Bakterien (Ausnahme Sporenbildner, s.u.). Es wird daher vorgeschlagen, intestinale Enterokokken sowohl als Parameter zur direkten Prozesskontrolle als auch zur Produktprüfung im Gärrest zu untersuchen, wenn dieser in sensiblen Gebieten ausgebracht werden soll.

Die Gehalte der Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe (BcG) und *Clostridium perfringens* blieben in der Berblinger Pilotanlage mit ca.  $5 \times 10^3$  und ca.  $10^3$  KBE / mL praktisch unverändert. Vertreter beider Gruppen sind ubiquitäre bakterielle Tier- bzw. Zersetzungs-assoziierte aerobe bzw. anaerob-thermophile Sporenbildner. Eine Anreicherung dieser potentiell pathogenen Organismen nach Gärrest-Düngung im Boden über den natürlichen Hintergrund hinaus war nicht nachweisbar (s.u.). Bei Fütterung von Milchvieh mit pflanzlicher Nahrung wird daher die Ausbringung von Gärrest aus deren Gülle (evtl. in Co-



Vergärung mit nachwachsenden pflanzlichen Rohstoffen) hinsichtlich dieser Parameter als unkritisch gesehen. Wenn allerdings im Ausgangsmaterial eine Kontamination v.a. mit Kot von Fleischfressern oder durch Fütterung mit tierischen Produkten zu vermuten ist, sollten die Gärreste ohne eine Überprüfung nicht in sensiblen Bereichen ausgebracht werden. Für solches Gärgut wird vorgeschlagen, solange Produkt- oder Substratkontrollen mit *C. perfringens* als Leitparameter durchzuführen (s.u.), bis eine Anreicherung des Bodens oder des Drän-, Sicker- oder Grundwassers mit diesen Sporenbildnern infolge Ausbringung des Gärrests wissenschaftlich fundiert abgeklärt ist.

Den Ergebnissen zufolge ist eine mehrstufige Prozessführung nicht nötig, um die erwünschte Hygienisierung zu erreichen, hierzu kann offenbar auch ein einstufig thermophiler Betrieb bei gesicherten  $\geq 55^\circ\text{C}$  und minimaler gesicherter Verweilzeit von  $> 4$  h (besser 8 - 9 h) ausreichen. Die Aufrüstung einer Biogasanlage mit weiteren Stufen über die thermophile Hygienisierungsstufe hinaus verstärkt allerdings die Hygienisierungsleistung und kann über den weiterführenden Substrataufschluss auch zu einer verbesserten Energiebilanz dienen.

Um erste Ergebnisse zu möglichen Effekten von Gärrest-Ausbringung im Boden zu erhalten, wurden Bodenproben von Gülle- und Gärrest-gedüngten Plots bis 1 m Bodentiefe klassisch-mikrobiologisch auf Coliforme, Fäkalcoliforme und intestinale Enterokokken sowie später auch auf *C. perfringens* und *BcG*-Vertreter untersucht. Zur Einschätzung der natürlichen Hintergrundbelastung dienten Bodenproben der WZ I und (teilweise) von einem Lysimeter sowie von verschiedenen Grünlandstandorten als Kontrollen. Eine zu Beginn angelegte Verlaufskontrolle konnte nicht gehalten werden. Die Ergebnisse sind wegen der Kürze des Beobachtungszeitraums und der teilweise hohen Variabilität im Boden als vorläufig zu betrachten.

Es konnten keine eindeutig negativen Effekte der Gärrest-Ausbringung im Boden festgestellt werden. Die Gehalte der untersuchten Parameter im Gärrest-Plot waren nicht von denen im Boden der WZ I verschieden. Höhere Gehalte intestinaler Enterokokken, *BcG*-Vertreter und *C. perfringens* schienen eher auf den Besatz mit Bodentieren bzw. deren Exkremete als auf die Düngung zurückzuführen zu sein. Allerdings ergaben sich in einzelnen Fällen Hinweise, dass es nach Gülle-Düngung zu einer Anreicherung mit diesen Organismen im Boden kommen kann.

Zur Absicherung der Werte für die natürliche Hintergrundbelastung sind weitere Untersuchungen dringend erforderlich, insbesondere für intestinale Enterokokken, *BcG*-Vertreter und *C. perfringens*. Hier sollten *C. botulinum* und *C. tetani* eingeschlossen werden. Es sollte auch über Tiefenbohrungen und Analyse des Grundwasserstroms insbesondere für die Sporenbildner geprüft werden, inwieweit Oberflächen-Düngung in verschiedenen Umweltszenarien - insbesondere in Folge eines Starkregens nach längerer Trockenperiode - Standort-spezifisch erhöhte Werte im Grundwasser verursacht. Entsprechende Daten sollten auch für Drän- und Sickerwässer erhoben werden. Ohne solche Ergebnisse lassen sich eventuelle Düngungs-Effekte nicht auf solider Basis diskutieren. Wünschenswert wären dabei auch Erkenntnisse zum Schicksal von Xenobiotika wie Arzneimittelrückständen und Mycotoxinen bei anaerob thermophiler Vergärung und Ausbringung des Gärrests auf den Boden. Auch eine Nitrifikation nach Gärrest-Ausbringung und eine Verlagerung des Nitrats in den Grundwasserstrom sollte untersucht werden.

Den Ergebnissen zur Hygiene zufolge ist eine Ausbringung von Gärresten statt unbehandelter Wirtschaftsdünger in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten wie der weiteren Schutzzone im Karst und im Einzugsgebiet von Badegewässern sehr zu begrüßen. Für möglichst optimale Hygienisierungsergebnisse, auch im Hinblick auf eine mögliche Auswaschung von nicht abgetöteten Mikroorganismen in das Grundwasser, sollen insbesondere folgende Prüfkriterien beachtet werden:



### A: Standortprüfung

- Die hydrogeologische Situation sollte einen direkten Kurzschluss zum Grundwasserstrom ausschließen:
  - keine Gärrestausbringung z.B. über Karst, Kies oder Grobsand mit direktem Grundwasseranschluss,
  - bei Böden mit typischerweise ausreichender Überdeckung und Filtereigenschaft sollten bodenart- und witterungsbedingte Ausschlussfälle im Rahmen von standortbezogenen Hinweisen zur Gärrestapplikation für Beratung und Praxis differenziert definiert werden. Gärrest sollte z.B. nicht auf einem tonreichen Boden nach längerer Trockenheit (Schwundrissebildung) ausgebracht werden.

### B: Baumusterprüfung

- Das Verfahren sollte bei thermophil anaerober Vergärung eine minimale gesicherte Verweilzeit (MGRT) von  $> 4$  h bei gesicherten  $\geq 55^\circ\text{C}$  im thermophilen Fermenter beinhalten (um einen Toleranzspielraum freizuhalten wären 8 - 9 h MGRT oder eine höhere Temperatur wünschenswert), alternativ eine Pasteurisierung oder einen adäquaten Schritt. Vorgeschlagene Technologien sollten im Rahmen einer Baumusterprüfung die geforderte MGRT nachweisen. Kurzschlüsse während des Prozesses sind auszuschließen (in Rührkessel-Fermentern bestimmt das Beschickungs-Intervall die MGRT), nach der thermophilen (oder adäquaten) Hygienisierungs-Stufe muss Schwarz-Weiß-Trennung gegeben sein.

### C: Prozesskontrolle

- Die Prozesstemperatur von  $\geq 55^\circ\text{C}$  sollte im Betrieb on-line verfolgt und dokumentiert werden (indirekte Prozesskontrolle)
- Eine zumindest einmalig nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) exemplarisch vorgenommene direkte Prozesskontrolle sollte die Reduktion intestinaler Enterokokken um  $> 4 \log_{10}$ -Stufen demonstrieren. Die Reduktion kann ggf. mit Hilfe in den Fermenterinhalt eingebrachter Keimträger mit  $10^6 - 10^7$  KBE *Enterococcus faecium* / mL nachgewiesen werden, wobei die für den Betrieb vorgesehene MGRT ( $> 4$  h) als Verweilzeit dient.

### D: Substrat-und Endproduktkontrolle

- Substrat ist Rindergülle von gesundem Milchvieh, ggf. unbefallene nachwachsende pflanzliche Rohstoffe aus biologischer Produktion (in Mischung mit solcher Rindergülle).
- Nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) sollte eine etwa 2 Wochen vor Ausbringung vorgenommene Produktprüfung (Endlagerprobe) dem Gärrest folgende Qualitäten bestätigen:
  - $< 150$  intestinale Enterokokken / mL (Membranfilter, Kultivierung auf Äsculin-Galle-Agar nach Slanetz-Bartley-Agar, s. 2.3.2.2),
  - $< 5$  Fäkalcoliforme / mL und/oder  $< 100$  Coliforme / mL (Fluorocult®-System, s. 2.3.2.1),
  - optional bei unklarer Herkunft des Gärguts, v.a. bei nicht ausgeschlossener Kontamination mit Kot von Fleischfressern:  $< 3000$  *Clostridium perfringens* / mL (TSCF-Plattenguss, s. 3.1.7).



Diese Endproduktprüfung sollte bei gleichbleibender Prozessführung in der Anlage 1x jährlich wiederholt werden, insbesondere nach der Winterpause vor der ersten Frühlingsdüngung.

#### E: Betriebsänderungen

- Im Falle von Änderungen des Anlagenbetriebs sollte der unter den neuen Bedingungen produzierte Gärrest erst dann ausgebracht werden, wenn Prozess- und Endproduktkontrollen keine Beanstandungen ergaben.

Bei Einhaltung dieser Maßgaben kann auf Basis der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnislage davon ausgegangen werden, dass von der Gärrest-Ausbringung in landwirtschaftlich üblicher Dosierung keine hygienisch relevante Gefährdung des Grundwasserstroms oder von Oberflächengewässern ausgeht. Sollten aktuellere Informationen insbesondere zu einer Anreicherung von Sporenbildnern im Boden und/oder im Drän-, Sicker- und Grundwasserstrom bzw. im Trinkwasser infolge Düngung mit Gärrest vorliegen, müsste die vorgeschlagene Konzeption neu überdacht werden.



# **1 Einleitung: Hintergrund, Problemstellung und Zielsetzungen**

## **1.1 Hintergrund der Studie**

Um in Zukunft die Versorgung der Bevölkerung mit hygienisch unbedenklichem und schadstofffreiem Trinkwasser gewährleisten zu können, werden auch in Bayern (Umsetzung der Beschlüsse des Rio-Gipfels in der Bayern-Agenda 21, STMLU, 1998) geänderte Anforderungen an den Bereich des Gewässerschutzes gestellt. 3,2 % (zukünftig 5 %) der Landesfläche von Bayern sind als Wasserschutzgebiete ausgewiesen, wovon 32 % als Acker- und 23 % als Grünland landwirtschaftlich genutzt werden. Mit der vorhandenen Tierhaltung fallen Wirtschaftsdünger an, die verwertet oder entsorgt werden müssen. Hieraus ergibt sich ein Spannungsfeld zwischen Land- und Wasserwirtschaft. In Zusammenhang mit der Erweiterung der Wasserschutzgebiete kann dies zu Konflikten mit landwirtschaftlichen Interessen führen, z.B. wenn aktuell landwirtschaftlich genutzte Fläche der engeren Schutzzone (Zone II) von Wasserschutzgebieten zugeordnet wird. Zum Schutz des Trinkwassers ist in Bayern in der Wasserschutzzone II die Ausbringung von Wirtschaftsdünger verboten (ANONYMUS, 1994).

In diesem Zusammenhang sind auch Zielsetzungen der Wasserrahmenrichtlinie zu sehen, Belastungen z.B. von Badegewässern durch diffuse Quellen aus der Landwirtschaft zu minimieren. Solche Belastungen stammen vor allem von Betrieben mit Tierhaltung und/oder Gülledüngung, wobei der Zustrom über Abschwemmung, Drän- oder Sickerwässer erfolgen kann (WEIß und POPP, 2004) oder durch schnelle Perkolation z.B. im Karst.

Für betroffene Betriebe würde ein Ausbringverbot ökonomische Einbußen und Wertminderung der Grundstücke zur Folge haben, es kann (bei hoher betrieblicher Viehbesatzdichte) zu Zielkonflikten mit der DüV kommen, und es werden bestehende Nährstoffkreisläufe unterbrochen. Für die Wasserwirtschaft bedeutet dies einen erhöhten Überwachungsaufwand, eventuell steigende Ausgleichszahlungen und einen Akzeptanzverlust bei den betroffenen Bauern.

Als Voraussetzung für eine Lockerung dieses Ausbringungsverbotes in Einzelfällen wird von den zuständigen Behörden eine präventive Behandlung der Gülle angeführt, die eventuell vorhandene pathogene Organismen so weit reduziert, dass für das Trinkwasser keine Gefährdung zu erwarten ist. Hintergrund ist, dass die Landwirtschaft als diffuse Quelle vor allem für die Grundbelastung eines Wassereinzugsgebietes mit pathogenen Mikroorganismen (wie auch mit Nähr- und Schadstoffen) verantwortlich gemacht wird. Da viele Infektionen von landwirtschaftlichen Nutztieren mit Beteiligung des Verdauungstraktes verlaufen, stellen Ausscheidungen der Tiere, die in Form von Stallmist, Jauche und Gülle anfallen, ein potentiell Reservoir für die Ausbreitung von Seuchen- und Krankheitserregern dar (STRAUCH, 1996). Eine Quantifizierung des tatsächlichen Eintrags von Krankheitserregern ist jedoch im Einzelfall sehr schwierig (LENHART, 2001). Hierüber sollte die vorliegende Studie Aufschluss geben.

Die Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG, die Stadtwerke Bad Aibling und die Stadt Kolbermoor betreiben im Gewinnungsgebiet „Willinger Au“ zwölf wasserrechtlich genehmigte Brunnen. Zur Untersuchung der Grundwasserverhältnisse im unteren Mangfalltal im Hinblick auf geplante Entnahmesteigerungen aus den Wassergewinnungsanlagen, sowie zur Sicherung dieses Grundwasservorkommens im Hinblick auf konkurrierende Nutzung wurden vom Lehrstuhl für Hydraulik und Gewässerkunde der TU-München die Grundwassermodelle „Unteres Mangfalltal“ und „Willinger Au“ erstellt. Die mit Hilfe dieser Modelle gewonnenen Erkenntnisse machen deutlich, dass die für die Gewinnungsanlagen der



Stadtwerke Rosenheim, Stadtwerke Bad Aibling und der Stadt Kolbermoor ausgewiesenen Schutzgebiete keinen ausreichenden Schutz darstellen. Bei den in dem Gebiet ermittelten hohen Abstandsgeschwindigkeiten im Grundwasserleiter und wegen des Fehlens schützender Deckschichten sind die bestehenden Schutzgebiete nicht ausreichend dimensioniert. Deshalb hatten die Stadtwerke Rosenheim, die Stadtwerke Bad Aibling und die Stadt Kolbermoor im Gewinnungsgebiet „Willinger Au“ die Ausweisung eines gemeinsamen Schutzgebietes mit den Zonen I, IIa, IIb, IIIa und IIIb beantragt. Da sich jedoch die politische Umsetzung der vorgeschlagenen Unterteilung als problematisch erweist, wird nach Alternativlösungen gesucht, zu denen die vorliegende Studie Entscheidungshilfen geben soll.

Aus Anlass der Erweiterung des Wasserschutzgebietes für die Wassergewinnungsanlagen der Stadtwerke Rosenheim, Bad Aibling und der Stadt Kolbermoor sollte die Möglichkeit ergriffen werden, den Kenntnisstand über Verfahrenskenndaten, Kostenstruktur, logistische Notwendigkeiten, Energieausbeute und Nutzungseffizienz aber vor allem über Auswirkungen auf die Umwelt einer hinsichtlich hygienischer Parameter zu optimierenden landwirtschaftlichen Biogasanlage deutlich zu erweitern. Dies erfolgte im Rahmen des Verbundprojekts der Stadtwerke Rosenheim (StwRo), des Instituts für Landtechnik, Bauwesen und Umweltechnik der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-ILT, Projektleitung Dr. Andreas Gronauer, Förderung durch das StMLF) und des Lehrstuhls für Siedlungswasserwirtschaft (vormals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der Technischen Universität München (TUM-SWW, Projektleitung Prof. Dr. Peter Wilderer) Förderung durch das StMUGV, vormals StMLU). StwRo (Dipl.-Ing. Ludwig Nesper) waren Koordinator, die wissenschaftliche Bearbeitung erfolgte in einem gemeinsamen Ansatz von LfL-ILT (Bearbeitung durch Dipl.-Ing. Mathias Effenberger) und TUM-SWW (Bearbeitung durch Dr. Michael Leuhn), wobei LfL-ILT den Aufgabenbereich Betrieb und Optimierung der Biogasanlage und TUM-SWW den Bereich Mikrobiologie übernahmen. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind im vorliegenden Abschlussbericht dokumentiert.

## 1.2 Problemstellung und Zielsetzungen

### 1.2.1 Routinebetrieb in der Praxis

Mitte 1997 traten die Stadtwerke Rosenheim an die Landtechnik Weihenstephan heran. Es sollten Möglichkeiten gesucht werden, Wirtschaftsdünger präventiv zu behandeln, um den Eintrag von pathogenen Organismen ins Grundwasser zu vermeiden, ohne ein Ausbringungsverbot für Wirtschaftsdünger erlassen zu müssen. Die anaerobe Vergärung im Rahmen der Biogastechnologie (RÜCKERT, 1991; FINK et al., 1997) weist besondere Vorzüge auf. Sie hat unter den verschiedenartigen Behandlungsverfahren für Wirtschaftsdünger den großen Vorteil, dass neben einer keimabtötenden Wirkung ein Netto-Energieüberschuss erzielt werden kann. Um hohen hygienischen Anforderungen zu genügen, müssen an die Verfahrenstechnik und den Betrieb einer Biogasanlage besondere Anforderungen gestellt werden, und es bedarf einer gründlichen mikrobiologischen Überwachung, um den Erfolg der Abtötung pathogener Keime zu kontrollieren und zu dokumentieren. Hinsichtlich der Zuverlässigkeit der keimabtötenden Behandlung von Wirtschaftsdünger im Routinebetrieb einer landwirtschaftlichen Biogasanlage gab es allerdings kaum Erfahrungen. Diese sollten im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnen werden.

### 1.2.2 Reduktion bakterieller Keimzahlen und geeignete Verfahren

In landwirtschaftlichen Biogasanlagen werden in der Praxis im Wesentlichen mesophile Verfahren eingesetzt (Betriebstemperatur um 35°C). Thermophile Verfahren reduzieren aber Indikatoren für fäkale Verunreinigungen deutlich stärker als mesophile. *Escherichia coli* mit



durchschnittlichen Gehalten von  $9,1 \times 10^5$  KBE / mL im Ausgangssubstrat wurden durch mesophile Behandlung in 6 Tagen bis auf  $4,3 \times 10^1$  KBE / mL und durch thermophile Behandlung (Betriebstemperatur um  $55^\circ\text{C}$ ) sogar auf  $0,6 \times 10^0$  KBE / mL reduziert, intestinale Enterokokken (Fäkalstreptokokken) mit  $1,0 \times 10^6$  KBE / mL im Ausgangssubstrat mesophil auf  $1,8 \times 10^5$  KBE / mL und thermophil auf  $2,1 \times 10^2$  KBE / mL (FINK et al., 1997). Den Ergebnissen des StMLU-geförderten BayFORREST-Projekts F78 zufolge ist eine thermophile Behandlung bei  $55^\circ\text{C}$  und einer Verweilzeit von 6 Stunden ausreichend, um Salmonellen abzutöten, sie war allerdings für Bioabfall ohne nachgeschaltete mesophile Stufe aus verfahrenstechnischen Gründen ungünstig.

Durch eine zweistufige, am Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft der TU München entwickelte und inzwischen zur Marktreife gebrachte thermophil-mesophile Verfahrensführung (TherMes-Verfahren, CHRIST et al., 1997), konnten gute Behandlungsgrade bei guter Entwässerbarkeit der behandelten Suspension und geringer Stoffbelastung (CSB, Stickstoffverbindungen) des Filtratwassers erreicht werden (CHRIST, 1999). Um das Verfahren vor allem unter hygienischen aber auch wirtschaftlichen Aspekten zu optimieren, sollte im Rahmen dieses Projekts eine mesophil-thermophil-mesophile Prozesskaskade als neues Verfahren untersucht werden. Es leitet sich aus dem TherMes-Verfahren ab, beinhaltet aber aus unten dargestellten Gründen eine vorgeschaltete mesophile (später psychrophile) Stufe. Die mesophile wurde der thermophilen Phase vorgeschaltet, um eine Vor-Aufheizung der Gülle mit zusätzlicher Biogasproduktion zu bewirken und zusätzlich in dieser Phase Oozysten von Kryptosporidien zu exzystieren, die eventuell dann in der nachgeschalteten thermophilen Phase leichter zu inaktivieren wären (DOLL et al., 1999; OECHSNER und DOLL, 2000). Die 3-stufige Prozessführung wurde in den Untersuchungsobjekten, der Berblinger Pilot-Biogasanlage sowie der maßstäblich 1:6 reduzierten Modellanlage umgesetzt.

Die Hygienisierungseffizienz der Berblinger Biogasanlage sollte unter Praxisbedingungen anhand einer Reihe bakterieller und viraler Parameter sowie Parasiten (s. 2.3) untersucht werden. Dabei wurde soweit möglich Wert darauf gelegt, dass nicht Laborstämme der Gülle zugesetzt wurden, die u.U. reduzierte Tenazität gegenüber den Behandlungsbedingungen aufweisen, sondern dass die Hygienisierung möglichst anhand der Inaktivierung der autochthon vorhandenen Mikroflora überprüft und dokumentiert wird.

### **1.2.3 Einsatz von Molekularbiologie, qPCR**

Die Wirkung einer keimabtötenden Behandlung auf Mikroorganismen wird konventionell in der Praxis über selektive Kultivierung und spezifische physiologische Tests durchgeführt. Allerdings lassen sich einige Pathogene, z.B. Norwalk-Viren und Kryptosporidien, die über Transmission von befallenen Rind über Gülle ins Trinkwasser Epidemien auslösen können (WHO, 2002; WHO, 2004a), nicht kultivieren. Zudem ist ein großer Nachteil der klassischen mikrobiologischen Methoden der hohe Arbeits- und Zeitaufwand, der erforderlich ist, um pathogene Mikroorganismen eindeutig zu identifizieren und im Probenmaterial zu quantifizieren. Dieses Manko führte zum „Indikatorkonzept“, demzufolge bestimmte coliforme Bakterien fäkalen Ursprungs (Fäkalcoliforme, im Wesentlichen *E. coli*) und/oder intestinale Enterokokken (Fäkalstreptokokken, im Wesentlichen *Enterococcus faecalis* und *E. faecium*) stellvertretend für andere pathogene Keime nachgewiesen werden.

Die Wirksamkeit dieses Prinzips wird aber inzwischen weltweit in Frage gestellt. Zum einen können Zellen, die sublethal gestresst wurden, teilweise auf routinemäßig eingesetzten Anzuchtmedien nicht mehr kultiviert werden, obwohl sie lebensfähig bleiben (ABNC, LLEÒ et al., 2001; THOMAS et al., 2002). Die bekannten Indikatororganismen sind auch nicht geeignet, die Überlebensfähigkeit potentiell pathogener bakterieller thermophiler



Sporenbildner (z.B. Clostridien, Bakterien des *Bacillus-cereus*-Komplexes) und höherer Parasiten (z.B. Kryptosporidien, Giardien) stellvertretend anzuzeigen (ROSE et al., 2002; BASTOS et al., 2004). Auch für thermotolerante Nicht-Sporenbildner (z.B. *Campylobacter jejuni*) sind Ergebnisse der praxisüblichen Bestimmung der Indikatoren nicht unbedingt aussagekräftig (HÄNNINEN and KÄRENLAMPI, 2004).

Deshalb sollten im Rahmen des Projekts quantitative PCR-Methoden (qPCR) entwickelt und parallel zur klassischen Kultivierung eingesetzt werden, um die pathogenen Keime direkt in den Proben zu quantifizieren und die Ergebnisse und Aussagekraft im Vergleich beider Methoden zu evaluieren. Dabei war sicherzustellen, dass PCR-Inhibierung über Entwicklung geeigneter Methoden zur Nukleinsäure-Extraktion ausgeschlossen wurde, und dass die Nukleinsäure-Extraktions-Methoden sich auch zur Gewinnung relevanter Mengen DNA oder RNA aus Bildnern von Sporen und Dauerstadien (s. 1.2.4) eignete, die typischerweise einer chemischen Extraktion gegenüber inert sind.

Untersuchungen auf *Enterovirus*, humane Rotaviren und *Norovirus* sollten vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim (LGL, Dr. Schindler, Dr. Bayer, vormals Landesuntersuchungsamt Südbayern, LUA), mit den dort etablierten Methoden durchgeführt werden. Zusätzlich wurden von TUM-SWW qPCR-Ansätze für *Enterovirus* sp. und *Norovirus* Gg2 entwickelt und parallel eingesetzt.

#### **1.2.4 Problematik widerstandsfähiger Krankheitserreger**

Insbesondere zu Fragen der Inaktivierung widerstandsfähiger Krankheitserreger wie Dauerstadien bildender Bakterien und Parasiten bestand erheblicher Forschungsbedarf. Daher sollte exemplarisch das Verhalten von sporenbildenden bakteriellen Pathogenen (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) und von Oozysten-bildenden eukaryontischen Parasiten (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia*) während des Biogasprozesses untersucht werden.

Aus Untersuchungen zur aerob-thermophilen Stabilisierung von Gülle wurde die Empfehlung abgeleitet, dass für eine sichere Inaktivierung von Kryptosporidien eine Aufwärmphase von mindestens 12 h bei 35-45°C, gefolgt von einer Behandlung bei 50-55°C für mindestens 24 h eingehalten werden sollte (DOLL et al., 1999). Allerdings erschwerten Ausfälle des thermophilen Reaktors die Interpretationen, und es wurden keine Infektiositätstests durchgeführt, die eine Inaktivierung sicher dokumentieren können, während die durchgeführten Untersuchungen (Fähigkeit zur Exzystierung, Membranpermeabilität) die Inaktivierungsrate wahrscheinlich unterschätzten (BUKHARI et al., 2000; s. 3.1.8.2). DOLL et al. (1999) und OECHSNER und DOLL (2000) zufolge sollten Oozysten während der vorgeschalteten mesophilen Phase exzystieren, und die freigesetzten, anfälligeren Sporozoen in der folgenden thermophilen Phase leichter abgetötet worden sein. Daher wurden in der Konzeption der Berblinger Biogasanlage und der verkleinerten Modellanlage der thermophilen zunächst eine mesophile Stufe vorgeschaltet. Da eine Inokulation mit Kryptosporidien in der Pilotanlage aus praktischen und rechtlichen Gründen nicht möglich war, wurden diese mit entsprechendem Substrat in Diffusionskeimträger (RAPP, 1995; KNIE et al., 2000) in die mit Material aus der Berblinger Vorgrube beschickten und analog zur Berblinger Anlage betriebenen Modellanlage eingesetzt, und nach Einwirken verschiedener Temperatur-/Zeitregimes auf Inaktivierung untersucht. Wesentlicher Bestandteil der Untersuchungen sollten Infektiositätstests mit der humanen HCT-8 Zelllinie (ROCHELLE, 2004) sein. Sie konnten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Parasitologie, Leipzig, (IPL, Prof. Dausgries, M. Najdrowski, C. Wackwitz) realisiert werden.



### **1.2.5 Rückverkeimung im Endlager**

Die Problematik der Rückverkeimung im Endlager sollte ein Modell-Endlagerversuch klären, in dem die Entwicklung im Endlager mit der von verkleinerten Modellen ohne residuales Rückverkeimungspotenzial sowie ohne weiteren Substratzustrom verglichen wurde (s. 2.1.1.3).

### **1.2.6 Auswirkungen im Boden**

In einer sondierenden Begleitstudie (s. 2.1.2) sollte festgestellt werden, ob nach Ausbringung des Gärrests eine Rückverkeimung im Boden stattfindet. Zu diesem Zweck wurden 3 vergleichbare Versuchsplots auf den Mühläckern bei Berbling angelegt (praxisübliche Ausbringung von Gülle, Gärrest und ungedüngte Kontrolle), bis 1 m Bodentiefe beprobt und mikrobiologisch über selektive Kultivierung untersucht. Um den Belastungsstatus besser einordnen zu können, wurden zu Versuchsende zusätzliche Bodenproben (unbelasteter Lysimeter, verschiedene bayerische Wiesenböden) parallel untersucht.

### **1.2.7 Lysimeterstudien, Keimverlagerung in Böden und Lufthygiene**

In einem Unterauftrag an das Institut für Agrarökologie, Ökologischer Landbau und Bodenschutz (IAB-1f, Dr. Henkelmann) an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (vormals Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau) sollte in einem „worst case scenario“ die Keimverlagerung aus aufgebrachter Gülle und von Gärrest in Lysimetern mit Böden verschiedener Herkunft überprüft werden. Diese Studie sollte erste Anhaltspunkte liefern, ob und in welchen Fällen mit einem Durchbruch eventuell hoher Keimfrachten ins Grundwasser gerechnet werden muss, ob dabei Unterschiede zwischen Gülle- und Gärrest-Düngung bestehen, ob Gülle und Gärrest verschiedene lufthygienische Eigenschaften haben und ob sich die Ergebnisse für die Gärrest-Ausbringung am Standort Berbling auf andere Standorte extrapolieren lassen.

Diese Studie ist als eigenständiger Bericht (HENKELMANN, 2006) dem vorliegenden Abschlussbericht beigelegt.

## Material und Methoden

### 2.1 Beschreibung der Untersuchungsobjekte

Die Untersuchungen gliedern sich im Wesentlichen in zwei Bereiche auf:

- Bestimmung der Hygienisierungsleistung der Fermenterkette incl. Endlager und der Wiederverkeimung v.a. im Endlager (s. 2.1.1) sowie
- Vergleichende Erfassung von Wiederverkeimung im Boden nach Ausbringung von Gülle und Gärrest (s. 2.1.2) sowie Extrapolierungsmöglichkeiten der Ergebnisse über Lysimeterstudien (HENKELMANN, 2006).

#### 2.1.1 Fermenterketten

Die meisten der mikrobiologischen Fragestellungen ließen sich anhand der Berblinger Pilotanlage lösen. Die Untersuchungen zur Desaktivierung von Kryptosporidien ließen sich besser in einer Modellanlage (vgl. 1.2.4) untersuchen. Zur Untersuchung der Rückverkeimung im Berblinger Endlager wurde ein Modell-Endlagerversuch angelegt.

##### 2.1.1.1 Pilotanlage Berbling

Abb. 1 skizziert die Pilot-Biogasanlage Berbling und die Probenahmepunkte.

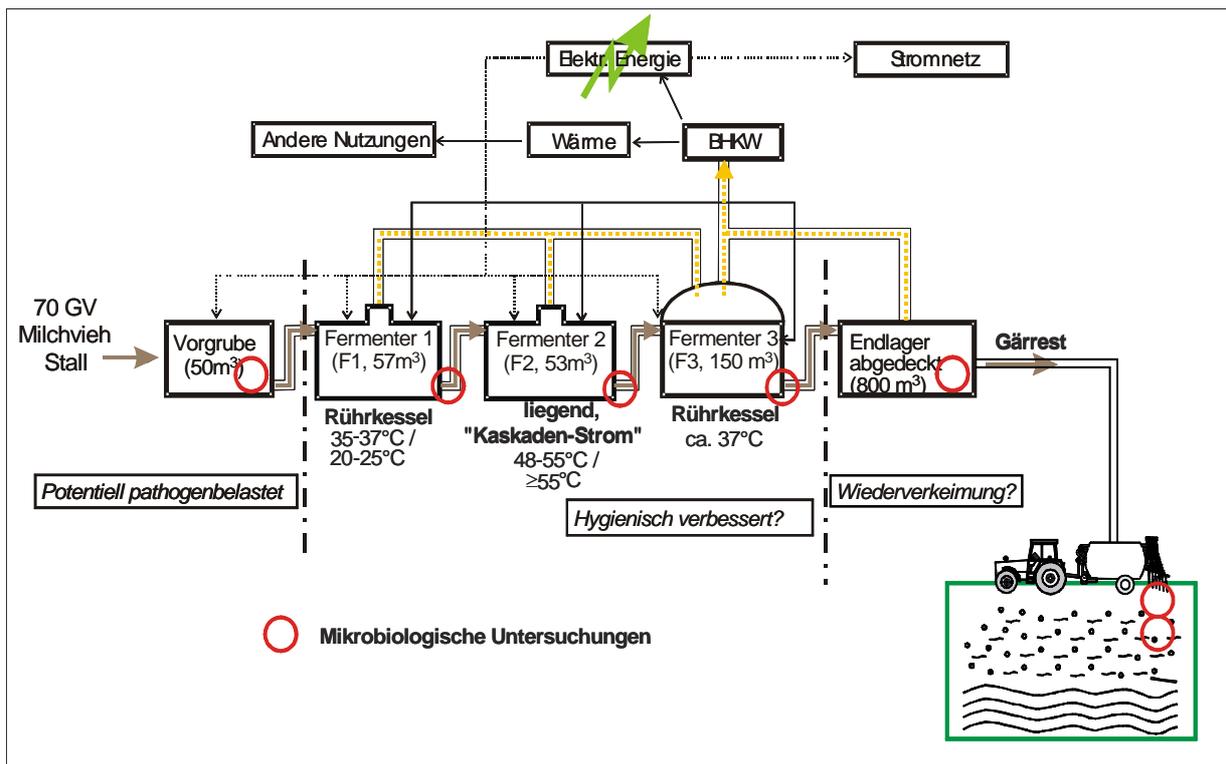


Abbildung 1: Schema der Biogasanlage Berbling mit Probenahmepunkten

Die Berblinger Anlage (Hof und Betreiber Fam. Schweiger) wurde ausschließlich mit Rindergülle von gesundem Milchvieh (teilweise von Nachbarbetrieben) beschickt. Verfüttert wurde ganzjährig eine TMR aus Grassilage, Heu, Korn und Mineralmischung. Die Gülle (Inhalt der Vorgrube) beinhaltete Strohmehl sowie das gesamte, im Stall anfallende Abwasser von Melkstand, Milchküche und Waschaum. Herr Schweiger wurde verpflichtet, eventuelle Tiererkrankungen und Gegenmaßnahmen zu melden. Es lagen bis zur Berichtverfassung keine Krankheitsmeldungen vor.



Im thermophilen Fermenter (F2) der Pilotanlage Berbling konnte die angestrebte Betriebstemperatur von 55°C erst nach den Ende 2003 beendeten Umbauten konstant gehalten werden. Davor kam es immer wieder zu Ausfällen des BHKWs und zu Beschickungsausfällen, was eine Absenkung der Temperatur auf z.T. bis 48°C im F2 sowie zeitweise lokale Überhitzungen zur Folge hatte. Von einem hinsichtlich der Temperatur zur Hygienisierung optimalen Betrieb kann daher erst ab Februar 2004 ausgegangen werden.

Bis 6.9.2004 erfolgte die Beschickung der Berblinger Pilotanlage und der Modellanlage stündlich, danach 4-stündlich. Die entsprechenden mittleren hydraulischen und die von LfL-ILT über Tracerexperimente (EFFENBERGER et al., 2005a; EFFENBERGER et al., 2006) bestimmten gesicherten minimalen Verweilzeiten im F2 zeigt Tab. 1. Die Hauptfracht des Peaks erschien im Auslauf des F2 48 h nach Einbringen. Aufgrund des praktisch gleichzeitigen Erscheinens von LiCl-Tracer und (radioaktiv markierten) im Sickerwasser nach Aufbringen dotierter Gülle und Gärrest auf Lysimeter mit verschiedenen Bodenformen (HENKELMANN, 2006) kann in erster Näherung davon ausgegangen werden, dass sich Fäkalcoliforme / *E. coli* auch im Massestrom der Fermenter ähnlich wie die verwendeten Tracer verhielten.

Tabelle 1: gesicherte minimale Verweilzeit und mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern

gesicherte min. Verweilzeit (h)	F1 (mesophil)	F2 (thermophil)	F3 (mesophil)
stündl. Beschickung	1	9*	1
4-stündl. Beschickung	4	8 - 9*	4
<b>mittl. hydraulische Verweilzeit (d)</b>			
stündl. Beschickung	9,3	8,4	27,7
4-stündl. Beschickung	9,2	8,4	27,8

\* über Tracerstudien belegt (EFFENBERGER et al., 2006); Hauptfracht (Peak) des Li<sup>+</sup> erschien nach 48 h.

Zusätzlich zum Monitoring-Programm mit Entnahme von Zufalls-Stichproben wurden 3 Chargenversuche in der Berblinger Pilotanlage durchgeführt (s. 2.1.1.1). In diesen wurde versucht, eine Gülle-Charge ausgehend vom Vorgruben-Material jeweils nach den mittleren hydraulischen Verweilzeiten in den Fermentern (Tab. 1) zu verfolgen, um die relativ hohen Schwankungen der Keimzahlen im Ausgangsmaterial zu eliminieren und dadurch die Hygienisierungsleistung besser zu charakterisieren. Der erste Chargenversuch begann am 25.8.2003, der zweite am 3.9.2003 und der dritte am 15.3.2004. Die ersten beiden Chargenversuche fielen jeweils in Perioden, in denen die o.g. Instabilitäten im Betrieb des F2 auftraten. Sie sind damit nur unter Vorbehalten zu bewerten, aber sehr zur Abschätzung eines worst-case-Szenarios geeignet. Der dritte Chargenversuch erfolgte unter konstant optimalen Bedingungen und kann daher als repräsentativ angesehen werden.

Ab Anfang März 2005 wurde der mesophile Fermenter F1 auf psychrophilen Betrieb bei 20 – 25°C umgestellt. Hierdurch sollte die Effektivität des zuvor dem thermophilen F2 vorgeschalteten mesophilen F1 hinsichtlich Keimreduzierung sowie der Einfluss des F1 auf den Gesamtprozess evaluiert werden.

### 2.1.1.2 Modellanlage

Zusätzlich zur Berblinger Pilotanlage wurde von LfL-ILT eine maßstäblich 1:6 reduzierte Modell-Biogasanlage (ohne Endlager) konstruiert und an TUM-SWW analog zur Berblinger Pilotanlage betrieben. Sie diente v.a. zur Bearbeitung folgender Fragestellungen:

- Bestimmung der Inaktivierung von *Cryptosporidium parvum* Oozysten mit Hilfe von Diffusions-Keimträgern (sowie Wasserbad-Experimenten, in Zusammenarbeit mit IPL)



- Überprüfung der Hygienisierungsleistung der Pilotanlage anhand von Monitoring-Ergebnissen der Modellanlage mit Evaluierung von Up- bzw. Downscaling-Effekten
- Bestimmung wahrscheinlicher hydraulischer Verweilzeiten (s. Tab. 1) von Bakterien in den einzelnen Kompartimenten anhand von Tracerstudien (LfL in Zusammenarbeit mit IAB-1f)

Die Betriebstemperatur des thermophilen Fermenters der Modellanlage konnte immer konstant bei 55°C gehalten werden.

### 2.1.1.3 Modell-Endlagerversuch

Um die Rückverkeimung im Berblinger Endlager abzuklären, wurde ein Modell-Endlagerversuch angelegt. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum 28.4 – 25.10.2004 statt. Polypropylen-Kanister (5 L, gewaschen, desinfiziert) wurden am 28.4.2004 mit Ausflussmaterial des F3 (2. mesophiler Fermenter) befüllt und schattig in Berbling bei ambienten Verhältnissen gelagert. Gasauslass war ermöglicht. Es wurden 2 Varianten angelegt, die etwa monatlich mikrobiologisch untersucht wurden:

- C1 (Endlager 2, ohne Austausch)
- C2 (Endlager 3, wöchentl. Austausch von ca. 1/10 Vol. durch frisches F3-Material).

Untersucht wurden Coliforme und Fäkalcoliforme, da diese den Ergebnissen zufolge hinsichtlich Rückverkeimung am schnellsten reagierten.

## 2.1.2 Boden-Beprobung

### 2.1.2.1 Berblinger Standorte

Abb. 2 skizziert einen Lageplan des Hofes Schweiger, Berbling, mit der etwa 25 m nördlich angrenzenden Versuchsfläche (Wiesenboden). Die Länge der 3 Plots auf den Mühläckern betrug 120 m, die Breite 13 m und die Zwischenstreifen 2 m. Der westl. Plot war für die Gülle- und der östl. Plot für die Gärrest-Ausbringung bestimmt.

Vor Versuchsanlage im März 2003 waren alle Flächen regelmäßig gegüllet. Der Kontroll-Plot (Abb. 2) ist damit keine echte Null-Variante sondern eher eine Verlaufskontrolle, eine Null-Variante (natürliche Belastung) wurde ab Sept. 2004 mit der Fläche in WZ I ins Programm aufgenommen (Abb. 2). Die westl. Fläche (Gülle-Plot) war vor 20 Jahren ein Maisacker, die anderen beiden Parzellen waren immer als Wiese bewirtschaftet.

Da der Gülle-Plot zum Termin Mai 2004 mit Gärrest gedüngt wurde, musste auf die etwa 50 m südl. der Zufahrts-Straße gelegenen Dorfäcker (Abb. 2) ausgewichen werden. Als Kontrollen dienten der bis Ende 2003 ungedüngt zentrale Plot (ab 2004 Gärrest-Ausbringung wegen Auslaufens des KuLaP) sowie im Mai 2004 der lt. Herrn Schweiger ungedüngte Randbereich nördl. der großen Lagerhalle (Abb. 2) und danach die ca. 1 km nordöstl. gelegene Wasserschutzzone 1 (ca. 70 m südöstl. des Brunnens). Die Termine der Probenahmen, der jeweils letzten Düngung und die Lage der Entnahmestelle zeigt Tab. 2.

Es ist zu vermerken, dass die Halme nördl. der großen Lagerhalle zur Probenahme 2004 auch Düngespuren aufwiesen. Zudem wuchsen in etwa 5 m Entfernung Brennnesseln, was auf N-Reichtum im Boden hinweist und u.U. wegen der Nähe der Hallen auf Ablagerung von Tierkot und damit auf fäkale Kontamination zurückzuführen sein kann. Die Aussagekraft der Kontroll-Probe des Mai-Termins 2004 ist damit stark in Frage gestellt.

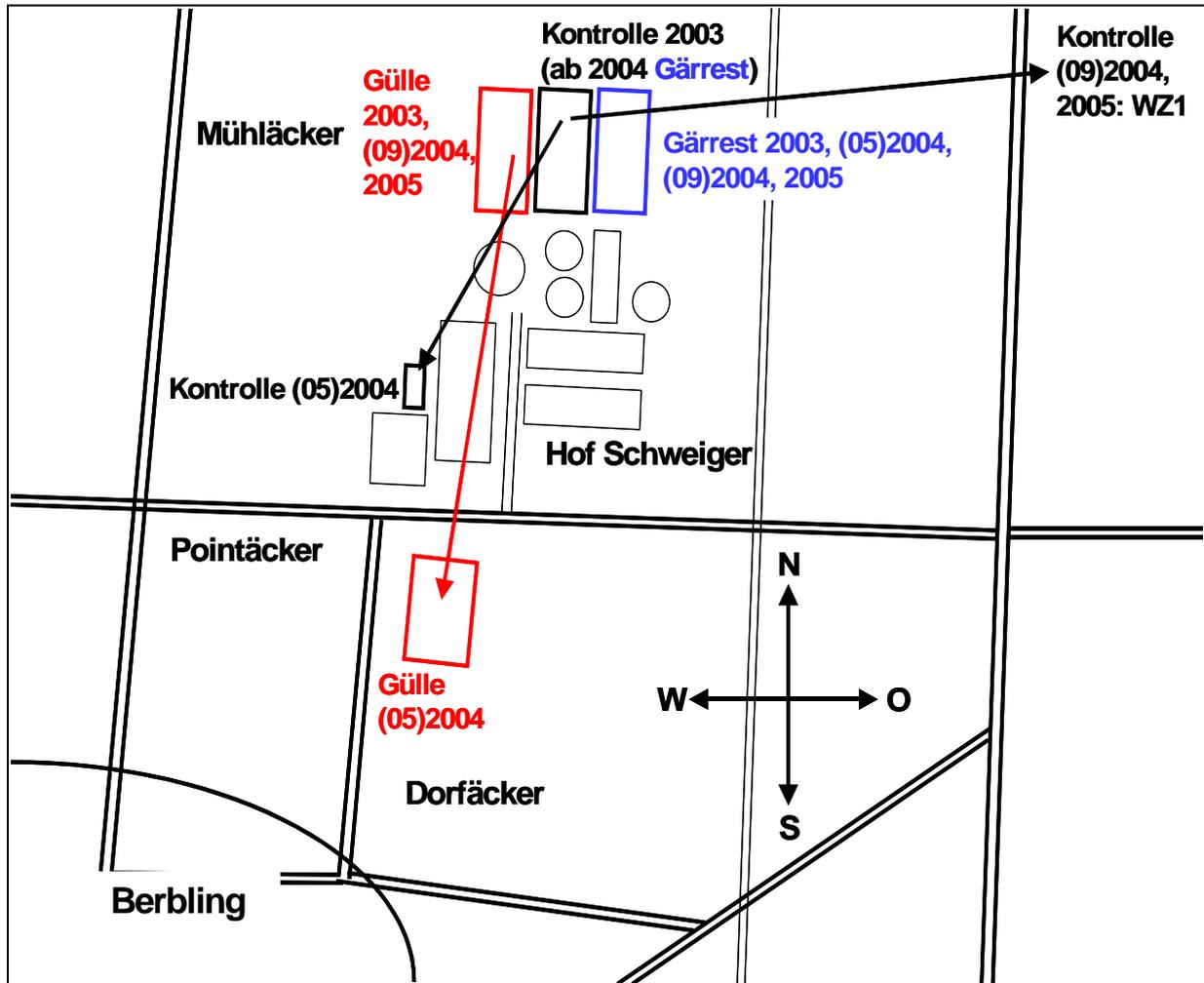


Abbildung 2: Lageplan der Versuchsflächen für die Bodenbeprobungen

Die pro Fläche ausgebrachte Gülle- und Gärrestmenge (Prallteller) betrug lt. Herrn Schweiger einheitlich  $12 \text{ m}^3 / \text{ha}$  und Schnitt und entsprach damit praxisüblichen Aufwandmengen. Pro Jahr wurde 5 mal geschnitten, wobei vor dem letzten Schnitt keine Gülle bzw. kein Gärrest gegeben wurde, und die Gülle lt. Herrn Schweiger vor einem Schnitt in der Hochsaison 1 + 1 verdünnt war. Da die Gärrest-Düngung 2003 wohl in Verbindung mit der trockenen und heißen Witterung Verätzungen des Gras-Bewuchses zur Folge hatte, verdünnte Herr Schweiger zu heiß-trockenen Hochsaison-Terminen das Endlager ebenfalls 1 + 1, woraufhin kaum oder keine Verätzungen mehr auftraten.

Die 4 untersuchten Berblinger Standorte waren sehr einheitlich im Profilaufbau und der Horizontierung (Parabraunerde-Pseudogley). Einem etwa 15 – 20 cm mächtigen  $A_h$ - folgte ein 20 – 25 cm starker  $A_hB_v$ -Horizont. Darunter befand sich ein typisches, etwa 20 – 40 cm mächtiges, kompaktes Schlufflehmband. Darunter, im Bereich 80 – 100 cm Bodentiefe, stieß das Ausgangssubstrat, Geschiebemergel, an.



Tabelle 2: Termine der Probenahmen und jeweils letzten Düngung für die Versuchsvarianten mit Lage der Entnahmestellen

Variante	Probenahme	letzte Düngung	Lage
Kontrolle	23.4.2003	28.3.2003 (vor 4 Wo.)	Kontroll-Plot Mühläcker
	<i>19.5.2004</i>	<i>unsicher (siehe Text)</i>	<i>Mühläcker nahe Masch.-Halle</i>
	20.9.2004	-	WZ I
	25.4.2005	-	WZ I
Gülle-Düngung	23.4.2003	28.3.2003 (vor 4 Wo.)	Gülle-Plot Mühläcker
	<i>19.5.2004</i>	<i>15.5.2004 (vor 1 Wo.)</i>	<i>Dorfäcker</i>
	20.9.2004	27.8.2004 (vor 3,5 Wo.)	Gülle-Plot Mühläcker
	25.4.2005	23.3.2005 (vor 4,5 Wo.)	Gülle-Plot Mühläcker
Gärrest-Düngung	23.4.2003	28.3.2003 (vor 4 Wo.)	Gärrest-Plot Mühläcker
	<i>19.5.2004</i>	<i>10.5.2004 (vor 1 Wo.)</i>	<i>Gärrest-Plot Mühläcker</i>
	20.9.2004	27.8.2004 (vor 3,5 Wo.)	Gärrest-Plot Mühläcker
	25.4.2005	23.3.2005 (vor 4,5 Wo.)	Gärrest-Plot Mühläcker

Kursive Einträge bezeichnen Probenahmen mit Unsicherheiten, vermutlich nicht repräsentativ für die Variante

### 2.1.2.2 Lysimeter Oberschleißheim

Zum Termin April 2005 wurden von IAB-1f zusätzliche Bodenproben von einem unbelasteten Lysimeter aus Oberschleißheim, gefüllt mit einer Bodensäule vom Standort Puch, als Null-Referenzen zur Verfügung gestellt und parallel mikrobiologisch untersucht. Der Boden des Lysimeters beherbergte keine größeren Bodentiere. Tab. 3 zeigt bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage des Lysimeters.

### 2.1.2.3 Bayerische Grünlandstandorte

Ebenfalls zum Termin April 2005 wurden von IAB-1f Bodenproben verschiedener bayerischer landwirtschaftlich genutzter Wiesenböden aus dem Dauerbeobachtungsprogramm der LfL als Referenzen zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Proben sollten erste Anhaltspunkte zur Variabilität der Belastung durch *Clostridium perfringens* durch die Landwirtschaft gewonnen werden.

Es handelte sich um einen Oberbayerischen Standort (Grünland 1), einen aus der Oberpfalz/Niederbayern (Grünland 2), einen aus Franken (Grünland 3) und einen aus Schwaben (Grünland 4). Tab. 3 zeigt bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage dieser Wiesenböden.

Die Nährstoffrückführung erfolgte für die Flächen unterschiedlich (HENKELMANN, persönl. Mitteilg.), Grünland 1 gehört zu einem Betrieb mit Stall-/Wanderschafhaltung (Tiere ca. alle 3 Jahre auf der Fläche), der das Heu nur als Futter verwendet, aber keine Gülle hat. Auf den Standorten Grünland 2 und 3 wurde im Herbst 2004 Gülle und auf Standort Grünland 4 im Herbst 2004 Festmist ausgebracht. Die Probenahme erfolgte Anfang April noch vor der ersten Begüllung (Standorte Grünland 2 - 4).



Tabelle 3: Bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage des Lysimeters und der Bayerischen Wiesenstandorte

Standort	Bodenart	Hauptbodenart	Ton (Masse %)	Schluff (Masse %)	Sand (Masse %)	Rohdichte tr. (g / cm <sup>3</sup> )	pH	Kohlenstoffgehalt (%)
Lysimeter	Lu	U	19,6	58,0	22,4	1,45	5,8	1,86
Grünland 1	Ut4	U	17,7	70,6	11,7	1,49	5,3	1,69
Grünland 2	Ls3	L	24,8	38,7	36,5	1,12	5,2	4,39
Grünland 3	Ls4	L	17,2	17,8	65	1,06	5,9	5,04
Grünland 4	Lt2	L	25,2	47,5	27,3	1,04	5,5	5,23

Daten nach HENKELMANN (persönl. Mitteilg). Bestimmung der Bodenart nach Humuszerstörung (4 Stechzylinder). Textur wurde im Profil bestimmt.

## 2.2 Probenahme und -vorbehandlung

### 2.2.1 Vorgrube- Fermenter- und Endlagerproben

Die mikrobiologischen Untersuchungen der Prozessketten (s. 2.1.1) fanden im Zeitraum 21.6.2001 (erste Probenahme) - 10.2.2005 (letzte Probenahme) statt. Die Proben wurden jeweils aus der Vorgrube und den Kanistern sowie am Ablauf der untersuchten Fermenter bzw. Endlager nach Ablauf einiger Liter des Inhalts entnommen und in 250 oder 500 mL Polypropylenflaschen (fabrikneu oder gewaschen und desinfiziert) abgefüllt. Sie wurden unverzüglich gekühlt ins Labor transportiert und sofort oder nach höchstens 3-tägiger Lagerung bei 4°C weiter verarbeitet. Eine Bestimmung der Fäkalcoliformen und Coliformen ergab selbst nach 4-tägiger Lagerung bei 4°C keinen Unterschied zur sofort analysierten Probe. Erste Aktivitäts-Einbußen waren erst nach etwa 10 Tagen erkennbar (nicht dargestellt).

Die Proben wurden mit einem zu Beginn und vor jedem Probenwechsel gewaschenen und desinfizierten Ultra-Turrax etwa 1 min. homogenisiert. Für die (selektiven) Kultivierungen wurden serielle Verdünnungsreihen in sterilem PBS (0.13 M NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 in Wasser) angesetzt. Die Bestimmungen wurden mit geeigneten Mengen der unverdünnten Probe und/oder der Verdünnungen durchgeführt. Die analysierten Parameter sind bei 2.3.1 dargestellt.

### 2.2.2 Bodenproben

Die mikrobiologischen Untersuchungen der Bodenproben fanden im Zeitraum 23.4.2003 (erste Probenahme) - 25.4.2005 (letzte Probenahme) statt. Allgemein waren die Berblinger Flächen (s. 2.1.2.1) zu allen Terminen von Wühlmäusen befallen. Es ist damit generell für diese Flächen mit Makro-/Megaporenfluss zu rechnen, obwohl unklar ist, ob sich dieser durch das charakteristische Lehmband (s. 2.1.2.1) fortsetzen konnte. Im Frühjahr 2003 war der Wühlmausbefall besonders stark. Es wurde generell versucht, keine Wühlmausgänge bei den Bohrungen zu treffen. Dies war allerdings technisch nicht auszuschließen, und die Variabilität der Ergebnisse für verschiedene mikrobielle Parameter wies darauf hin, dass solche Gänge mit Kotablagerungen bei den Bohrungen getroffen wurden (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5). Die Böden aller untersuchter Standorte waren bei allen Probenahmen über das gesamte Profil gut durchfeuchtet. Bei guter Bodendurchfeuchtung erfolgt eine vertikale Keimverlagerung schneller als in trockeneren Böden (PALUSZAK et al., 2003). Die Probenahmetermine (Tab. 2)



waren in entsprechendem Abstand nach der Düngung gewählt, um vertikale Keimverlagerung zu ermöglichen.

In der WZ I wurden bei den Probenahmen Rehe in der Einzäunung bemerkt. Beim Überfliegen von Vögeln gelangte zuweilen auch Vogelkot auf Oberflächen.

Bei allen Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die Berblinger Proben wurden mit einem Pürkhauer bis 1 m Bodentiefe manuell oder mit maschineller Unterstützung genommen, wobei der Pürkhauer vor jeder Probenahme gereinigt und vor jedem Plot-Wechsel mit 70 % Ethanol desinfiziert wurde. Zu jedem Termin wurden  $\geq 6$  Bohrungen pro Plot vorgenommen. Die Bodensäulen wurden mit einem gewaschenen und desinfizierten Messer in 6 Tiefenstufen (0 – 10 cm, 10 – 20 cm, 20 – 30 cm, 30 – 50 cm, 50 – 70 cm und 70 – 100 cm) unterteilt. Die einzelnen Tiefenstufen wurden zu Mischproben vereinigt, und Skelettmaterial wurde manuell entfernt. Nur am Herbsttermin 2004 wurden die Proben bei IAB-1f maschinell vom Skelett befreit und danach gesiebt ( $< 2$  mm). Dies wurde aber wegen der relativ aufwändigen Waschung von Sieben und Bürsten und dem gleichzeitig sehr geringen Skelett- aber hohen Lehm- bzw. Schluffanteil (machte Siebung praktisch überflüssig, gestaltete aber die Vermeidung von Kontamination schwierig) nicht wiederholt.

Die Mischproben wurden in Plastiktüten verpackt, gekühlt schnell ins Labor gebracht und 1 – 3 Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$  re-äquilibriert. Danach wurden sie unter Vermeidung von Sedimentation seriell in PBS verdünnt, wobei sie jeweils etwa 1 min heftig manuell geschüttelt wurden, um Aggregate zu lösen. Die Verdünnungsreihen und Frischboden wurden entweder sofort oder nach Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  (bis 2 Tage) mikrobiologisch untersucht.

Von Aliquots der frischen Mischproben wurden für jede Tiefenstufe die Trockengewichte bei Gewichtskonstanz bestimmt (48 h  $105^{\circ}\text{C}$ ). Die pro g FB bestimmten Keimzahlen wurden auf g TB umgerechnet. Der Wassergehalt schwankte allgemein nur unwesentlich, weswegen sich die pro g FB und pro g TB erhaltenen Ergebnisse relativ zueinander nicht unterschieden.

Die von IAB-1f zur Verfügung gestellten Bodenproben des Lysimeters (s. 2.1.2.2) waren in 5 Tiefenstufen (0 – 10 cm, 10 – 20 cm, 20 – 30 cm, 30 – 40 cm und 40 – 50 cm) unterteilt und wurden analog den Berblinger Bodenproben behandelt. Ebenso wurde mit den Referenzproben von den Wiesenstandorten (s. 2.1.2.3) verfahren, die in 3 Tiefenstufen (0 - 10 cm, 10 - 20 cm, 20 - 30 cm) unterteilt waren.

## 2.3 Mikrobiologische und molekularbiologische (qPCR) Untersuchungen

### 2.3.1 Untersuchte Parameter

In Tab. 4 sind die untersuchten physiologischen Gruppen und Mikroorganismen dargestellt.

Die mikrobiologischen Untersuchungen gliederten sich in 2 Untersuchungsteile, in Verfahren mit (selektiver) Kultivierung bzw. etablierten Verfahren und in qPCR-Ansätze. Die einzelnen spezifischen Kultivierungs- bzw. etablierten und die qPCR-Ansätze wurden so gestaltet, dass die Zielgruppen weitestmöglich identisch und die Ergebnisse damit vergleichbar waren.



Tabelle 4: Untersuchte mikrobiologische und virale Parameter

	Klassisch (v.a. Kultivierung)	(RT)qPCR
Routineuntersuchung	Coliforme	<i>Enterobacteriaceae</i>
	Fäkalcoliforme	<i>Escherichia coli</i>
	Intestinale Enterokokken	<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>E. faecium</i>
Sporadisch	Thermophile <i>Campylobacter</i>	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp.: <i>Campylobacter jejuni</i> + <i>C. coli</i> + <i>C. lari</i> + <i>C. upsaliensis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> -Gruppe: <i>Bacillus cereus</i> + <i>B. thuringiensis</i> + <i>B. anthracis</i> + <i>B. mycooides</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Cryptosporidium parvum</i> <sup>&amp;</sup> , ( <i>Giardia lamblia</i> <sup>%</sup> )	<i>C. parvum</i> [alle pv. außer 'dog'] + <i>C. hominis</i> + <i>C. meleagridis</i> + <i>C. wrairi</i>
	Rotaviren*	
	<i>Enterovirus</i> <sup>§</sup>	<i>Enterovirus</i> spp.
	<i>Norovirus</i> Gg1 <sup>§</sup> , Gg2 <sup>§</sup>	<i>Norovirus</i> Gg2

<sup>&</sup> nur in der Modellanlage und in Wasserbadversuchen, Infektiosität durch IPL, Exzystierung und Membranpermeabilität durch IPL und TUM-SWW; <sup>%</sup> nicht durchgeführt, s. Text; \* durch LGL über Enzym-Immunoassay; <sup>§</sup> durch LGL über RT-PCR

### 2.3.1.1 Berblinger Pilotanlage, Monitoring und Chargenversuche

Im Monitoring wurden für die Berblinger Pilotanlage (s. 2.1.1.1) alle in Tab. 4 genannten Parameter bestimmt (ausser Inaktivierungsparameter für *Cryptosporidium parvum*,<sup>&</sup> in Tab. 4).

Die Chargenversuche (s. a. 2.1.1.1) beinhalteten alle bakteriellen Parameter (Tab. 4). Viren und Parasiten wurden in den Chargenversuchen nicht bestimmt, da sie bereits in der Gülle immer unter oder im Bereich der Nachweisgrenze lagen, und eine Vermehrung von Viren und Parasiten im Prozess ausgeschlossen werden kann.

Zu den Chargenversuchen ist anzumerken, dass versucht wurde, eine Gülle-Charge ausgehend vom Vorgruben-Material im Durchgang durch die Fermenterkette bis ins Endlager jeweils nach den mittleren hydraulischen Verweilzeiten (Tab. 1) zu verfolgen. Die Überlegung dazu war, dass nach den hydraulischen Verweilzeiten > 95 % der jeweiligen Fermenterinhalt ausgetauscht waren und die Inhalte dann die des jeweils vorherigen Fermenters repräsentierten. Späteren Tracerexperimenten mit LiCl zufolge waren allerdings die Verweilzeiten im F2 deutlich kürzer als bei einem angenommenen Pfropfenstrom (Tab. 1). Demnach sollte eine unvollständige Durchmischung aber kein echter Pfropfenstrom ("Kaskadenstrom") vorgelegen haben. In den Rührkesseln F1 und F3 wird das zugeführte Material bereits beim ersten Rühren voll durchmischt. Hier tritt bereits etwas Material der



betrachteten Charge nach einem Beschickungs-/Entnahme-Intervall im folgenden Fermenter auf. Wegen der Vermischungs-Problematik kann also nur annähernd von einer Verfolgung einer Charge im Sinne einer Schwarz-Weiss-Trennung gesprochen werden. Für die keimreduzierende Wirkung der Fermenter(-Kette) ist allerdings die Fragestellung, ob wirklich eine bestimmte Charge verfolgt wurde, zumindest für das dritte Chargenexperiment (Beginn 15.3.2004, s. 2.1.1.1) sekundär, da hier sowohl die Chargen vorher als auch die folgenden gleich behandelt waren.

### 2.3.1.2 Modellanlage, Keimträgerversuche, Wasserbadexperimente

In der Modellanlage (s. 2.1.1.2) wurden ein Monitoring für Coliforme und Fäkalcoliforme durchgeführt.

In der Modellanlage fanden auch die Keimträgerversuche zur Bestimmung der Inaktivierung von *Cryptosporidium parvum* Oozysten statt. Dabei wurden Diffusions-Keimträger nach RAPP (1995) und KNIE et al. (2000) (Filter-Sandwich-Keimträger) aus Polycarbonat mit einem Volumen von 3 mL und 0,4 µm Membranfilter verwendet (s. 2.3.2.7.2). Der Inhalt bestand aus *C. parvum* Oozysten vermengt mit Material jeweils aus den Kompartimenten der Modellanlage (Vorgrube, F1, F2, F3, s. 2.3.1.2). Damit konnten hohe Oozysten-Konzentrationen direkt den chemischen und physikalischen Einflüssen ausgesetzt und praktisch verlustfrei wiedergewonnen werden (s. 2.3.2.7.2).

Zur Absicherung der Keimträgerversuche wurden durch IPL Wasserbad-Experimente mit reinen Oozysten-Suspensionen durchgeführt (s. 2.3.2.7).

### 2.3.1.3 Modell-Endlagerversuch

Im Modell-Endlagerversuch (s. 2.1.1.3) wurden Coliforme und Fäkalcoliforme bestimmt, da sie am schnellsten mit Wiederverkeimung reagierten (s. 3.1.1, 3.1.2).

### 2.3.1.4 Bodenproben

Für alle Bodenproben wurden ausschließlich kultivierungsabhängige Verfahren eingesetzt, da sich im Projekt zeigte, dass die qPCR-Verfahren mit DNA als Zielmolekül lebensfähige Keimzahlen z.T. gravierend überschätzten. Die Berblinger Bodenproben (s. 2.1.2.1) wurden zunächst nur auf Coliforme, Fäkalcoliforme, Enterokokken und intestinale Enterokokken untersucht. Ab 2004 wurde zusätzlich auf *Clostridium perfringens* und 2005 zusätzlich auf *Bacillus cereus* untersucht, da diese Sporenbildner während des Biogasprozesses nicht oder nur marginal reduziert wurden.

Die 2005 hinzugekommenen Proben vom Lysimeter (s. 2.1.2.2) wurden als zusätzliche Null-Referenz zusammen mit den Berblinger Proben auf dieselben Parameter hin untersucht.

Die 2005 hinzugekommenen Proben von den bayerischen Grünlandstandorten (s. 2.1.2.3) dienen zur vorläufigen Einschätzung der Variabilität einer eventuellen landwirtschaftlichen Belastung durch *C. perfringens* und wurden daher auf diesen Parameter hin untersucht.

## 2.3.2 Kultivierungsabhängige Verfahren

### 2.3.2.1 Coliforme und fäkalcoliforme Bakterien

Die Bestimmungen erfolgten über eine MPN-Methode (DE MAN, 1983) mit Fluorocult®-Laurylsulfat-Bouillon in Anlehnung an EG-Richtlinie 76/160/EWG (SCHINDLER, 1991). Die zu untersuchenden Proben (s. 2.3.1) wurden mind. 30 s heftig geschüttelt und gevortext. Jeweils 3 x 1 mL der unverdünnten Suspension und geeigneter Verdünnungen (mindestens 3



Verdünnungsstufen) wurden sofort (zur Minimierung von Sedimentationseffekten) jeweils 9 mL Fluorocult®-Laurylsulfat-Bouillon zugesetzt, leicht gevortext und bei 37°C bebrütet.

Um Hinweise auf Präsenz sublethal geschädigter Zellen bzw. ABNC-Bildung (s. 1.2.3) zu erhalten, wurde die konventionelle 24 h Bebrütung auf etwa 4 d ausgedehnt (Ableseung nach 1 d, 2 d und ca. 4 d). Die Zahl der positiven Röhren erhöhte sich nämlich während der weiteren Inkubation z.T. noch deutlich (LEBUHN et al., 2005). Konstanz der Ergebnisse stellte sich etwa ab 4 d Bebrütung ein. Zu jedem Termin wurden coliforme Bakterien anhand Gasbildung im Durham-Röhren und Fäkalcoliforme über Fluoreszenz bei UV-Einstrahlung bestimmt. Anhand der positiven und negativen Röhren wurden jeweils die MPN bestimmt.

### 2.3.2.2 Intestinale und Gesamt-Enterokokken

Die Bestimmungen erfolgten nach ISO / DIS 7899-2. Ein mL geeigneter, mind. 30 s heftig geschüttelter und gevortexter Verdünnungen der Proben (s. 2.3.1) (mind. 1 Wiederholung, mind. 2 Verdünnungsstufen) wurde sofort (vor Sedimentation) durch 0,45 µm Membranfilter (Sartorius 11406-50-ACN) Unterdruck-filtriert (Edelstahl-Filtrationsanlage). Alles verwendete Material war sterilisiert oder desinfiziert. Nach jeder Filtrierung wurden die Trichterränder mehrfach mit 0,85 % KCl nachgespült, und vor jedem Probenwechsel wurden Trichter und Fritten erneut desinfiziert und abgeflammt. Bei den Bodenproben enthielten die beprobten Verdünnungen vorzugsweise die Stufe  $10^{-1}$ , da die Ergebnisse vermuten liessen, dass die Enterokokken sehr fest mit Ton-Humuskomplexen assoziiert waren (vgl. KAGAWA, 1971) und aus stärkerer Verdünnung daher unterbestimmt wurden.

Gesamt-Enterokokken wurden nach 48 h Kultivierung (feuchte Atmosphäre) des Filtrats bei 44°C auf m-Enterokokken- (bzw. Slanetz-Bartley-) Agar gezählt. Dabei wurden alle (auch pinpoint) rosa- bis braunroten Kolonien berücksichtigt. Die Bestimmung der Gesamt-Enterokokken erwies sich als problematisch (s. 3.1.3) und kann daher nicht für die Routine empfohlen werden. Intestinale Enterokokken wurden nach weiterer 2 h Bebrütung der Filter auf vorgewärmtem Äsculin-Agar anhand deutlicher Schwarzfärbung im Agar gezählt. Typischerweise waren dies 0,5 – 1 mm große dunkel- bis braunrote Kolonien.

### 2.3.2.3 Thermophile *Campylobacter*

In Vorversuchen zeigte sich, dass eine direkte Plattierung von Gülle auf mCCDA-Agar (modifizierter CCDA-Preston-Agar, Oxoid CM0739+SR0155) Inkubation mikroaerob 2 d bei 42°C, s.u.) nicht genügend selektiv war, da sich eine zu starke Hintergrund-Mikroflora einstellte. Es wurde daher eine selektive Anreicherung vorgeschaltet und auf eine MPN-Strategie (s. 2.3.2.1) mit Nachweis über qPCR zurückgegriffen. Der Nachweis über qPCR erwies sich dabei im Test von 23 *Campylobacter*-Referenzstämmen als wesentlich geeigneter als der konventionelle Test über Gram-Färbung (nicht dargestellt). Die Zusammensetzung des Anreicherungs-Mediums wurde für Gülle optimiert. Dabei war ein selektives Preston *Campylobacter* Anreicherungsmedium (sPCA, Oxoid CM0067+SR0084+SR0117+SR0048) am effektivsten (nicht dargestellt). Zur Quantifizierung wurde dann folgendermaßen vorgegangen:

Jeweils 3 x 1 mL der unverdünnten Suspension und der Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  der Proben (s. 2.2.1) wurden mind. 30 s heftig geschüttelt und gevortext und sofort (vor Sedimentation) jeweils 9 mL sPCA zugesetzt. Nach Vortexen wurden die Proben mikroaerob (Anaerocult C; 2,5 L anaerobic jar; Merck) 2 d bei 42°C bebrütet. Nach Vortexen wurden 100 µL Aliquots auf mCCDA ausplattiert, und die Platten mikroaerob 2 d bei 42°C bebrütet. Platten mit typischen Kolonien wurden nach qPCR-Bestätigung auf Vertreter der thermophilen *Campylobacter* spp. als positiv gewertet. Anhand der positiven und negativen Platten wurden die MPN bestimmt (s. 2.3.3.2.3).



### 2.3.2.4 *Yersinia enterocolitica*

Auch für *Yersinia enterocolitica* zeigten Vorversuche, dass eine direkte Plattierung von Gülle auf CIN-Agar (Oxoid CM0653+SR0109, Bebrütung 24 h bei 32°C) wegen starker Entwicklung von Hintergrund-Mikroflora nicht möglich war. Hilfreich war eine vorgeschaltete selektive Anreicherung (24 h, 30°C in Ossmer-Bouillon (Merck 1.16701.0500). Die Quantifizierung wurde damit ebenfalls über MPN-Bestimmung (s. 2.3.2.3, 2.3.3.2.3) vorgenommen.

Jeweils 3 x 1 mL der unverdünnten Suspension und der Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  der Proben (s. 2.2.1) wurden mind. 30 s heftig geschüttelt und gevortext und sofort (vor Sedimentation) jeweils 9 mL Ossmer-Bouillon zugesetzt. Nach Vortexen wurden die Proben 24 h bei 30°C bebrütet. Nach Vortexen wurden 100 µL Aliquots auf CIN-Agar ausplattiert, und die Platten 24 h bei 32°C bebrütet. Platten mit typischen Kolonien wurden nach qPCR-Bestätigung auf *Y. enterocolitica* als positiv gewertet. Anhand der positiven und negativen Platten wurden die MPN bestimmt.

### 2.3.2.5 *Bacillus cereus* (-Gruppe)

*Bacillus cereus* (incl. *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*) wurde über selektive Plattierung von 100 µL geeigneter Verdünnungen der Proben (s. 2.3.1) auf PEMB-Agar (PEMBA, Oxoid CM0617+SR0099+SR0047) mit mindestens 1 Wiederholung nach Herstellerangaben bestimmt (Zählung typischer Kolonien nach 24 h Inkubation bei 35°C und danach 24 h bei ca. 20°C).

Obwohl sich eine relativ starke Hintergrundflora entwickelte, ließen sich typische blaue Kolonien zumeist noch erkennen. Zufällig ausgewählte Kolonien verschiedener Platten erwiesen sich im qPCR-Test (s. 2.3.3.2) auf Vertreter der *B.-cereus*-Gruppe durchwegs als positiv (Kolonien der Hintergrund-Mikroflora immer als negativ). Wegen der schwärmenden Kolonie-Wuchsform und des häufigen Überwuchses durch Hintergrund-Mikroflora war allerdings eine exakte Quantifizierung sehr schwierig. Die über Kultivierung ermittelten Werte für *B. cereus* müssen daher eher als Schätzungen betrachtet werden, sie entsprachen allerdings in der Größenordnung den direkten Bestimmungen aus den Proben über spezifische qPCR (s. 3.1.6). Hier sind methodische Weiterentwicklungen wünschenswert.

### 2.3.2.6 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* wurde im Koch'schen Plattengussverfahren in fluorogenem TSC-Agar (TSCF-Agar, Merck 1.11972.0500+1.00888.0001) bestimmt, da *C. perfringens*, insbesondere die Sporen, über Kultivierung in TSCF im Vergleich zu anderen Medien am spezifischsten nachgewiesen wurden, und gleichzeitig die Detektionseffizienz mit am höchsten war (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2004). Die Ergebnisse beinhalten Sporen + vegetative Zellen, da auf einen Abtötungsschritt vor der Inkubation verzichtet wurde.

1 mL geeigneter Verdünnungen der Proben (s. 2.3.1) wurden mit jeweils mindestens einer Wiederholung in TSCF eingegossen und 24 h bei 44°C anaerob (Anaerocult A; 2,5 L anaerobic jar; Merck) bebrütet. Über einem UV-Tisch fluoreszierende, schwarz gefärbte Kolonien wurden als *C. perfringens* gezählt.

Als problematisch stellte sich heraus, dass teilweise zwischen Petrischale und Agar eine großflächige, wolkige Schwarzfärbung (bei Gasbildung teilweise leicht vom Boden abgehoben) mit starker Fluoreszenz des Rands auftrat, die eine Zählung der sonst typischen Kolonien unsicher machte. Die über Kultivierung ermittelten Werte für *C. perfringens* können daher vor allem bei den Bodenproben für den Probenahmetermin Mai 2004, wo der Effekt besonders häufig auftrat, um ca. 1 log-Stufe überschätzt sein, da zu diesem Termin von der



gefärbten Fläche auf die Anzahl der Kolonien geschlossen wurde. Zu den späteren Terminen wurden Platten mit 'Wolkigkeit' nicht ausgewertet, was durchwegs etwa 1 log-Stufe geringere Werte ergab. Eine Unterschätzung kann ausgeschlossen werden, da die TSCF-Werte für die Fermenterkette in der Größenordnung den direkten Bestimmungen über spezifische qPCR entsprachen. Methodische Weiterentwicklungen zur Verhinderung der angesprochenen Problematik sind wünschenswert.

### 2.3.2.7 *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* besteht aus 2 Genotypen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität (ROBBEN and SIBLEY, 2004). Genotyp 1 scheint ausschließlich Primaten zu befallen und wurde in *C. hominis* umbenannt, während der 'bovine' Genotyp 2 sowohl für Menschen als auch teilweise für andere Wirte pathogen sein kann (ROBBEN and SIBLEY, 2004). In der hier präsentierten Arbeit wird der alte Species-Name *C. parvum* stellvertretend für *C. parvum* + *C. hominis* verwendet.

Die Untersuchungen erfolgten größtenteils im Rahmen eines Kooperationsvertrags mit IPL, das über die eingesetzten Methoden bereits berichtete (NAJDROWSKI et al., 2004; WACKWITZ, 2005). Es wurden Keimträger- und Wasserbad-Experimente durchgeführt. Die Gewinnung der Oozysten, die Reinigung sowie die Bestimmung der Infektiosität wurden von IPL übernommen. Die Parameter (Fähigkeit zur) Exzystierung und Membranpermeabilität wurden teilweise durch IPL und teilweise durch TUM-SWW bestimmt. TUM-SWW übernahm die Durchführung der Keimträgerexperimente sowie die Quantifizierungen über (RT)qPCR.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden durch IPL Wasserbadexperimente durchgeführt, in denen reine Oozysten-Suspensionen (definierte Mengen, in 2,5 mL Eppendorf-Cups) entsprechend den Vorgaben aus der Pilotanlage Temperaturen und Einwirkzeiten sowie relevanten Temperatur/Zeit-Kombinationen ausgesetzt wurden. Danach wurden die Aktivitätsparameter bestimmt.

#### 2.3.2.7.1 Reinigung der Oozysten über Kochsalzflotation (nach Passage)

Der oozystenhaltige Kot von künstlich infizierten Rindern (Stamm IOWA) oder von wilden Infektionen wurde, falls notwendig, mit Wasser verdünnt, mit einem Küchenstab homogenisiert, durch ein Sieb passiert und zentrifugiert (2500 g, 10 min). Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen, das Sediment mit Ether gemischt und erneut zentrifugiert. Bis auf das Sediment wurde dann alles verworfen (Etherphase, Schmutzkuchen, wässrige Phase) und das erstere noch 2 - 3 mal mit Wasser gewaschen, bis kein Ethergeruch mehr feststellbar war. Zum Schluss wurde das Sediment mit kalter gesättigter Kochsalzlösung gemischt, mit kaltem dH<sub>2</sub>O überschichtet und 10 min bei 2300 g ungebremst zentrifugiert. Die Oozysten wurden dann an der Phasengrenze Salz-Wasser abgesaugt, in ein Gefäß mit Wasser überführt und noch mal zentrifugiert. Nach Bedarf wurde die Kochsalzflotation wiederholt. Zum Schluss wurden die Oozysten in PBS mit Zusatz von Penicillin (100 IE / mL), Streptomycin (50 µg / mL) und Amphotericin B (2,5 µg / mL) resuspendiert und gekühlt TUM-SWW für die Keimträgerexperimente (s. 2.3.2.7.2) übersandt oder im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Kochsalzflotation wurde auch in den beiden ersten Keimträgerexperimenten (12 / 2003, 07 / 2004) zur Reinigung der Oozysten aus den Keimträgern eingesetzt. Wiederfindungsversuche zeigten aber, dass über diese Methode 50 - 90 % der Oozysten verloren wurden. Die Ergebnisse sprachen sogar dafür, dass die Methode für die lebende Fraktion der Oozysten selektiert (M. NAJDROWSKI, unveröffentlicht; s. 3.1.8.2.2). In den folgenden Keimträgerexperimenten wurde daher eine Percoll-Gradientenzentrifugation (s. 2.3.2.7.3) zur Reinigung der Keimträgerinhalte eingesetzt.



### **2.3.2.7.2 Exposition in Diffusions-Keimträgern**

Definierte Mengen zuvor konzentrierter Oozysten (Bereich  $10^7 - 10^8$ ) wurden in den ersten beiden Keimträgerexperimenten (12 / 2003, 07 / 2004) mit Material jeweils aus den Kompartimenten der Modellanlage (Vorgrube, F1, F2, F3, s. 2.3.1.2) vermengt, in 2,8 mL Diffusionskeimträger (Labor Dr. Rabe; 0,4  $\mu\text{m}$  Membranfilter Millipore HTTP02500) eingefüllt, entsprechend der Substratherkunft im jeweiligen Kompartiment befestigt und den Versuchsbedingungen (entsprechend den gesicherten Verweilzeiten in den Fermentern, s. Tab. 1, sowie relevanten Temperatur/Zeit-Kombinationen) ausgesetzt. Als Kontrollen dienten Varianten 4°C mit und ohne Gülle. Da sich vor allem in den mikroskopischen Analysen Probleme mit der Reinigung der Keimträger-Inhalte ergeben, wurden in den folgenden Keimträgerexperimenten Gülle und Fermentermaterial vor Oozysten-Zusatz abzentrifugiert (2500 g, 5 min), um partikuläres Material (ca. 10 %) zu entfernen aber das chemische Milieu und den osmotischen Druck beizubehalten. Die Sedimente wurden entfernt, die Oozysten den Überständen zugesetzt, und diese Suspensionen in den entsprechenden Kompartimenten der Modellanlage exponiert.

Die Keimträgerinhalte wurden nach den unterschiedlichen Behandlungen quantitativ wiedergewonnen (Spülung der Innenwände und Filter mit 0,85 % KCl), und die Suspensionen danach wieder auf 2,8 mL eingestellt. Etwa 2,5 mL der Proben wurden gekühlt per Express IPL zur weiteren Analyse zugesandt, der Rest wurde an TUM-SWW analysiert.

### **2.3.2.7.3 Reinigung der Oozysten aus den Keimträgern über Percoll-Gradienten-Zentrifugation**

Am IPL wurden die Inhalte der Keimträger (mit den Oozysten) möglichst vollständig in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es wurde in einem Röhrchen nach PEETERS und VILLACORTA (1995) ein Percollgradient aus 4 Schichten (jeweils ca. 2 - 2,5 mL) aufgebaut: unverdünntes Percoll (Dichte 1,13), 3:1-Gemisch Percoll-Wasser (Dichte 1,09), 7:13-Gemisch Percoll-Wasser (Dichte 1,05), 1:19-Gemisch Percoll-Wasser (Dichte 1,01 g / mL). Als oberste Schicht wurde die oozystenhaltige Gülleflüssigkeit hineingegeben. Der Gradient wurde 15 min bei 650 g ungebremst zentrifugiert. Die Oozysten wurden an der Grenze zwischen den Phasen 1,09 und 1,05 abgesaugt und noch dreimal mit PBS gewaschen (1500 g, 10 min). Sie waren dann weitestgehend frei von Verunreinigungen.

Die Wiederfindungsrate über Percoll-Gradienten-Zentrifugation betrug mit Oozystenhaltigem Überstand (vgl. 2.3.2.7.2) etwa 70 %. Die Methode war damit wesentlich besser geeignet als die Kochsalz-Flotation, die Oozysten repräsentativ für die folgenden physiologischen Untersuchungen aus den Keimträgern wiederzugewinnen.

### **2.3.2.7.4 Zellkultur und Infektion in vitro**

Allgemein wird die Zellkultur (insbesondere die humane) gegenüber Tiermodellen bevorzugt, da die untere Infektivitätsschwelle eher der unteren Dosis for Infektiosität bei Menschen entspricht (ROSE et al., 2000). Die Ergebnisse für HCT-8-Zellen korrelierten auch gut mit dem CD-1-Maus-Modell (ROCHELLE, 2004). Die humanen Zellkulturen sind damit der geeignetste Standard zur Beurteilung der Infektiosität (zumindest) von Kryptosporidien.

Für die Infektionstests wurden adhärent wachsende HCT-8-Zellen (humane Adenocarcinomzellen, permanent) verwendet. Die Zellen wurden in T75-Flaschen in RPMI-1640-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 100 IE / mL und 100  $\mu\text{g}$  / mL Streptomycin im Brutschrank (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) kultiviert. Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen subkultiviert: der Monolayer wurde mit PBS gewaschen, die Zellen bis zum Ablösen mit Trypsin/EDTA co-inkubiert, im frischen Medium resuspendiert. Etwa 1/5 Volumen wurde in eine neue Flasche überführt. Gleichzeitig mit der Passagierung wurden gegebenenfalls die Kulturen für die Infektionsversuche vorbereitet.



Die Zellen wurden in die Vertiefungen von LabTek Chamber Slides (4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Vertiefung) eingesät und inkubiert, bis ein fast konfluenter Monolayer entstanden war (ca. 2 Tage). Unmittelbar vor der Infektion wurde das Medium gegen ein Exzystierungsmedium (RPMI-1640 mit 0,4 % Natriumtaurocholat) ausgetauscht. Die Oozysten wurden im Medium resuspendiert, in einer Neubauerkammer gezählt und auf eine Dichte von 10<sup>7</sup> pro mL eingestellt. Aus dieser Stammsuspension wurde durch 1:10 Verdünnung mit Medium eine Titrationsreihe hergestellt. Jeweils 100 µL dieser Suspension, entsprechend 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> etc. Oozysten wurden auf die Zellen gegeben. Nach 2 Stunden wurde das Exzystierungsmedium 1:3 mit frischem Medium verdünnt, und die Zellen weitere 24 h inkubiert.

Für die Zellkultur-Immunfluoreszenz (s. 2.3.2.7.6) wurden die Oozysten vor der Infektion gebleicht (10 min 5%iges Na-Hypochlorit), da die Bleichung Vorversuchen zufolge eine etwa 2-fach intensivierete (vmtl. beschleunigte) Ausprägung der Infektionsherde (Foci) bewirkte, die Gesamtanzahl der gebildeten Foci pro Oozyst und die Detektionsgrenze allerdings nicht veränderte.

### **2.3.2.7.5 Zellkultur-PCR**

Der hier beschriebene Zellkultur-PCR-Ansatz wurde nur in den ersten beiden Keimträger-Experimenten (12 / 2003, 07 / 2004) eingesetzt, danach war die von IPL zur Routineanalytik entwickelte Zellkultur-Immunfluoreszenz einsatzbereit.

Die infizierten Zellkulturen wurden mit Trypsin/EDTA bzw. Accutase (PAA Laboratories, Cölbe) abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt, mit PBS gewaschen und in 200 µL PBS resuspendiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung. 2,5 µL Extrakt wurden über PCR amplifiziert. Die Primer wurden von PETRY et al. (1998) veröffentlicht. Die PCR-Gemische (25 µL) hatten folgende Zusammensetzung: 14,8 µL Wasser; 2,5 µL 10-fach PCR-Puffer; 3,5 µL MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 3,5 mM); 0,5 µL dNTP-Mix (je 500 µM); je 0,5 µL Primer (400 µM); 0,2 µL Taq-Poymerase (1 U / Reaktion). Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten: initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min, gefolgt von 35 Wiederholungen von Denaturierung (94°C für 45 sec), Annealing (57°C für 45 sec) und Extension (72°C für 1 min), und einem letzten Extensionsschritt (10 min bei 72°C). Die Produkte wurden auf 1,5 % Agarosegel in TBE-Puffer aufgetrennt, mit EtBr gefärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Bei sichtbaren Banden korrekter Größe wurde die Infektiosität der im Infektiositätstest eingesetzten Verdünnung als positiv gewertet.

### **2.3.2.7.6 Zellkultur-Immunfluoreszenz**

Der hier beschriebene Infektiositätstest über Zellkultur-Immunfluoreszenz konnte ab dem dritten Keimträger-Experiment (11 / 2004) eingesetzt werden.

Das Medium in den Vertiefungen wurde entfernt, und die Zellen 2 - 3 mal mit PBS gewaschen. Die Kammeraufteilung wurde abgenommen und die Zellkulturen in kaltem 70 % Methanol 10 min fixiert, 3 x 2 min mit PBS gewaschen und mit mAK-Lösung (monoklonale Primär-AK aus Maus, U. Mackenstedt, Univ. Hohenheim) überschichtet. Nach Inkubation für 45 min wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (2 - 3 mal), mit dem Sekundär-AK (FITC-markiert, Sigma, F4143) überschichtet und erneut 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen erneut gewaschen, mit Überschichtungspuffer und Deckglas bedeckt, das Deckglas mit Nagellack fixiert, und die Kulturen unter dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dazu wurden die Monolayer auf das Vorhandensein von grün fluoreszierenden Punkten („Foci“, entsprechen den intrazellulären Entwicklungsstadien von *C. parvum*) untersucht und je nach Menge dieser Entwicklungsstadien entweder 20 zufällig ausgewählte Bilder pro Vertiefung oder alle aufzufindenden Foci-Aggregate mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Fläche der Foci wurde mit einem Bildbearbeitungsprogramm bestimmt



und auf das gesamte Well hochgerechnet. Die Anzahl der Foci ergab sich durch die Teilung der gesamten Foci-Fläche durch die Fläche eines einzelnen Focus (durchschnittlicher Durchmesser 4  $\mu\text{m}$ ). Die Reduktion der Infektiosität ergab sich durch Vergleich der Foci-Flächen aus der Infektion der Zellen mit behandelten Oozysten und aus der Infektion mit vitalen Kontroll-Oozysten.

#### **2.3.2.7.7 (Fähigkeit zur) Exzystierung**

Die Oozysten wurden im Medium RPMI-1640 (s. 2.3.2.7.4) mit 0,8 % Natriumtaurocholat resuspendiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension im Eisbad gekühlt, gut gemischt und ein Tropfen auf einem Glasobjektträger mit Phasenkontrast mikroskopiert. Es wurden mindestens 100 Oozysten ausgezählt und dabei die intakten, nicht exzystierten von den exzystierten differenziert. Die Exzystierungsrate ergab sich als Quotient aus der Anzahl der exzystierten Oozysten und der Summe aller (exzystierter und intakter) Oozysten, multipliziert mit 100 %.

#### **2.3.2.7.8 Membranintegrität (Vitalfärbung)**

Die Oozysten wurden in 100  $\mu\text{L}$  HBSS oder PBS resuspendiert, und jeweils 10  $\mu\text{L}$  DAPI- und PI-Stammlösung (2 mg / mL in Methanol bzw. 1 mg / mL in 0,1 M PBS) wurden zugegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, danach die Oozysten 2 mal mit HBSS (PBS) gewaschen. Die gefärbten Oozysten wurden im Epifluoreszenz-Modus mikroskopiert und dabei mindestens 100 Oozysten gezählt und nach Farbstoffaufnahme differenziert (DAPI-positive blau, PI-positive rot). Die PI-positiven wurden als tot eingestuft, die ausschließlich DAPI-positiven als vital.

#### **2.3.2.8 *Giardia duodenalis***

Auf die ursprünglich im Antrag vorgesehene (sporadische) Bestimmung von *Giardia lamblia* (bzw. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*, % in Tab. 4) wurde in Absprache mit LGL (Dr. Schindler) und LfW (Dr. Herb) verzichtet, da die Resistenz von *G. duodenalis* und *C. parvum* gegenüber äusseren Einflüssen praktisch identisch ist (BETANCOURT and ROSE, 2004), und damit bezüglich der Hygienisierungseffizienz keine Unterschiede zu erwarten waren. Der Aufwand, ein geeignetes Zellkultursystem für Giardien zu etablieren, hätte in keinem Verhältnis zum zu erwartenden Ergebnis gestanden. Die für *C. parvum* erhaltenen Ergebnisse bzgl. Verminderung der Infektiosität können BETANCOURT und ROSE (2004) zufolge stellvertretend in erster Näherung auch für Giardien angenommen werden.

#### **2.3.2.9 Rotaviren**

Humane Rotaviren wurden für die Berblinger Biogasanlage (incl. Vorgrube, Endlager, s. 2.1.1.1) durch LGL bestimmt. Nach Homogenisierung der Proben wurde das Rotavirus-Antigen über den bei LGL (Dr. Bayer) etablierten und routinemäßig durchgeführten Enzym-Immunoassay (EIA) nachgewiesen.

Da über EIA sowohl infektiöse als auch nicht-infektiöse Partikel nachgewiesen werden, bedeutet ein negatives Ergebnis, dass in den Proben kein Ziel-Antigen vorhanden war, oder die Konzentration unter der Nachweisgrenze lag.

#### **2.3.2.10 *Enterovirus***

Für die Proben aus der Berblinger Biogasanlage (incl. Vorgrube, Endlager, s. 2.1.1.1) wurden Viren der Gattung *Enterovirus* durch LGL (Dr. Bayer) bestimmt. Nach Homogenisierung der Proben wurde virale RNA mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) extrahiert und



RNA von Enteroviren mit dem *RealArt*<sup>TM</sup> Enterovirus LC Kit (Artus) bestimmt. Laut Herstellerangaben erfasst der Test folgende Enteroviren:

Coxsackievirus: A7, 9, 16, 21, B1-6;

Echovirus: E2-5, 7, 9, 11-20, 24, 26, 27, 29, 30-32, 128;

Enterovirus: R1, 5666, 5865, 70, 71;

Poliovirus: 2, 3, sowie laut LGL Typ 1;

Sabin: 2, 3.

Parallel zum Nachweis durch LGL wurde an TUM-SWW ein RTqPCR-System für die Gattung *Enterovirus* entwickelt (PUSCH et al., 2005) und in Verbindung mit der optimierten RNA-Extraktion für Gülle und Fermentermaterial (s. 2.3.3.1.2) für Proben der Berblinger Biogasanlage eingesetzt.

Da über RT(q)PCR RNA sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Partikel (quantitativ) nachgewiesen wird, bedeutet ein negatives Ergebnis, dass in den Proben keine Ziel-RNA vorhanden war, oder ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze lag. Über den Anteil (nach einer Behandlung eventuell verbleibender) infektiöser Partikel in einer positiven Probe kann keine Aussage gemacht werden.

### 2.3.2.11 *Norovirus*

Für die Proben aus der Berblinger Biogasanlage (incl. Vorgrube, Endlager, s. 2.1.1.1) wurden Viren der Gattung *Norovirus* durch LGL (Dr. Bayer) bestimmt. Nach Homogenisierung der Proben wurde virale RNA mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) extrahiert und RNA von *Norovirus* GgI sowie GgII über RTqPCR nach HÖHNE und SCHREIER (2004) nachgewiesen. Dabei wurden laut Dr. Bayer aktualisierte Primersequenzen (NV 192, NV 193, Sonde TM 7) verwendet.

Parallel zum Nachweis durch LGL wurde an TUM-SWW ein RTqPCR-System für die Genogruppe II von *Norovirus* entwickelt und in Verbindung mit der optimierten RNA-Extraktion für Gülle und Fermentermaterial (s. 2.3.3.1.2) für Berblinger Proben eingesetzt.

Da über RT(q)PCR RNA sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Partikel (quantitativ) nachgewiesen wird, bedeutet ein negatives Ergebnis, dass in den Proben keine Ziel-RNA vorhanden war, oder ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze lag. Über den Anteil (nach einer Behandlung eventuell verbleibender) infektiöser Partikel in einer positiven Probe kann keine Aussage gemacht werden.

## 2.3.3 Molekularbiologische, (RT)qPCR basierte quantitative Nachweise

Molekularbiologische, (RT)qPCR basierte quantitative Nachweise wurden für die Pilotanlage Berbling (s. 2.1.1.1) im Rahmen des Monitorings und der Chargenversuche (s. 2.3.1.1) durchgeführt, sowie für die Modellanlage zur Quantifizierung von *C. parvum* im Rahmen der Keimträgerexperimente (s. 2.1.1.2, 2.3.2.7). Die untersuchten Parameter sind in Tab. 4 aufgelistet. Die Probenvorbehandlung erfolgte wie unter 2.2.1 geschildert.

### 2.3.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Etablierung auch für die problematische Matrix Gülle geeigneter Nukleinsäure-Extraktionssysteme war ein erheblicher Arbeitsaufwand erforderlich, da zum einen Gülle hohe Konzentrationen der hochpotenten PCR-Inhibitoren Huminsäuren und –stoffe (TEBBE and VAHJEN, 1994; ZHOU et al., 1996) aufweist, und zum anderen Sporen und Dauerformen über chemisch-enzymatische Lyse nicht oder nur ungenügend aufgebrochen werden (s. 1.2.3).



Die Ergebnisse dieser Arbeiten mit den relevanten Beschreibungen der Techniken und Materialien wurden in einer Reihe von Veröffentlichungen und Mitteilungen publiziert (HUBER, 2002; LEBUHN, 2002; IHLE et al., 2003; LEBUHN, 2003; LEBUHN et al., 2003; GARCÉS-SANCHEZ et al., 2004a; GARCÉS-SANCHEZ et al., 2004b; LEBUHN et al., 2004a; LEBUHN et al., 2004b; GARCÉS et al., 2005; LEBUHN et al., 2005; PUSCH et al., 2005) und können wegen ihres großen Umfangs hier nicht im Detail dargestellt werden.

In der Essenz ging aus den vergleichenden Untersuchungen hervor, dass die meisten Nukleinsäure-Arten aus Umweltproben (incl. Gülle) am besten über GITC-Silica-Technologie extrahiert werden, für eukaryontische messenger-RNA (mRNA) eigneten sich paramagnetische, Oligo-dT-gekoppelte beads in Verbindung mit einem LiCl-Extraktionspuffer (Dynabeads, Dynal) bisher am besten. Für Bildner von Sporen und Dauerformen muss ein spezifisch adaptiertes physikalisches Zermahlen zwischen Glas/Keramik-Kügelchen (bead-beating, BB) der chemischen Extraktion vorgeschaltet werden, ein leichtes bead-beating erhöhte aber auch für sonst unproblematische Bakterien und Viren, wenn sie in komplexer Matrix (z.B. Gülle) vorlagen, die Extraktions-Effizienz.

Eine gute Extraktionseffizienz ist entscheidend, den angestrebten sensitiven Nachweis in den Proben zu erreichen. Die Extraktionseffizienz ist ein Teil der Methoden-Detektionseffizienz bzw. Wiederfindungsrate, die das Verhältnis von gemessenen zu gespikten (dotierten) Nukleinsäure-Kopien im Extrakt in Prozent wiedergibt. Die Detektionseffizienz (für DNA über qPCR-Analytik des Extrakts) war in den eigenen Analysen immer annähernd 100 % (nicht dargestellt). Es wurde eine mindestens 50 %ige Wiederfindungsrate angestrebt, was bedeutet, dass von 2 ursprünglich vorhandenen Nukleinsäure-Kopien mindestens eine nachgewiesen wird. Dies ist um so wichtiger, da nicht mehr als 40 - 50 mg Gülle in die gängigen Extraktionskits eingesetzt werden konnten, sonst wurde für den Extrakt (100 µL) PCR-Inhibierung erhalten (HUBER, 2002; LEBUHN, 2002). Um den Extrakt quantitativ zu erfassen, müssten 40 qPCR-Analysen (à 2,5 µL) durchgeführt werden. 25 Extraktionen à 40 qPCR-Analysen wären nötig, um bei 50 %iger Wiederfindungsrate eine Methoden-Detektionsgrenze von 1 - 2 Nukleinsäure-Kopien pro 1 mL Gülle zu erhalten. Dies unterstreicht die Bedeutung einer effektiven Homogenisierung bei Herstellung einer Mischprobe sowie einer repräsentativen Probenahme (LEBUHN, 2002).

### **2.3.3.1.1 Extraktion von DNA**

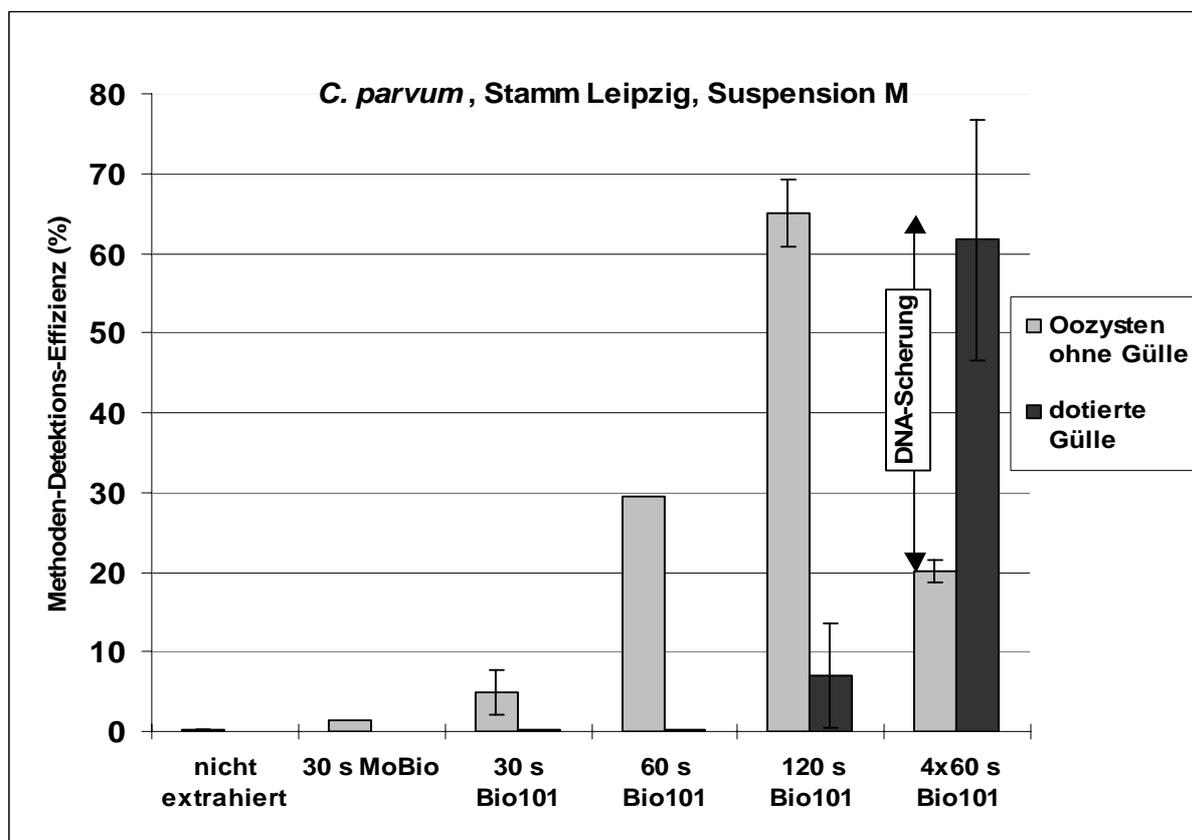
Vier verschiedene, z.Zt. gebräuchliche und häufig empfohlene Systeme wurden hinsichtlich ihrer Eignung für Gülle vergleichend über *E.-coli*-qPCR untersucht:

- konventionelle Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI),
- QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit von QIAGEN (QIA),
- Ultra Clean<sup>™</sup> Soil DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories (MoBio, incl. 30 s vorgeschaltetes BB mit Vortex-Adapter),
- FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil von Bio 101 (Bio101, incl. 30 s vorgeschaltetes BB mit FastPrep 120, speed 4,5).

Mit der PCI-Methode konnte keine PCR-amplifizierbare DNA aus Gülle extrahiert werden. Von den drei Kits erwies sich das Bio101-System als am geeignetsten (kleinste Ct-Werte) und das QIA-System am wenigsten geeignet. In der Arbeit von Huber (2002) werden die Vergleiche ausführlich dargestellt. Dem BB vorgeschaltete Wasch-Schritte (1 x PBS, 2 x 0,85 % KCl) verbesserten die Amplifizierbarkeit des Extrakts wahrscheinlich durch Entfernung von PCR-inhibierenden Huminstoffen oder -säuren wesentlich, während andere Maßnahmen kaum effektiv waren (LEBUHN, 2003; LEBUHN et al., 2003).



Das modifizierte Bio101-System (mit den o.g. vorgeschalteten Waschschritten und 30 s BB, speed 4,5) wurde daher als Basis-Routinemethode verwendet, mit dem für die Parameter *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, thermophile *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* DNA-Wiederfindungsraten konsistent zwischen 70 – 90 % erzielt wurden. Für die Sporenbildner (*Bacillus cereus*-Gruppe, *Clostridium perfringens*) wurden allerdings geringere Ct-Werte (höhere DNA-Gehalte in den Extrakten) erzielt, wenn das BB verlängert und kumulativ gestaltet wurde, und für *C. parvum*-Oozysten waren die Wiederfindungsraten (Methoden-Detektions-Effizienz) aus gespikter Gülle drastisch verbessert (Abb. 3, GARCÉS-SANCHEZ et al., 2004b; LEBUHN et al., 2004a; GARCÉS et al., 2005). Mit einer kumulativen Extraktion mit 4-minütigem BB in Intervallen (30 + 90 + 120 s oder 4 x 60 s) ließen sich für *C. parvum*-Oozysten Wiederfindungsraten aus Gülle zwischen 60 – 90 % erzielen. Für reine *C. parvum*-Oozysten (Suspensionen ohne Gülle) war die Wiederfindungsrate bei 4-minütigem BB wahrscheinlich infolge Scherung von DNA mangels Schutz durch die Gülle-Matrix wieder reduziert (Abb. 3).



Zeiten auf der x-Achse: Längen und Intervalle des BB; MoBio, Bio 101: Extraktionskits, s.Text

Abbildung 3: Wiederfindungsraten für *Cryptosporidium parvum* Oozysten-DNA in Abhängigkeit verschiedener Extraktion

Die guten Extraktionseffizienzen mit dem 4-minütigen kumulativen BB wurden allerdings nicht konsistent erzielt, zeitweise stellte sich in den Extrakten eine wahrscheinlich durch Glasabrieb verursachte Trübung (Glasmilch) ein. Glasmilch (Silika-Partikel) bindet bekanntermaßen DNA und verursachte wohl daher negative Ergebnisse (keine amplifizierbare DNA im Extrakt, nicht dargestellt). Hier besteht noch wesentlicher Optimierungs- bzw. Weiterentwicklungsbedarf.

### 2.3.3.1.2



### **Extraktion von RNA (viral, eukaryontische mRNA)**

Zur Extraktion viraler RNA und eukaryontischer mRNA aus Gülle und Fermenterinhalt wurden unter Verwendung von 5'-Nuklease-Systemen für *Enterovirus*, *Norovirus* GgII und *Cryptosporidium parvum* (Tab. 4) verschiedene Extraktionssysteme nach Herstellerempfehlung getestet:

- RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN),
- Strep Thermo-Fast<sup>®</sup> Plates (ABgene),
- RNaid<sup>®</sup> Plus Kit with SPIN<sup>™</sup> (Bio 101),
- QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>™</sup> Virus Spin Kit (QIAGEN),
- QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (QIAGEN),
- FastRNA<sup>®</sup> Pro Soil-Direct Kit (Bio 101),
- Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECT<sup>™</sup> Kit (Dynal) (nur für *C. parvum*, incl. BB-Vorbehandlung der Probe und DNase-Behandlung des Extrakts).

Ausser für das FastRNA- und das Dynabeads-System lagen die Wiederfindungsraten für Gülle konsistent unter 5 %. Sie wurden auch durch DNeasy<sup>®</sup>-Nachreinigung der cDNA, Zusatz von T4-Gen-32-Protein, RNase H-Behandlung der cDNA sowie einer Reihe von Modifikationen nicht wesentlich verbessert. Deutlich bessere Wiederfindungsraten wurden mit allen getesteten Systemen für (gespikete) Abwasserproben erhalten (nicht dargestellt).

Die besten Wiederfindungsraten für virale RNA aus (gespikter) Gülle wurden mit etwa 20 % mit dem FastRNA-System erzielt, das daher, obwohl es relativ arbeitsaufwändig ist, als Standard-Methode an TUM-SWW etabliert wurde.

Die besten Ergebnisse für eukaryontische mRNA wurden mit dem Dynabeads-System und vorgeschaltetem 165 s (60 + 60 + 45 s) BB erhalten. Dabei wurde etwa um 2,7 log-Stufen mehr cDNA extrahiert als mit den anderen getesteten Systemen. Diese Ergebnisse wurden erst im April 2005 erzielt und konnten daher noch nicht in eine Routine-Methode innerhalb des Projekts umgesetzt werden. Auch für dieses System besteht noch Optimierungspotential (GARCÉS et al., 2005).

### **2.3.3.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR), optional mit vorgeschalteter reverser Transkription (RTqPCR)**

Über (RT)qPCR können, sofern entsprechende Standards vorliegen und mitgemessen werden, für bestimmte Organismen(gruppen) spezifische Nukleinsäure-Sequenzen z.B. in Extrakten aus Umweltproben quantifiziert werden (HEID et al., 1996; LIE and PETROPOULOS, 1998; WILHELM and PINGOUD, 2003). (RT)qPCR hat gegenüber konventionellen Methoden eine Reihe entscheidender Vorteile (LEBUHN et al., 2003), allerdings muss man, insbesondere was die Quantifizierung von mRNA betrifft, ihre Anwendungs-Grenzen kennen (FREEMAN et al., 1999; BUSTIN and NOLAN, 2004; vgl. 2.3.3.1).

#### **2.3.3.2.1 Phylogenetische (fluorogene) Primer und phylogenetische fluorogene Hydrolyse-Sonden**

Phylogenetische Primer und phylogenetische fluorogene Hydrolyse-Sonden (5'-6-FAM, TAMRA-3') bzw. LUX-Primer (NAZARENKO et al., 2002) für die in Tab. 4 (in Spalte (RT)qPCR) aufgeführten Organismen(gruppen) wurden mit Hilfe des Programms ‚Signature‘ (LEBUHN et al., 2005) entwickelt. Verwendet wurden prioritär für die Organismen(gruppen) relevante chromosomale Einzelkopie-Gene (Virulenzfaktoren, Haushaltsgene; LEBUHN, 2002), für breitere Gruppen wie *Enterobacteriaceae* und thermophile *Campylobacter* musste



auf ribosomale DNA zurückgegriffen werden (Mittelwerte 6,4 bzw. 3 Operons pro Genom). Grundlage waren jeweils die aktuellsten Datenbankeinträge in EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>) bzw. GenBank, auf die über HUSAR (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>) zugegriffen wurde. Alle im Folgenden genannten Programm(pakete) sind in HUSAR implementiert. Sequenzen mit signifikanter lokaler oder overall-Ähnlichkeit wurden über BLASTN und FASTA gefunden und in CLUSTAL Alignments angeordnet, aus denen über Signature die für die Zielorganismen spezifischen und für 5'-Nuklease- bzw. LUX-Systeme geeigneten DNA-Bereiche identifiziert wurden.

Über BLASTN, FASTA und MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) wurden die Primer- und SONDENSEQUENZEN gegen die gesamte EMBL-EBI (bzw. GenBank) Datenbank *in silico* getestet und bei dokumentierter Spezifität von Interaktiva (ThermoHybaid) synthetisiert. Aus Spezifitätsgründen wurden Längen angestrebt, die einen  $T_m > 60^\circ\text{C}$  ergaben. Die Systeme wurden dann *in vitro* gegen die an TUM-SWW verfügbare Stammsammlung (über 500 verschiedene relevante Bakterien, Viren und Parasiten) getestet. Für alle entwickelten Primer und Sonden waren die Ergebnisse spezifisch.

### 2.3.3.2.2 (RT)qPCR

Sollte eine spezifische DNA Sequenz in Proben quantifiziert werden, wurden Aliquots der DNA-Extrakte (s. 2.3.3.1.1) entsprechend aliquotierten Master-Mix-Portionen zugesetzt (Abb. 4b) und die PCR gestartet (Kontrolle mit Wasser statt DNA). Diese wurde als 2-Schritt-Reaktion mit vorgeschalteter Aktivierung für die Platinum-*Taq*-Polymerase (Invitrogen) in Eppendorf twin.tec PCR Plates, semi-skirted, verschlossen mit ABI PRISM<sup>TM</sup> Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems), durchgeführt. Stringentes Annealing und Zusammensetzung des Master-Mix für die Anwendung mit Gülle-Extrakten waren zuvor auf annähernd 100 % PCR-Effizienz optimiert worden (HUBER, 2002; LEBUHN et al., 2003). Bei Einsatz von LUX-Primern wurde die Sonde durch Wasser ersetzt.

auf Eis!	x Ansätze		Endkonz. (nm)		1 Ansatz (µL)	x Ansätze		Endkonz. (nm)
	1 Ansatz (µL)	4,5				27		
Puffer (5x, enth. 40 mM MgCl <sub>2</sub> )	5	22,5	1x (8 mM Mg)	Puffer (10x, ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5	67,5	1x	
RNase Inhibitor (40 u / µL)	1,25	5,625	50 u	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6	162	6 mM	
dNTPs (10 mM each)	2,5	11,25	1 mM	dNTPs (10 mM each)	0,5	13,5	200 µM	
rev.-Primer (10 µM)	1,25	5,625	1000	forw.-Primer (10 µM)	1,5	40,5	600	
DTT (100µM)	1,25	5,625	5000	rev.-Primer (10 µM)	1,5	40,5	600	
ThermoScript-RT (15 u / µL)	0,625	2,8125	9,375 u	Sonde (10 µM)	0,75	20,25	300	
H <sub>2</sub> O (=ad Master-Mix Vol.)	8,125	36,5625		Rox (100 µM)	0,25	6,75	1000	
Master-Mix	20	90		Platinum-Taq-Pol. (5 u / µL)	0,15	4,05	0,75 u	
RNA	5	22,5		H <sub>2</sub> O (=ad Master-Mix Volumen)	9,35	252,45		
Ges.-Vol.	25	112,5		Master-Mix	22,5	607,5		
				DNA	2,5	67,5		
				Reaktions-Volumen	25	675		

A: Typischer Master-Mix für die RT

B: Typischer Master-Mix für die qPCR

Abbildung 4: Typische Ansätze für die (RT)qPCR

Sollte eine spezifische (m)RNA Sequenz in Proben quantifiziert werden, wurden Aliquots der RNA-Extrakte (s. 2.3.3.1.2) zunächst mit DNase (Turbo DNA-*free*<sup>TM</sup> DNase, Ambion) behandelt (Kontrolle ohne DNase-Behandlung), entsprechend aliquotierten Master-Mix-Portionen zugesetzt (Abb. 4a) und die Reverse Transcription (ThermoScript<sup>TM</sup> RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, RT, Invitrogen) gestartet (Kontrollen ohne RT). Ein Aliquot der Reaktionsprodukte (cDNA) wurde dann wie oben beschrieben in die qPCR eingesetzt. Die Vergleiche mit den Kontrollen zeigten in allen Fällen (annähernd) 100 % Effizienz der DNase-Behandlung. Eventuelle Rest-DNA-Spuren wurden als Background von den spezifischen Signalen subtrahiert. Zugabe von T4-Gen-32-Protein zur RT und eine RNase H-



Behandlung (Ambion) nach der RT ergaben keine Verbesserung der cDNA-Ausbeute (nicht dargestellt).

Jede Messung in der qPCR wurde als Triplikat im AB5700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden die Ct-Werte bestimmt, die Kreuzungspunkte der exponentiellen Amplifikations-Kurven mit der Basislinie (Threshold). Bei der RTqPCR wurden die erhaltenen Ct-Werte um 1 reduziert, da die einzelsträngige (ss-)cDNA im ersten Zyklus lediglich zur ds-cDNA komplementarisiert wird, und 2 DNA-Stränge zur exponentiellen Amplifikation erforderlich sind.

### **2.3.3.2.3 Standard Spiking von Umweltproben und Quantifizierung**

Für MPN-Ansätze (s. 2.3.2.3, 2.3.2.4) wurde der Extrakt seriell verdünnt, Triplikate der Verdünnungen in die qPCR (s. 2.3.3.2.2) eingesetzt, und aus geeigneten Verdünnungen die MPN bestimmt (DE MAN, 1983).

Zur exakten Quantifizierung der Ziel-DNA-Sequenzen und damit der Zielorganismen (tote und lebende, Anzahl der Kopien pro Zelle bekannt, s. 2.3.3.2.1) in den zu untersuchenden Proben wurde ein Standard-Spiking (Dotierung verschiedener, bekannter Mengen der Zielorganismen) -Verfahren entwickelt (HUBER, 2002; LEBUHN, 2002; LEBUHN, 2003; LEBUHN et al., 2003; LEBUHN et al., 2004b). Dazu wurden mindestens 4, typischerweise aber 5 - 6 Aliquots der homogenisierten Probe extrahiert. Davon waren 1 - 2 Proben ungespikt (endogene Gehalte), 1 - 2 Proben mit geringen (0,3 - 30) DNA-Kopien (zur Absicherung der endogenen Gehalte und Evaluierung von PCR-Inhibierung) dotiert und 2 - 4 Proben mit hohen Kopienzahlen gespikt (je nach endogenen Gehalten  $> 10^4 - 10^7$ ). Aus letzteren wurde im Ct - log[Kopien] - Diagramm die Steigung der Dotierungskurve ermittelt, über die sich wiederum in einem Iterationsansatz die unbekanntenen endogenen Gehalte berechnen ließen. Für diese Berechnung wurde neben einer grafischen Auswertung der Diagramme (HUBER, 2002) ein DOS-basiertes Command-Line-Programm entwickelt ("CeTe", LEBUHN et al., 2003; LEBUHN and MAJEWSKI, 2005). Beide Datensätze flossen in die vergleichenden Analysen der Proben der Berblinger Pilot- (s. 2.3.1.1) und der Modellanlage (s. 2.3.1.2) ein.

Um Effekte eventueller PCR-Inhibierung oder unterschiedlicher Amplifikation von Ziel- und Referenzgen auszuschließen, ist ein solcher Standard-Spiking-Ansatz mit Dotierung der zu analysierenden Zielorganismen in bekannten Konzentrationen unerlässlich. Im Standard-Spiking-Verfahren betreffen alle Einflüsse, die nach Zugabe des Spike zur homogenisierten Probe auf diese einwirken, Spike und endogen vorhandene Mikroorganismen gleichermaßen. Die Berechnung anhand des Spike ist damit Behandlungs-unabhängig. Obwohl die Methode relativ aufwändig ist und für jede Probe einzeln durchgeführt werden muss, ist sie der einzige verlässliche Ansatz zur Quantifizierung in Proben, wenn mit in der Wirkung schwer abschätzbaren Einflüssen auf die Extraktions und/oder Analyse-Prozedur gerechnet werden muss.

## **3**



## Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Pilotanlage Berbling

Versuchsanlage und Probenahmepunkte sind bei 2.1.1 beschrieben, Näheres zu Probenahme und -aufbereitung bei 2.2.1. Es wurden Monitoring- und teilweise Chargenversuche durchgeführt (s. 2.3.1.1). Das Wärmemanagement der Berblinger Anlage war bis Mitte Februar 2004 mit Temperaturen im thermophilen F2 teilweise bis 48°C suboptimal, während danach konstant 55°C gehalten werden konnten (s. 2.1.1.1). Entsprechend sind die bis Mitte Februar 2004 erhaltenen Ergebnisse als "worst-case scenario", die folgenden dagegen für Regelbetrieb einzustufen. Die Zäsur Mitte Februar betraf sowohl das Monitoring als auch die Chargenversuche. Ab Anfang März 2005 wurde der erste mesophile Fermenter F1 psychrophil betrieben (s. 2.1.1.1).

#### 3.1.1 Fäkalcoliforme (Keimzahlen) und *Escherichia coli* (DNA)

Die Fäkalcoliformen-Keimzahlen wurden über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. 2.3.2.1), die *E. coli*-DNA-Kopien über Standard-Spiking qPCR (s. 2.3.3.2.3) bestimmt.

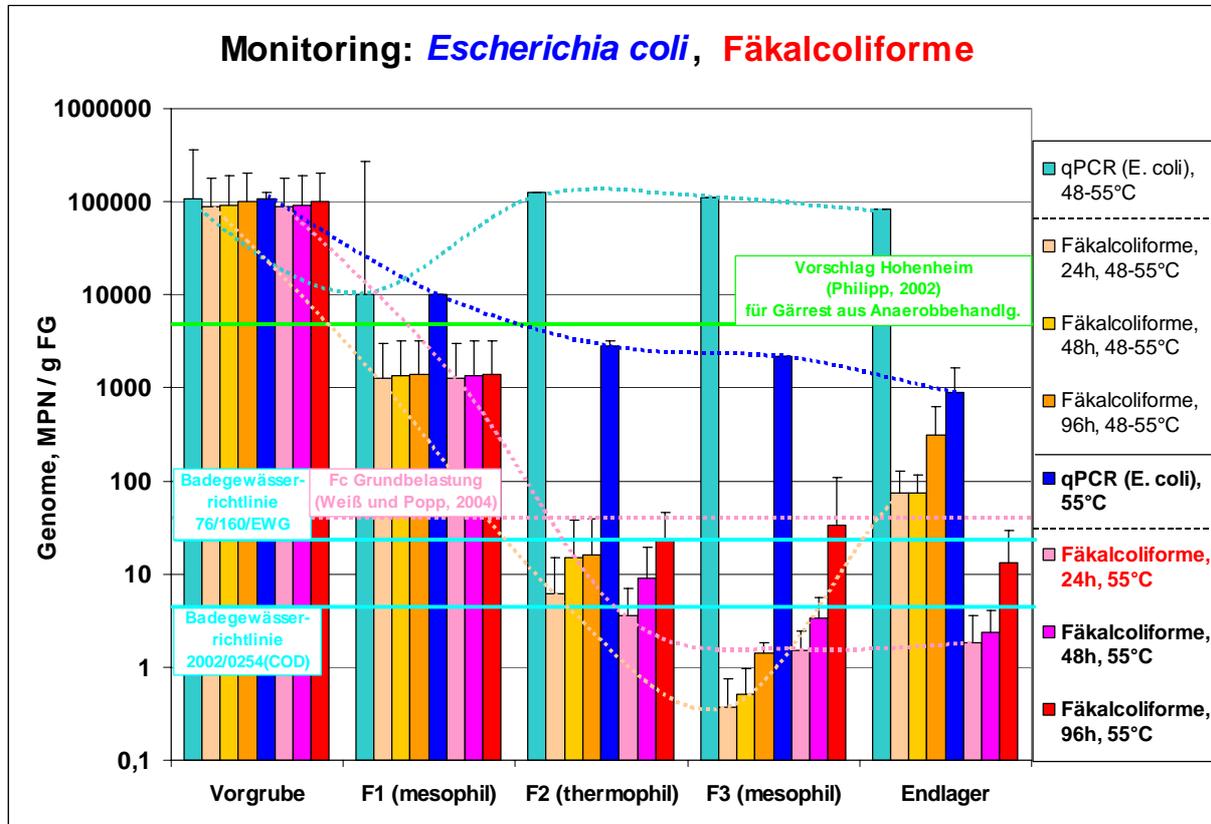
##### 3.1.1.1 Monitoring Pilotanlage Berbling

Abb. 5 zeigt die Monitoring-Ergebnisse für die MPN der Fäkalcoliformen und die Anzahl *E. coli*-DNA-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Pilotanlage.

Während die Fäkalcoliformen in der Fermenterkette stark sanken und lediglich bei 48 - 55°C, nicht aber bei gesicherten 55°C im F2 im Endlager wieder zunahmen, nahm die Anzahl der *E. coli* DNA-Kopien ausgehend vom gleichen, über das Fluorocult®-System bestimmten Ausgangsniveau nicht oder nur unerheblich ab (Abb. 5). Dies weist einerseits auf hohe Spezifität beider Methoden hin, andererseits war Äquivalenz der Ergebnisse nur unter äquilibrierten Verhältnissen im Probenmaterial (hier Gülle in der Vorgrube) gegeben. Im Vorgrubenmaterial ist offenbar der Anteil abgestorbener Zellen, der über qPCR miterfasst wird (s. unten) vernachlässigbar. Bei zunehmender Temperatur unter den Vergärungsverhältnissen öffnete sich die Schere der Ergebnisse aus beiden Methoden, wobei über qPCR offenbar der Anteil abgestorbener Zellen miterfasst wird. Die nur leichte Abnahme der *E. coli*-DNA ist wohl auf einen entsprechend geringen Abbau der DNA zurückzuführen. LEBUHN et al. (2004b) zeigten, dass *Enterobacteriaceae*-DNA selbst 3 Tage nach Autoklavieren und 15 min UV-Bestrahlung noch in fast unveränderter Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Frischgülle-Probe nachzuweisen war, während bereits nach Autoklavieren keine coliformen Zellen mehr kultivierbar waren. Aufgrund der erheblichen Überschätzung der Lebendkeimzahlen ist die qPCR-Methode mit DNA als Zielmolekül nicht geeignet, lebende Zellen nach (partiell) lethalem Stress-Einfluss zu quantifizieren.

Andererseits scheint die Fluorocult®-Methode nach Stress-Einwirkung lebende Zellen zu unterschätzen, wie die ca. eine log-Stufe starke Zunahme der MPN für Fäkalcoliforme in den Fermentern F2 und F3 und im Endlager bei 4 Tagen Bebrütung gegenüber konventionell durchgeführter 1-tägiger Bebrütung nahelegt (Abb. 5, Abb. 6). Offenbar bewirkten die anaerobe mesophile und die thermophile Behandlung nicht nur Absterben von *E. coli*, sondern auch Bildung von sublethal geschädigten bzw. ABNC-Zellen, deren tatsächliches Ausmaß allerdings unklar bleibt. Bemerkenswert ist auch, dass in den Fluorocult®-Röhrchen von Fermenter- und Endlager-Proben zuweilen Fluoreszenz ohne Gasbildung auftrat (nicht dargestellt). Dieses Phänomen kann Folge von Stressatmung (HEILMANN et al., 1993; HEILMANN et al., 1995) sein, wobei Reparatur-Metabolismus mit verstärkter Veratmung leicht metabolisierbaren Substrats die Vergärung komplett unterdrückt. Vermutlich konnte *E. coli*

MUG nach der thermophilen Behandlung zunächst zum Reparatur-Metabolismus über (Stress-)Atmung verwerten, während die Vergärung erst später während der Inkubation in Fluorocult® aktiv werden konnte. Es könnten auch andere, nicht-gasbildende aber MUG-spaltende Organismen, nach der Behandlung relativ zu *E. coli* stark zugenommen haben.



24h, 48h und 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Vorschläge, Richtlinien und Belastungsniveaus skizziert.

Abbildung 5: *Escherichia coli* (Genome) und Fäkalcoliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring

Abb. 5 zeigt, dass die Fäkalcoliformen bereits nach Passage des mesophilen F1 unter dem Hohenheimer Vorschlag ( $5 \times 10^3$  Fäkalcoliforme / mL) für Gärrest aus Anaerobbehandlung lagen. Bei gesicherten 55°C im F2 lagen sie nach der thermophilen Behandlung (auch im Endlager) unter der bei WEIß und POPP (2004) angegebenen Hintergrundbelastung für Sicker- bzw. Dränwässer (10 – 100 MPN / mL bzw. Mittelwert 38 MPN / mL) sowie sogar unter dem Grenzwert der EU-Badegewässerrichtlinie 2002/0254(COD) (Abb. 5). Bei solchen Vergleichen sind nur die Werte für die konventionelle 24 h Bebrütung zu berücksichtigen. Für die Proben mit suboptimalem Temperaturmanagement im F2 (48 - 55°C) wurde eine starke Reduzierung im F2 und F3, dann aber eine starke Wiederverkeimung im Endlager (Abb. 5, Abb. 6) erhalten. Demnach ist ein gesichertes Einwirken von 55°C erforderlich, um eine Rückverkeimung von *E. coli* im Endlager praktisch quantitativ zu unterbinden.

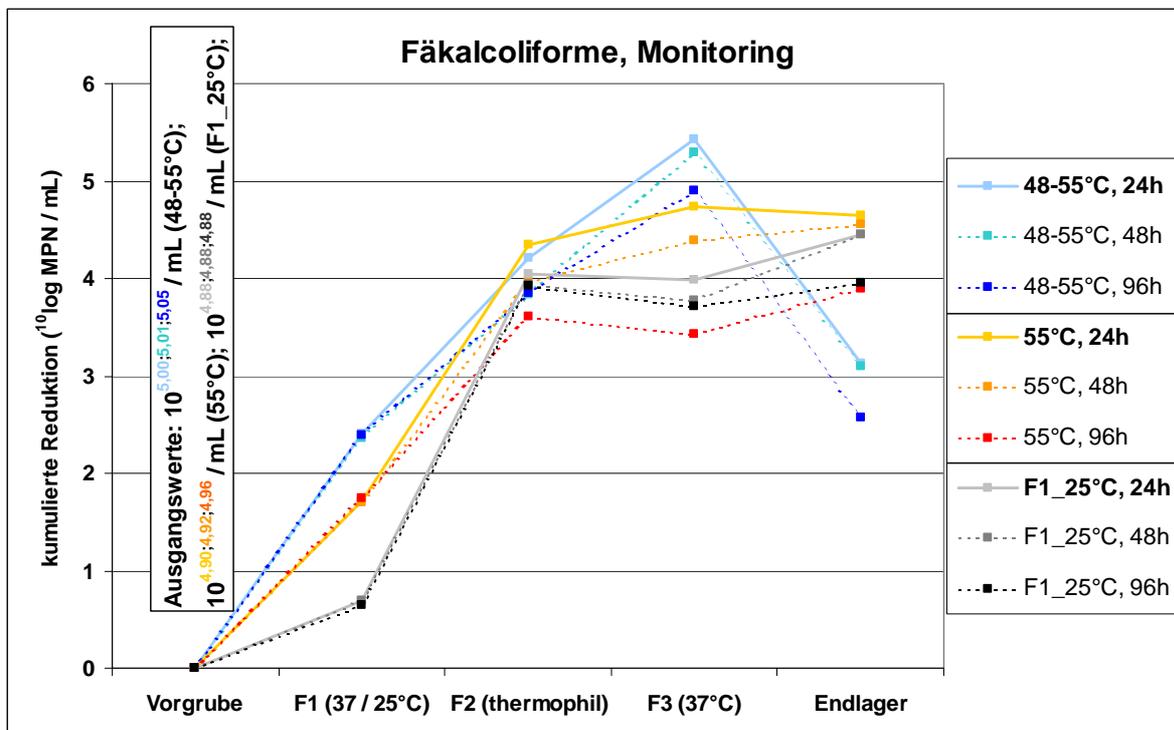
Abb. 6 zeigt die über die Kompartimente der Berblinger Pilotanlage im Monitoring erhaltene kumulierte Reduktion der Fäkalcoliformen. Bei konventioneller (24 h) Bebrütung in den Fluorocult®-Ansätzen betrug sie nach Durchgang des thermophilen F2 bei gesicherten 55°C 4,39 log-Stufen, nach dem F3 sogar 4,77 log-Stufen und im Endlager bei marginaler Rückverkeimung immer noch 4,68 log-Stufen. Unter diesen Bedingungen waren im Endlager noch  $1,8 \pm 1,7$  Fäkalcoliforme / mL nachweisbar, was hart an der Nachweisgrenze des



Systems liegt. Dies zeigt, dass Fäkalcoliforme bei 55°C mit gesicherter minimaler Einwirkzeit von 8 – 9 h praktisch quantitativ abgetötet werden. Der genaue Betrag der ABNC-Bildung ist zwar nicht bekannt, ist aber wahrscheinlich unter diesen Bedingungen unerheblich.

Ähnlich effizient wie bei 55°C war die Reduktion der Fäkalcoliformen in der Berblinger Pilotanlage bei suboptimalem Temperaturmanagement im F2 (48 - 55°C) in den Fermentern, im Endlager nahmen sie aber um mehr als 2 log-Stufen auf  $73 \pm 55$  wieder zu (Abb. 6). Hier scheint Bildung von sublethal geschädigten ABNC-Zellen stattgefunden zu haben, die über die Fluorocult®-Messung nicht oder zumindest nicht quantitativ erfasst wurden, und die sich unter den günstigen Bedingungen im Endlager offenbar stabilisierten und wieder vermehrten.

Material aus dem mesophil oder psychrophil betriebenen F1 erreichte weder bei stündlicher noch bei 4-stündlicher Beschickung das Niveau der bei WEIB und POPP (2004) angegebenen Hintergrundbelastung für Fäkalcoliforme (s. oben, Abb. 5), und diese waren im Mittel auch nur um weniger als 2-log-Stufen reduziert (Abb. 6). Mesophile oder psychrophile Behandlung allein mit gesicherter Verweilzeit von  $\leq 4$ h kann damit nicht als unbedenklich angesehen werden. Um bei Gärrest-Ausbringung in sensiblen Gebieten (z.B. Wasserschutzzone II) eine Belastung des Grundwassers durch Fäkalcoliforme auszuschließen, sollte daher auf einen Hygienisierungsschritt zumindest bei gesicherten 55°C nicht verzichtet werden.



48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. 2.1.1.1); 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

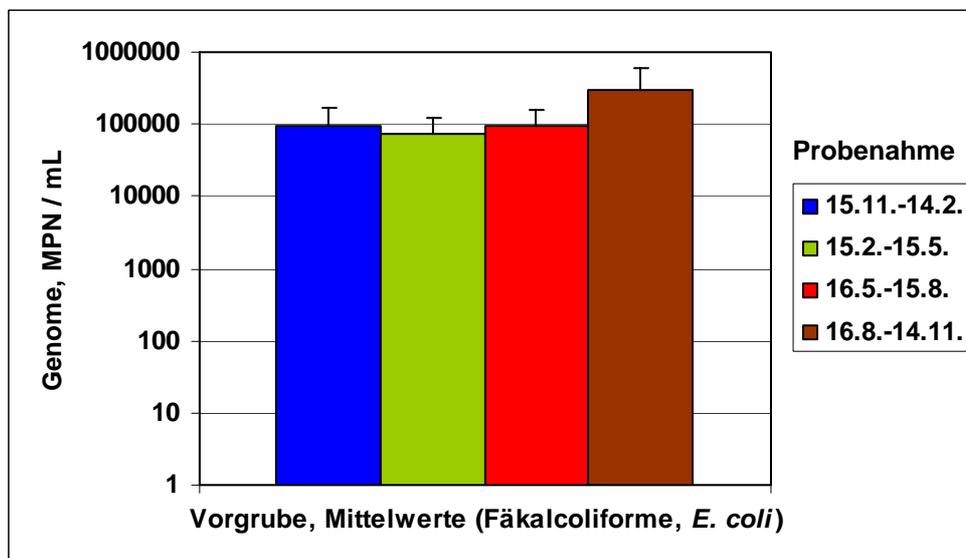
Abbildung 6: Fäkalcoliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage

Nach Umstellung des F1 von mesophilem auf psychrophilen (20 – 25°C) Betrieb Anfang März 2005 war die abtötende Wirkung auf Fäkalcoliforme in diesem Fermenter um fast 1 log-Stufe geringer, der folgende F2 (Betrieb bei 55°C) kompensierte diesen Effekt jedoch völlig. Bei stabilem Betrieb des F2 bei 55°C waren Fäkalcoliforme nach dem F2 (unabhängig von der Betriebsweise des F1) um mehr als 4 log-Stufen reduziert (Abb. 6). Rückverkeimung im Endlager war auch hier unerheblich. Hinsichtlich der Gesamtwirkung auf Fäkalcoliforme war kein Unterschied der psychrophil-thermophil-mesophilen gegenüber der vorherigen mesophil-thermophil-mesophilen Betriebsweise im Endprodukt erkennbar (Abb. 6).



Die Werte für Fäkalcoliforme und *E. coli*-DNA in der Vorgrube schwankten stark. Der kleinste Wert betrug  $7,2 \times 10^3$  MPN Fäkalcoliforme / mL, der höchste  $9,7 \times 10^5$  Kopien *E. coli*-DNA / mL. Dies entspricht etwa den Werten bei WEIß und POPP (2004), dort zitierten Angaben oder z.B. FINK et al. (1997). Die Angaben in GELDREICH (1978) liegen mit  $2,3 \times 10^5$  Fäkalcoliformen ebenfalls in diesem Bereich. Wegen der beobachteten Schwankungen wurde über eine ANOVA (SPSS 10.0) analysiert, ob ein jahreszeitlicher Einfluss auf die Gehalte an Fäkalcoliformen und *E. coli*-DNA vorliegt. Innerhalb der 4 Jahreszeiten als unabhängige Variablen wurden jeweils die Daten zu Fäkalcoliformen und *E. coli*-DNA-Kopien äquivalent verwendet, da sich in Abb. 5 keine Differenzen zwischen diesen Parametern in der Vorgrube zeigten. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

Abb. 7 zeigt, dass zu den Herbstterminen die Gehalte an Fäkalcoliformen und *E. coli*-DNA im Mittel mit  $2,97 \times 10^5$  / mL um den Faktor 2 - 3 höher lagen als während der anderen 3 Jahreszeiten. Dieser Unterschied war gering aber im LSD-Post-Hoc-Test signifikant (Herbst - Frühjahr:  $p = 0,11$ ; Herbst - Winter:  $p = 0,24$ ; Herbst - Sommer:  $p = 0,27$ ). Homogenität der Varianzen (Levene-Test) war gegeben. Wohl infolge der relativ großen Streuung war im Bonferroni-Post-Hoc-Test kein Unterschied signifikant. Theoretisch sind Fütterungs-bedingte Einflüsse (jahreszeitlich verschiedene Zusammensetzung der TMR, s. 2.1.1.1) denkbar, möglich sind auch Einflüsse, die von eventuell jahreszeitlich unterschiedlichen Gülle-Zusätzen wie z.B. Strohmehl, im Stall anfallendes Abwasser von Melkstand, Milchküche und Waschraum herrühren. Analysen mit höherer Probenahmedichte sollten bestätigen, ob und in welcher Art ein jahreszeitlicher Einfluss auf die Gehalte an Fäkalcoliformen und *E. coli* in Rindergülle bzw. in der Vorgrube besteht. Die Ergebnisse bestätigen allerdings, dass v.a in mehrstufigen Praxisanlagen Hygienisierung möglichst über ein Verfolgen definierter Chargen (s. 2.3.1.1, 3.1.1.2) dokumentiert werden sollte.



Probenahmeterminen: 15.11.-14.2.: Winter; 15.2.-15.5.: Frühjahr; 16.5.-15.8.: Sommer; 16.8.-14.11.: Herbst

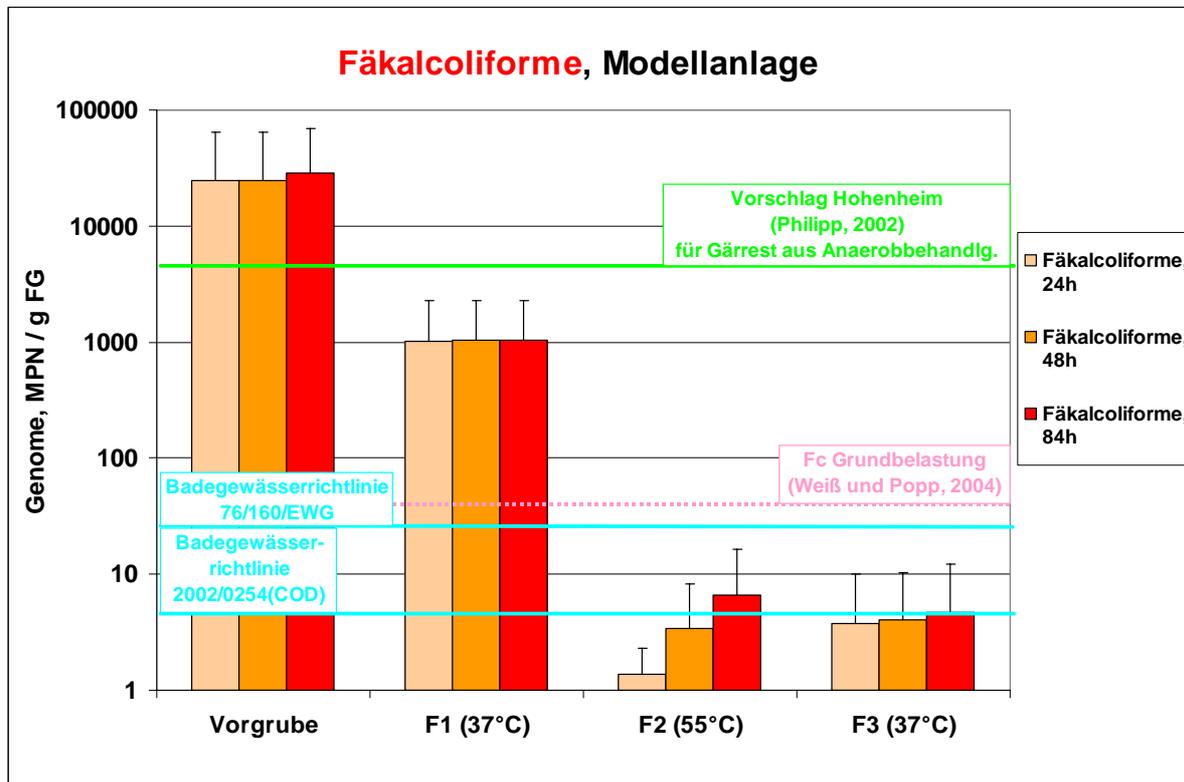
Abbildung 7: Jahreszeitlicher Gang der Fäkalcoliformen, *E. coli*-Genome in der Vorgrube der Berblinger Biogasanlage

### 3.1.1.2 Monitoring Modellanlage

Die Untersuchung der Hygienisierungsleistung der 1:6 verkleinerten Modellanlage (s. 2.1.1.2) diente der Überprüfung der entsprechenden Ergebnisse der Berblinger Pilotanlage (s. 3.1.1.1) sowie zur Beurteilung eventueller Up- bzw. Downscaling-Effekte.



Die Reduktion der Fäkalcoliformen (Abb. 8) verlief in der Modellanlage qualitativ und quantitativ nahezu identisch wie in der Berblinger Pilotanlage (Abb. 5). Die Keimreduktion zwischen Vorgrube und Auslauf von F2 sowie F3 fiel zwar für die Modellanlage mit etwa 4 log-Stufen etwas geringer (ca. 0,5 log-Stufen) aus als für die Pilotanlage (Abb. 6), dies ist aber auf die im Mittel etwa 5-fach geringere Eingangskonzentration im Vorlagebehälter der Modellanlage zurückzuführen (vgl. 3.1.3). Demnach wären Ergebnisse bzgl. Keimreduktion aus der Modellanlage auf die Pilotanlage übertragbar. Up- bzw. Downscaling-Effekte scheinen für die Keimreduktion zumindest im überprüften Bereich keine Rolle zu spielen.



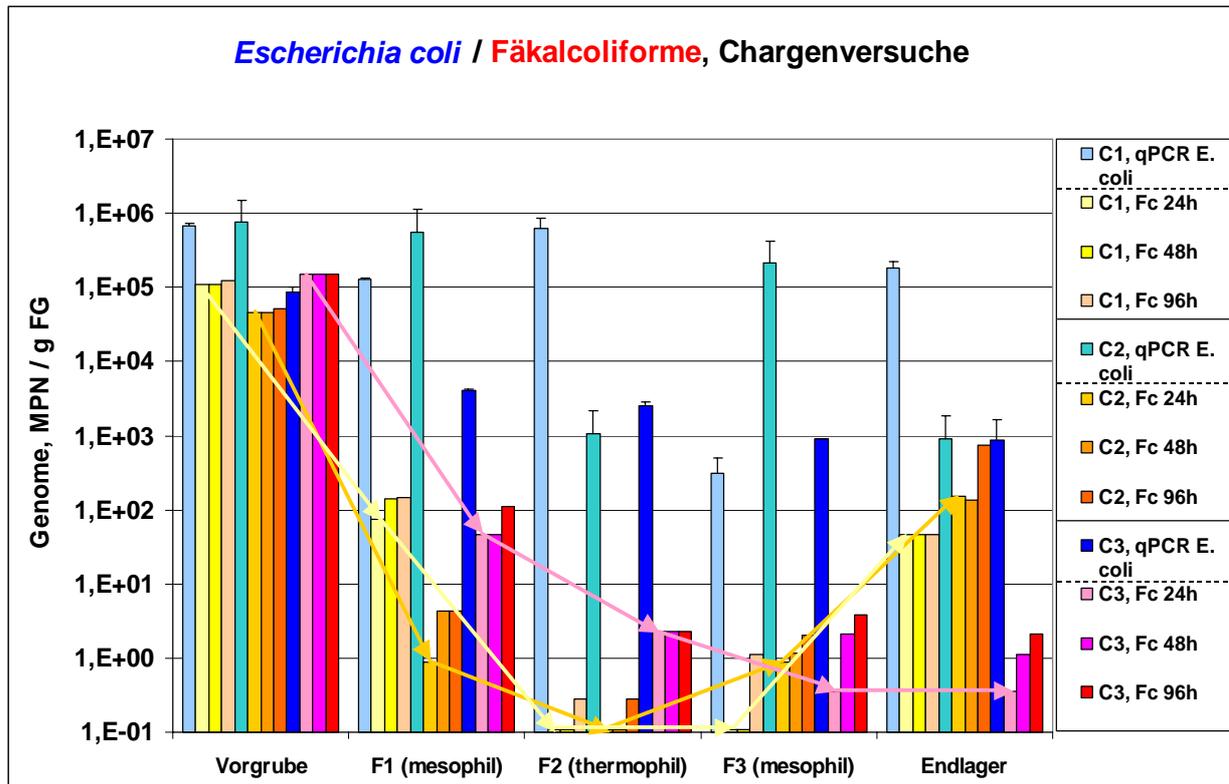
24h, 48h und 84h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 8: Fäkalcoliforme, Modellanlage, Monitoring

### 3.1.1.3 Chargenversuche und Wiederverkeimung

Es wurden 3 Chargenversuche (s. 2.3.1.1) durchgeführt, der erste (C1) begann am 25.8.2003, der zweite (C2) am 3.9.2003 und der dritte (C3) am 15.3.2004. Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse zur Reduktion von Fäkalcoliformen und *E. coli*-Genomen sind denen aus dem Monitoring (s. 3.1.1.1, Abb. 5) sehr ähnlich. Deutlich waren in gleicher Weise die Überschätzung lebender *E. coli*-Zellen durch die qPCR und die Unterschätzung der Fäkalcoliformen-Gehalte nach 24 h Inkubation in Fluorocult® nach den Stress-Einflüssen in den Fermentern sowie im Endlager. Im dritten Chargenversuch ergab sich eine langsame aber stetige Abnahme der *E. coli*-DNA-Zielsequenzen, während die Abnahme in den ersten beiden Chargenversuchen nicht stetig war. Hier kam es wegen BHKW-Ausfällen beim F2 zu Beschickungsausfällen und Unterbrechungen der Rührung (s. 2.1.1.1), was wiederum wahrscheinlich lokale (v.a. an den Fermenterwänden) Überhitzungen und damit ein nicht kalkulierbares Absterben u.a. von *E. coli* ohne DNA-Abbau und die in den ersten beiden Chargenversuchen teilweise sehr hohen *E. coli*-DNA-Gehalte (Abb. 9, vgl. Abb. 5) zur Folge hatte. Wegen der zeitweise unterbrochenen Förderung in den ersten beiden Chargenversuchen könnten hier auch Chargen vor den Ziel-Chargen beprobt worden sein und die Turbulenzen in

den DNA-Gehalten (höhere DNA-Gehalte im Folgefermenter bzw. im Endlager als im betrachteten Fermenter) bewirkt haben.

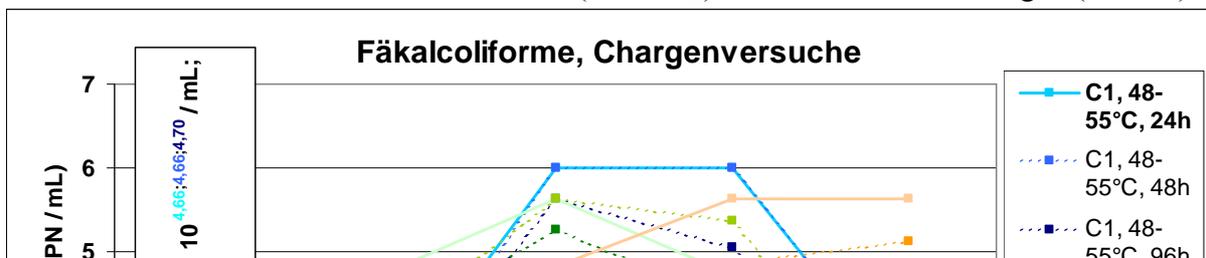


C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3 (s. Text); Fc: Fäkalcoliforme; 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe über Pfeile hervorgehoben.

Abbildung 9: *Escherichia coli* (DNA) und Fäkalcoliforme, Chargenversuche, Pilotanlage Berbling

Diese Turbulenzen waren im Gang der Fäkalcoliformen-Gehalte nicht erkennbar, allerdings wurde auch hier (nur in den ersten beiden Chargenversuchen) wohl infolge der Temperaturabfälle (48 - 55°C, s. 2.1.1.1) eine Wiederverkeimung im Endlager um ca. 2 log-Stufen erhalten. Die Wiederverkeimung begann sogar teilweise bereits im F3 (Abb. 9, Abb. 10). Eine Wiederverkeimung Fäkalcoliformer war dagegen im 3. Chargenexperiment bei gesicherten 55°C im F2 nicht erkennbar (Abb. 9, Abb. 10). Hier betrug die Reduktion Fäkalcoliformer zwischen Vorgrube und Endlager je nach Dauer der Bebrütung sogar 4,85 - 5,62 log-Stufen (Abb. 10).

Diese Ergebnisse dokumentieren die Wichtigkeit der Temperaturführung in der Hygienisierungsstufe. Bei gesicherten 55°C im thermophilen F2 erfolgte offenbar keine Rückverkeimung durch Fäkalcoliforme in den Stufen nach dem F2, während sich bei suboptimalem Betrieb eine deutliche Wiederverkeimung ergab. Ähnliche Befunde ergaben sich auch für die Coliformen (s. 3.1.2) und die intestinalen Enterokokken (s. 3.1.3). Die Ergebnisse aus dem Modell-Endlagerversuch waren in gleicher Weise zu interpretieren (s. 3.1.1.4). Die Wiederverkeimung durch die mesophilen bis thermotoleranten Vertreter dieser Gruppen scheint daher generell durch eine 8 - 9 stündige Behandlung von Rindergülle bei 55°C völlig unterbunden oder zumindest sehr stark reduziert zu sein. Bei der hygienisierenden Wirkung ist sicher die Höhe der Temperatur und die Einwirkungsdauer dominant, ein zusätzlicher Effekt von Gülle-Inhaltsstoffen (z.B. NH<sub>3</sub>) ist aber zu berücksichtigen (s. 3.1.8).





C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004; 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

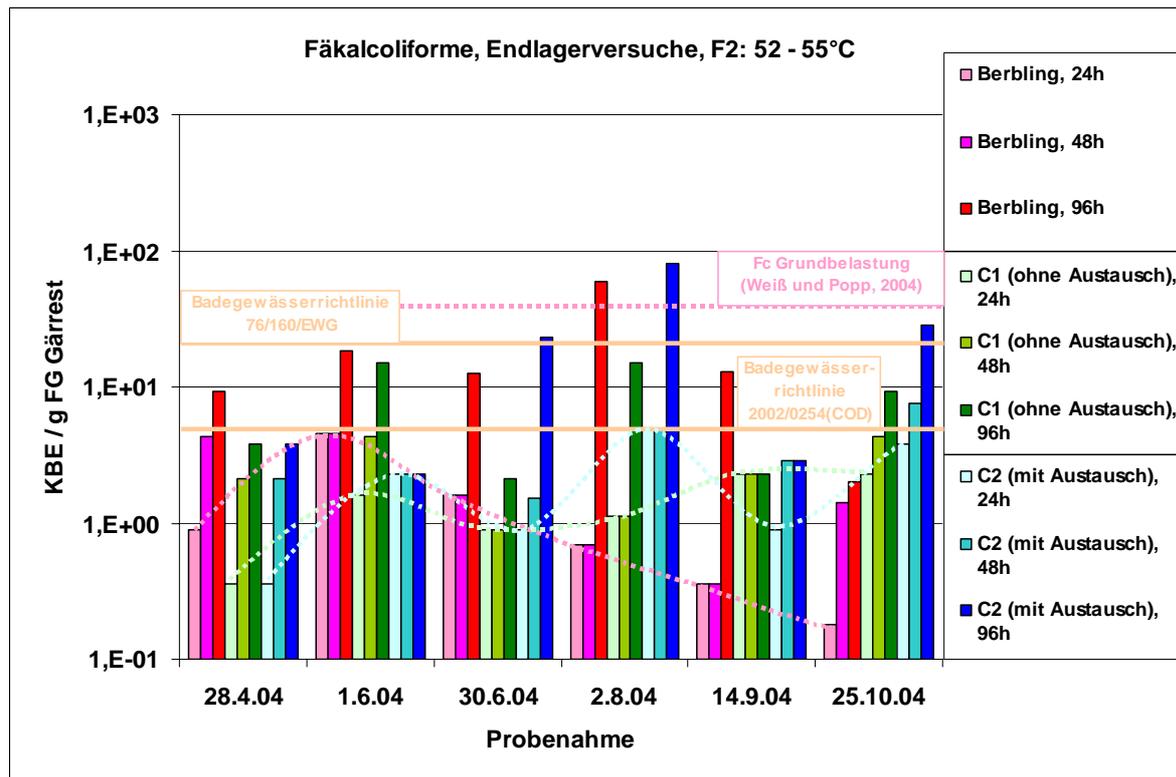
Abbildung 10: Fäkalcoliforme, Chargenversuche, kumulierte Reduktion, Pilotanlage Berbling

### 3.1.1.4 Modell-Endlagerversuch

Während des 4-monatigen Modell-Endlagerversuchs (s. 2.1.1.3) mit Material aus der Berblinger Pilotanlage zu Zeiten suboptimalen Temperaturmanagements (48 - 55°C, s. 2.1.1.1) war in den Endlagern kein eindeutiger, die 3 Varianten (Berblinger Endlager; C1: Modell-Endlager ohne Austausch; C2: Modell-Endlager mit Austausch; s. 2.1.1.3) differenzierender Trend zu erkennen (Abb. 11).

Das Material, das für die Versuchsanlage verwendet wurde stammte rechnerisch im thermophilen F2 (Versuchsanlage - hydraul. Verweilzeit F3 - Verweilzeit der Hauptfracht im F2 = ca. 30 d) aus dem Zeitraum 27.3.04 - 2.4.04, wo 52 - 55°C im F2 gemessen wurden (EFFENBERGER et al., 2006). Dementsprechend war die Belastung mit Fäkalcoliformen in diesem Material mit 0,36 MPN / g FG (Abb. ???) sehr gering. In allen 3 Varianten war eine Rückverkeimung um etwa oder weniger als 1 log Stufe zu beobachten, wobei die Werte aber immer unter der Marke von 5 KBE / mL Fäkalcoliforme der Badegewässerrichtlinie 2002/0254 (COD) blieben (Abb. 11). Dies belegt, dass die Rückverkeimung Fäkalcoliformer in einem hygienisch einwandfreien Endlager und gesicherter Verweilzeit von mindestens 8 - 9 h in einer vorgeschalteten thermophilen Stufe mit gesicherten 55°C bei der Vergärung von Rindergülle maximal 1 log-Stufe beträgt. Eine spätere Rückverkeimung im Endlager ist, wenn Kontamination von außen ausgeschlossen ist, äußerst unwahrscheinlich (STRAUCH, 1987; DEUTRICH und PIOCH, 1991). Bei suboptimaler Temperaturführung (s. 3.1.1.1, 3.1.1.3) und Kontamination im Endlager kann die Rückverkeimung größer sein.

Eine Rückverkeimung im Endlager betrug auch für die ziemlich thermoresistenten Enterokokken nicht mehr als 1 log-Stufe (s. 3.1.3), und für die anderen untersuchten Parameter war kein Anhalt für eine Rückverkeimung erkennbar (s. unten). Gleichartige Ergebnisse wurden auch für die Coliformen erzielt, diese reagierten allerdings auf suboptimale Temperaturführung im F2 am empfindlichsten mit Rückverkeimung (Abb. 17). Sie stellen daher den geeignetsten Parameter dar, anhand von Produktprüfungen auf eventuelle Unregelmäßigkeiten bei der Prozessführung zu schließen.



C1, C2: Endlager ohne, mit Austausch. 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert hervorgehoben.

Abbildung 11: Fäkalcoliforme, Endlagerversuche

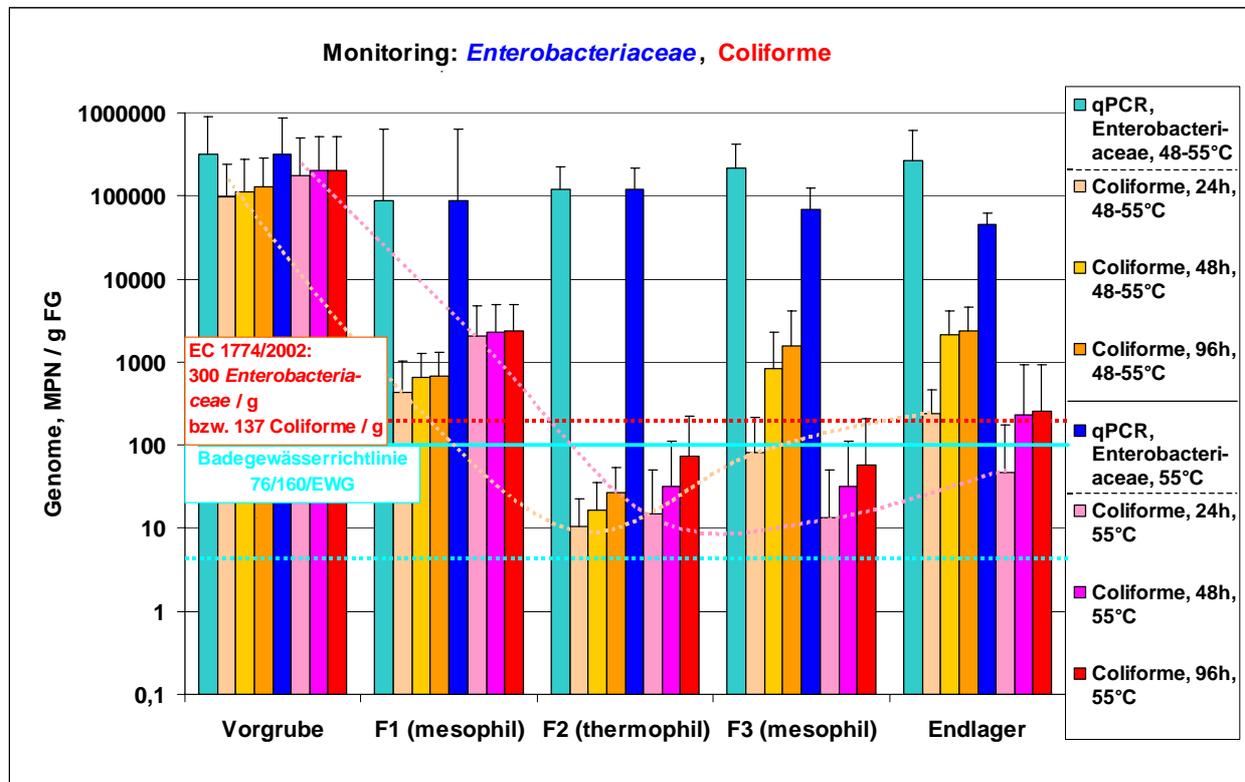
### 3.1.1.5 Diskussion: Fäkalcoliforme und *E. coli*

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Dokumentation einer Hygienisierung wegen der möglichen Unterschätzung der Hygienisierungsleistung nicht über Quantifizierung der DNA erfolgen kann, sondern über (selektive) Kultivierung vorgenommen werden sollte. Eine Wiederverkeimung Fäkalcoliformer wird offenbar bei konsequentem Einhalten der 55°C-Marke so gut wie völlig unterbunden. Die Vor- oder Nachschaltung mesophiler Stufen ist offenbar zum Erreichen der durch die Fermenterkette erzielten Hygienisierungsleistung unnötig. Die relativ kurze Bebrütung in Fluorocult® sowie die Sensitivität Fäkalcoliformer und ihre schnelle Rückverkeimung empfehlen diesen Parameter zur Überwachung eines stabilen Betriebs von Biogasanlagen, mit dieser Methode werden aber pathogene *E. coli* (z.B. O157:H7), die in Tier-Faeces relevant sein können, nicht erfasst. Allerdings beschreibt HOFERER (2001) D-Werte bei 55°C für EHEC im Bereich 1,8 - 4,8 min, die wesentlich geringer als die von intestinalen Enterokokken sind (s. 2.3.2.2) und damit bei der Hygienisierung bei weitem von diesen abgedeckt sind. EHEC/STEC unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit auch nicht wesentlich von *E. coli* (GODFREE and FARRELL, 2005).

In Verbindung mit den im Folgenden dargestellten Ergebnissen zu den anderen Parametern ist eine stabile Betriebstemperatur von 55°C eine wichtige Maßnahme, eine starke Hygienisierungseffizienz für einen Einsatz des Gärrests in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten wie der Wasserschutzzone II einzustellen. Die offenbar nach Stresseinflüssen verstärkte ABNC-Bildung (in den Fermentern, im Endlager) sollte weiter untersucht werden.

### 3.1.2 Coliforme (Keimzahlen) und *Enterobacteriaceae* (DNA)

Die Bestimmung der Coliformen-Keimzahlen erfolgte über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. 2.3.2.1), die Bestimmung der *Enterobacteriaceae*-DNA-Kopien über Standard-Spiking qPCR (s. 2.3.3.2.3). Abb. 12 zeigt die Monitoring-Ergebnisse für die Coliformen (MPN) und die Anzahl *Enterobacteriaceae*-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Pilotanlage.

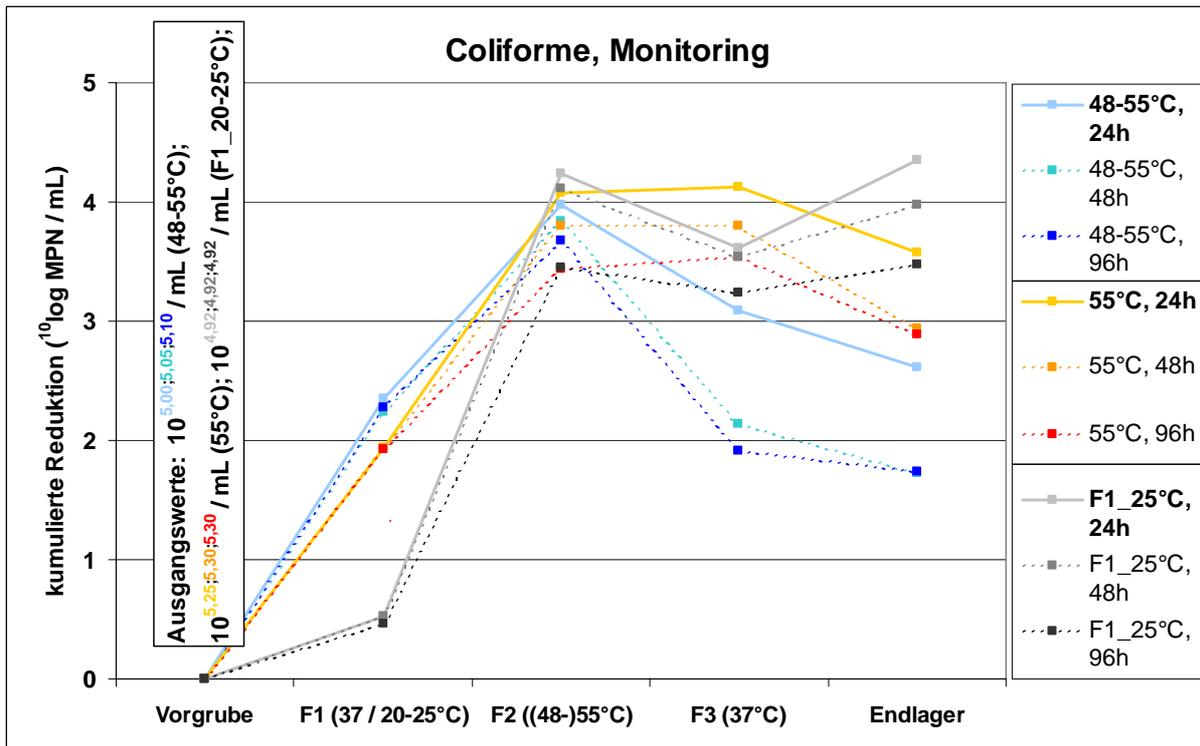


24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004, 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Richtlinien skizziert.

Abbildung 12: *Enterobacteriaceae* (Genome) und Coliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring

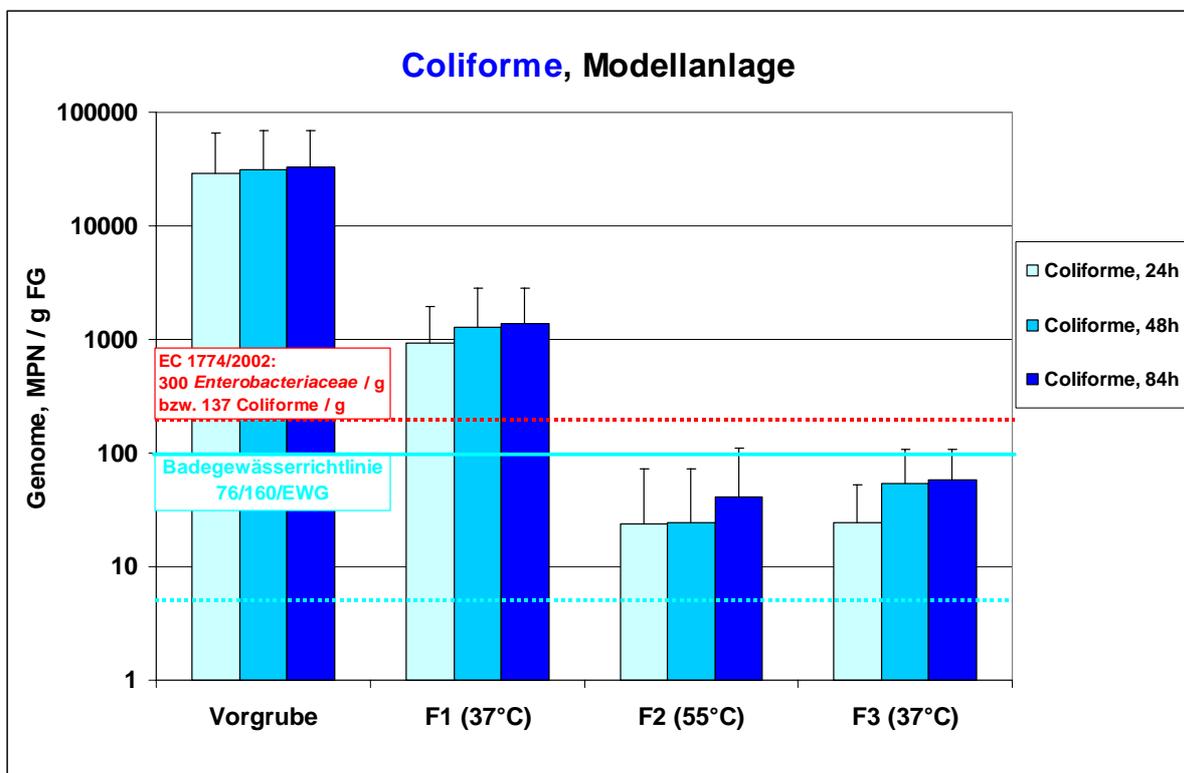
Im Gegensatz zur hervorragenden Übereinstimmung der Gehalte für *E. coli* (qPCR) und Fäkalcoliforme (Fluorocult®) (Abb. 5) in Frischgülle wurden im Mittel 2,18 mal mehr *Enterobacteriaceae* als Coliforme in der Vorgrube gemessen (Abb. 12). Da in der äquilibrierten Frischgülle praktisch keine abgestorbenen Fäkalcoliforme vorhanden waren (s. 3.1.1.1), sollten die über qPCR bestimmten  $3,23 \times 10^5$  Genome *Enterobacteriaceae* in etwa  $1,48 \times 10^5$  MPN Coliformen entsprechen. Vorausgesetzt, dass das Colilert®-Verfahren spezifisch *Enterobacteriaceae* erfasst, würde der Grenzwert von 300 *Enterobacteriaceae* / g in der VERORDNUNG (EG) NR. 1774/2002 für Fermentationsrückstände aus nicht für den menschlichen Verzehr bestimmten tierischen Nebenprodukten etwa 137 MPN über das Fluorocult® bestimmten Coliformen entsprechen. Abb. 12 zeigt, dass diese sowie die schärfere Marke von 100 KBE Coliformen / mL in der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG bei stabilen 55°C im thermophilen F2 für Gärrest nach Durchgang durch den F2, den F3 sowie aus dem Endlagermaterial immer unterschritten wurde (bei solchen Vergleichen sind immer nur die Werte für die konventionelle 24 h Bebrütung zu berücksichtigen!). Bei 48 – 55°C im F2 entstand dagegen bereits im F3 Wiederverkeimung durch Coliforme (Abb. 12, Abb. 13). Die mesophile oder psychrophile Vergärung im F1 allein kann mit einer Reduktion

von etwa 2 bzw. 0,5 log-Stufen (Abb. 13) nicht als ausreichende Behandlung angesehen werden.



48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. 2.1.1.1); 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 13: Coliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage



24h, 48h und 84h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 14: Coliforme, Modellanlage, Monitoring



Ähnlich wie für die Anzahl der *E. coli*-Genome beobachtet (s. 3.1.1.1, 3.1.1.2), nahmen die *Enterobacteriaceae*-Genome während der Vergärung nur unwesentlich ab (Abb. 12). Dies unterstreicht, dass Lebendkeimzahlen nach lethalen Stresseinflüssen durch qPCR mit DNA als Zielmolekül stark überschätzt werden können (s. 3.1.1.1, 3.1.1.5).

Ähnlich wie für die Fäkalcoliformen beobachtet (vgl. 3.1.1.1, 3.1.1.2), war auch für die Coliformen der Betrag der erhöhten MPN bei 96 h gegenüber 24 h Bebrütung in Fluorocult® nach der thermophilen Vergärung größer (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 15, Abb. 16), was auf ABNC-Bildung coliformer Keime unklaren Betrags und auf Stressmetabolismus (s. 3.1.1.1) hinweist. Eine Wiederverkeimung Coliformer im Endlager war insbesondere bei suboptimalem Temperaturmanagement erkennbar, betrug etwa 1,5 - 2 log-Stufen und setzte dort teilweise bereits im mesophilen F3 ein (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 15, Abb. 16). Hier könnten wegen ihrer Thermotoleranz z.B. zu *Citrobacter*, *Enterobacter* oder *Klebsiella* zählende Species aber auch *E. coli* eine Rolle spielen (ALONSO et al., 1999).

Der jahreszeitliche Gang für die Gruppe *Enterobacteriaceae* / Coliforme in der Vorgrube war sehr ähnlich wie der Gang für *E. coli* / Fäkalcoliforme (s. Abb. 7, 3.1.1.1). Die Mittelwerte (in MPN / mL) betragen  $5,22 \times 10^5$  für die Herbst-,  $3,20 \times 10^5$  für die Sommer-,  $2,54 \times 10^5$  für die Frühjahrs- und  $1,64 \times 10^5$  für die Winterproben. Keiner der Unterschiede war im Bonferroni- oder LSD-ANOVA-Post-Hoc-Test (s. 3.1.1.1) auf Niveau  $p = 0,05$  signifikant. Die Ähnlichkeiten im Verhalten beider Gruppen ist nicht erstaunlich, da *E. coli* / Fäkalcoliforme mit im Mittel  $9,75 \times 10^4$  MPN / mL etwa 30 % der *Enterobacteriaceae* ( $3,23 \times 10^5$  MPN / mL) bzw. 66 % der Coliformen ( $1,48 \times 10^5$  MPN / mL) in der Vorgrube ausmachten.

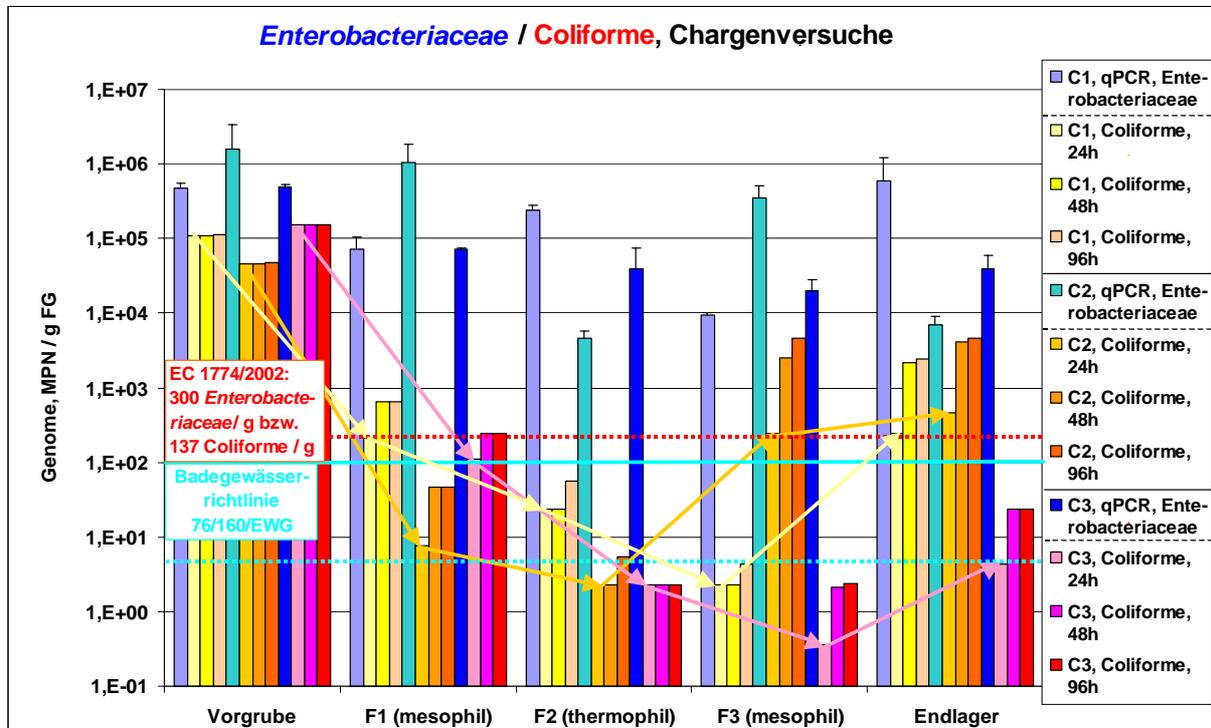
In der Modellanlage verlief die Reduktion der Coliformen (Abb. 14) qualitativ und quantitativ nahezu identisch mit der Reduktion Coliformer in der Berblinger Pilotanlage (Abb. 12). Die Keimreduktion zwischen Vorgrube Auslauf von F2 und F3 fiel für die Modellanlage mit etwa 3 log-Stufen etwas geringer (ca. 0,5 log-Stufen) aus als für die Pilotanlage (Abb. 13). Das gleiche Bild bot sich für die Fäkalcoliformen (s. 3.1.1.2). Die etwas geringere erzielte Reduktion ist auf die im Ansatz Modellanlage (für die Coliformen im Mittel etwa 4-fach) geringere Eingangskonzentration im Vorlagebehälter zurückzuführen (vgl. 3.1.1.2, 3.1.3). Dies bestätigt die Vermutung, dass Ergebnisse bzgl Keimreduktion aus der Modellanlage auf die Pilotanlage übertragbar sind. Up- bzw. Downscaling-Effekte spielen offenbar für die Keimreduktion zumindest im überprüften Bereich keine Rolle.

Die Ergebnisse für Coliforme und *Enterobacteriaceae* aus den Chargenversuchen (Abb. 15, Abb. 16) waren im Wesentlichen denen aus dem Monitoring (Abb. 12, Abb. 13) sehr ähnlich. Auch hier überschritten die Coliformen in den Chargen C1 und C2, die unter suboptimalem Temperaturmanagement im thermophilen Fermenter F2 (48 - 55°C) verlaufen waren, im Endlager die Marken von 137 Coliformen / g FG sowie die 100 MPN / mL der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG, in Charge C2 war das sogar bereits für den Ausfluss aus dem mesophilen Fermenter F3 der Fall (Abb. 15). Bei gesicherten 55°C im F2 lagen ab dem F2 alle Werte immer unter diesen Marken.

Auch in den Chargenversuchen wurde keine wesentliche Reduktion der *Enterobacteriaceae*-DNA erhalten (Abb. 15), was gegen die Eignung des auf Detektion von DNA basierenden qPCR-Ansatzes zur Evaluierung von Hygienisierung spricht. Ein RTqPCR-Ansatz mit Quantifizierung von mRNA-Bildung (GARCÉS et al., 2005) könnte hier zielführender sein.

In den Chargenversuchen wurde ebenfalls die höhere MPN-Ausbeute Coliformer bei 96 h gegenüber kürzerer Bebrütung in Fluorocult® in den Fermentern beobachtet, was für ABNC-Bildung unklaren Ausmaßes spricht. Zur Lösung der Problematik könnte ebenfalls ein RTqPCR-Ansatz hilfreich sein, da über RTqPCR Transkription bestimmter Zielgene und

damit Aktivierbarkeit der Zielorganismen geprüft und quantifiziert werden kann. Bei sublethal geschädigten bzw. ABNC-Zellen ist die Fähigkeit zur Transkription noch gegeben, während ABNC-Zellen sich wegen der hemmenden Zusatzstoffe im Medium nicht oder nur sehr schwer vermehren können und oft eine Resuszitierungsphase vor der selektiven Kultivierung benötigen (LLEÒ et al., 2001).

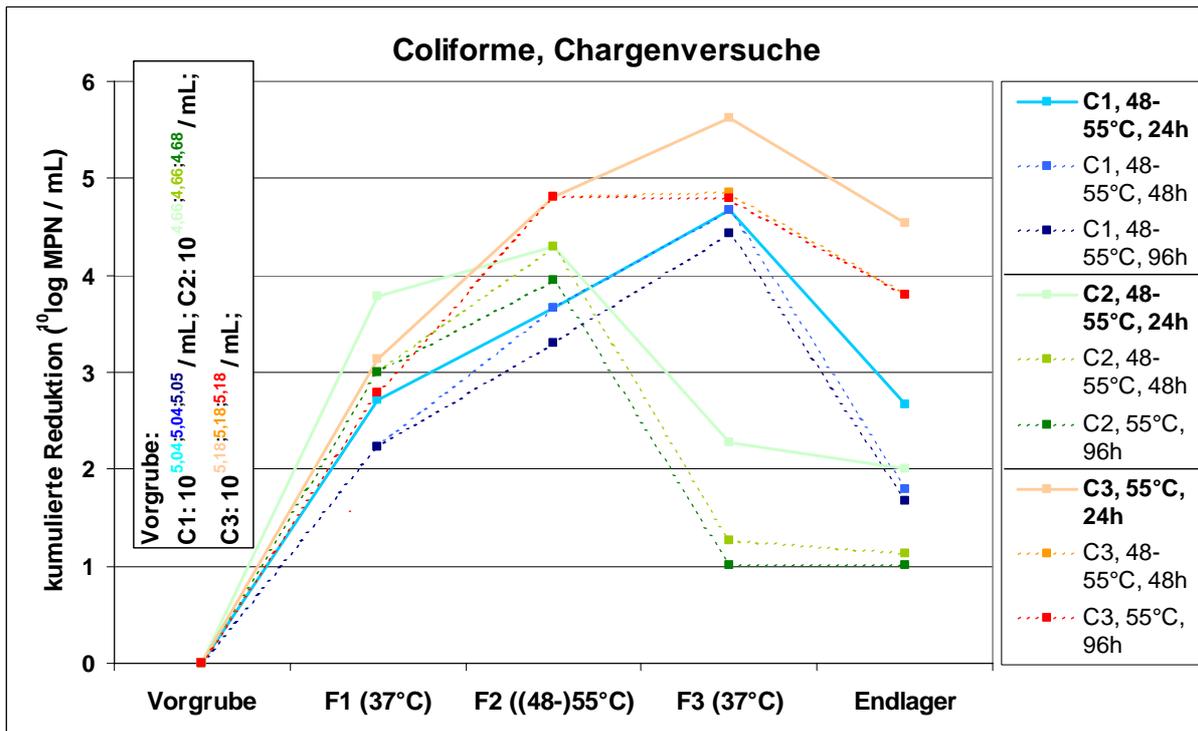


C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3 (s. Text); 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe über Pfeile hervorgehoben und relevante Richtlinien skizziert.

Abbildung 15: Chargenversuche zu *Enterobacteriaceae* (DNA) und Coliformen, Pilotanlage Berbling

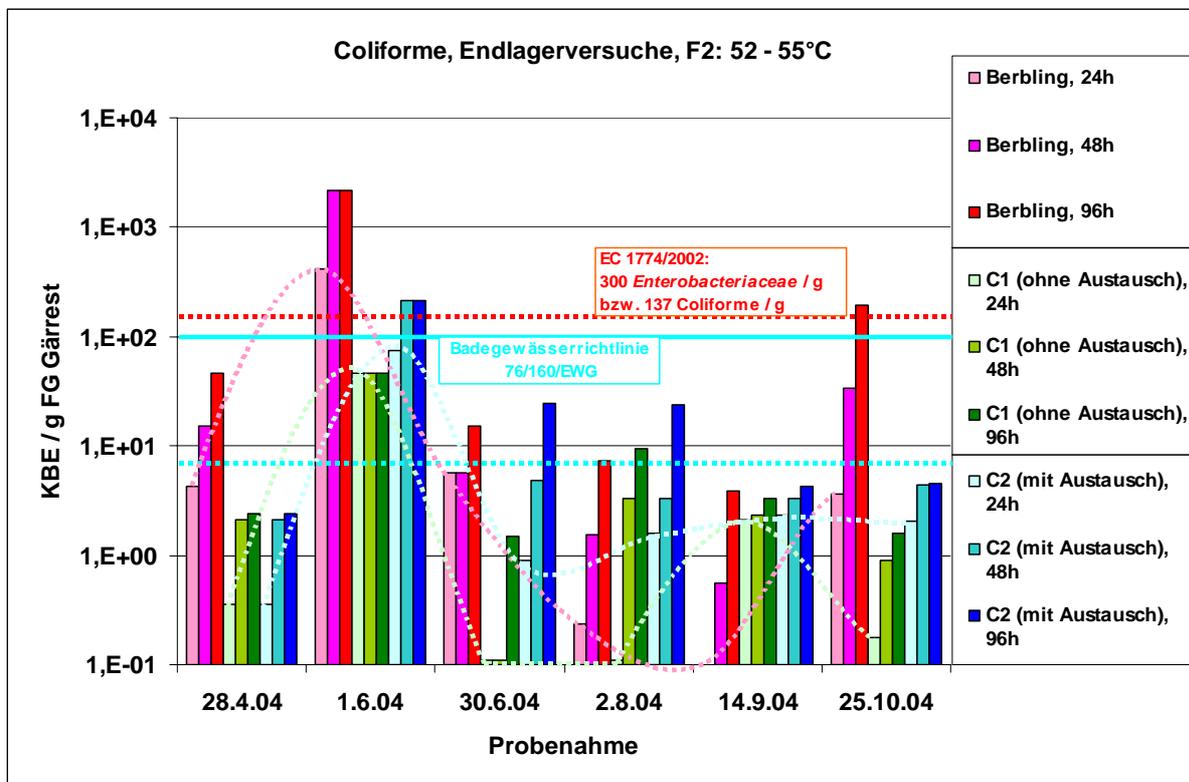
ZETHNER et al. (2002) schlagen als Grenzwert für hygienisch unbedenklichen Gärrest u.a.  $5 \times 10^3$  KBE Enterobakterien / g vor. Der analoge Coliformen-Wert wurde in der Biogasanlage Berbling zumeist bereits nach der ersten mesophilen Stufe F1 und in allen Fällen nach dem thermophilen Fermenter F2 unterschritten. Der Gärrest entsprach nach der thermophilen Behandlung bei gesicherten  $55^\circ\text{C}$  und gesicherter 8 - 9 h Verweilzeit (Tab. 1) sogar den Kriterien der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG (Abb. 12, Abb. 14, Abb. 15). Nach dieser  $55^\circ\text{C}$  Behandlung wurde in allen Fällen eine Reduktion coliformer Keime um 3,5 – 4,5 log-Stufen (24 h Bebrütung in Fluorocult® erzielt, dabei schien die vorgeschaltete mesophile Phase zum Erreichen dieser Qualität ähnlich wie die nachgeschaltete mesophile Phase untergeordnete Bedeutung zu haben (Abb. 13, Abb. 16). Die Rückverkeimung im Endlager betrug bei gesicherten  $55^\circ\text{C}$  und gesicherter 8 - 9 h Verweilzeit im F2 maximal eine log-Stufe (24 h Bebrütung, Abb. 13, Abb. 16).

Ein eindeutiger, die 3 Varianten des Modell-Endlagerversuchs (Berblinger Endlager; C1: Modell-Endlager ohne Austausch; C2: Modell-Endlager mit Austausch; s. 2.1.1.3) differenzierender Trend war auch für die Coliformen nicht zu erkennen (Abb. 17). Allerdings betrug hier die Rückverkeimung (auch im Endlager ohne Austausch, C1) transient bis zu 2 log-Stufen und ging dann wieder zurück. Die Werte lagen dabei in allen Fällen unterhalb des imperativen Werts der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG (Abb. 17).



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004; 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 16: Coliforme in den Chargenversuchen, kumulierte Reduktion in der Berblinger Pilotanlage



C1, C2: Endlager ohne, mit Austausch. 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert hervorgehoben.

Abbildung 17: Coliforme, Endlagerversuche



Offenbar können (thermophile/-tolerante) Coliforme besonders intensiv mit Rückverkeimung reagieren, was sie als geeigneten Parameter zur Überprüfung der Hygienisierungseffizienz im Produkt erscheinen lässt (s. 3.1.1.4). Anhand der vorliegenden Daten aus den Endlagerversuchen und den anderen untersuchten Parametern (vgl. 3.1.1.4) kann z.Zt. ausgeschlossen werden, dass sich im Endlager nach thermophiler anaerober Vergärung (gesichert 55°C, gesicherte Verweilzeit 8 - 9 h) eine mikrobielle Population Besorgnis erregender Höhe oder Zusammensetzung aufbaut, wenn eine Kontamination von außen (Schwarz-Weiss-Trennung insbesondere nach der thermophilen Stufe) ausgeschlossen ist.

Aus den Ergebnissen kann man schließen, dass das thermophile Verfahren, ähnlich wie für die Fäkalcoliformen beschrieben (s. 3.1.1.5), auch bezüglich der Coliformen geeignet ist, einen sehr guten hygienischen Zustand des Gärrests zu produzieren.

### 3.1.3 Intestinale Enterokokken, Gesamt-Enterokokken, *Enterococcus faecalis* und *E. faecium*

Intestinale (fäkale) und Gesamt-Enterokokken wurden über Membranfiltration und selektive Kultivierung nach ISO / DIS 7899-2 bestimmt (s. 2.3.2.2), *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* über qPCR (s. 2.3.3.2.3). Abb. 18 und 17 zeigen die Monitoring-Ergebnisse und Abb. 20 und 19 die Ergebnisse aus den Chargenversuchen für die KBE der gesamt- und intestinalen Enterokokken sowie die Anzahl *E. faecalis* und *E. faecium*-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Pilotanlage.

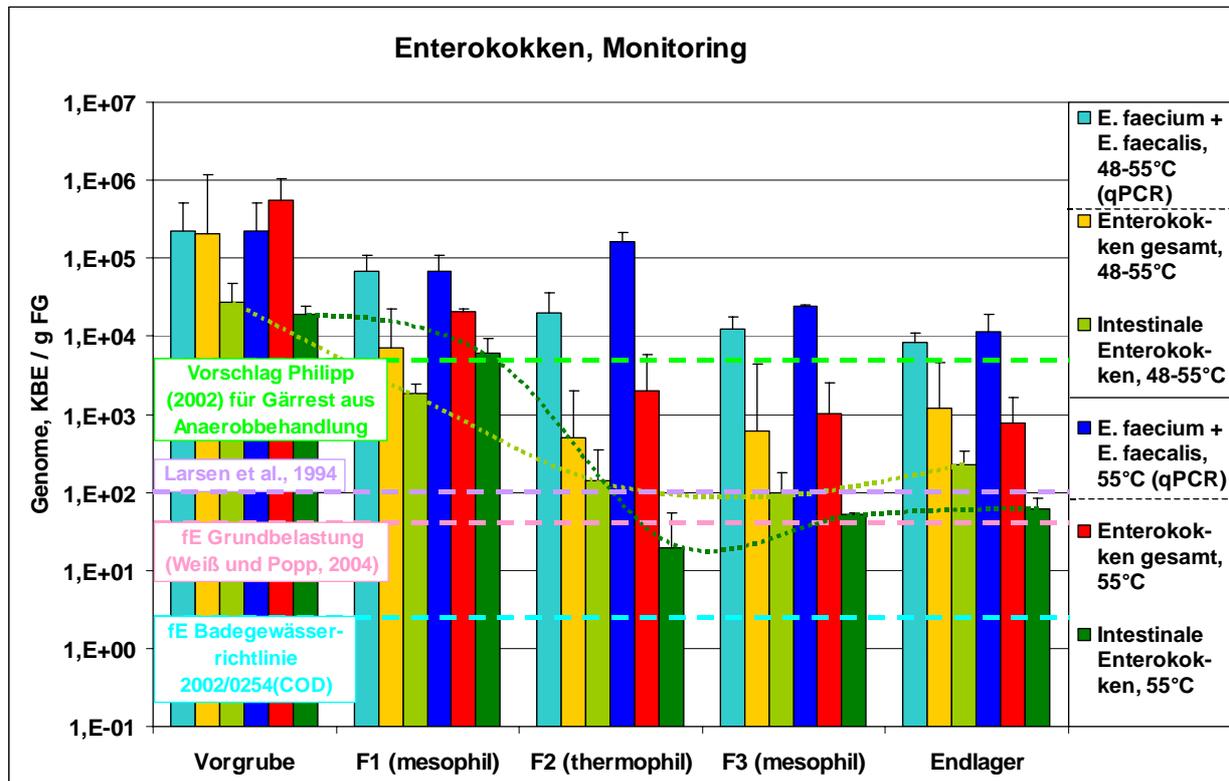
Es ist vorauszuschicken, dass die Werte für die Gesamt-Enterokokken äusserst vorsichtig interpretiert werden müssen, da sich teilweise auf den Filtern über m-Enterokokken-Agar eine flächige rosa Färbung einstellte, für die nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnte, ob es sich um bakterielle (pin-point) Mikrokolonien handelte. Die entsprechenden Werte können daher überschätzt sein, und die Schätzung der Koloniezahlen für die entsprechenden Flächen ist sicher subjektiv. Zudem beinhalten 'Gesamt-Enterokokken' eine Reihe von in Umweltproben vorkommenden Spezies ohne oder zumindest mit wesentlich geringerer Hygiene-Relevanz als die intestinalen Enterokokken ('Fäkalstreptokokken'), bei denen bisher besonders *E. faecalis* und *E. faecium* als potentiell pathogen für Menschen beschrieben sind (MUNDY et al., 2000). Der Parameter Gesamt-Enterokokken kann daher nicht für eine mikrobiologische Evaluierung des hygienischen Status des Gärrests empfohlen werden und wird auch im Weiteren nicht berücksichtigt.

Anhand der Schwarzfärbung des Äskulin-Galle-Agars waren intestinale Enterokokken dagegen methodisch gut zu bestimmen. Es handelte sich meist um größere (ca. 0,5 - 1 mm) dunkel-braunrote Kolonien, seltener waren auch blassrosa (ca. 0,5 - 1 mm) Kolonien und sehr selten kleine (ca. 0,1 mm) rote Kolonien verantwortlich. Die Überprüfung zufällig ausgewählter Kolonien für intestinale Enterokokken ergab im qPCR-Test auf *E. faecalis* oder *E. faecium* immer positive Ergebnisse (nicht dargestellt). Der Parameter intestinale Enterokokken ist damit vom Methodischen her für eine mikrobiologische Evaluierung des hygienischen Status des Gärrests gut geeignet.

In den Proben aus der Berblinger Vorgrube lagen die intestinalen Enterokokken im Mittel im Bereich  $1,9 \times 10^4$  bis  $1,1 \times 10^5$  / g FG und damit im unteren Bereich der entsprechenden Ergebnisse von  $7,5 \times 10^3$  -  $3,8 \times 10^6$  Fäkalstreptokokken / mL (FINK et al., 1997) und  $2,3 \times 10^3$  -  $4,3 \times 10^6$  Fäkalstreptokokken / g (MEYER et al., 1999) und mehr als 1 log-Stufe niedriger als die bei GELDREICH (1978) beschriebenen  $1,3 \times 10^6$  KBE Fäkalstreptokokken / g Rinder-Faeces. Die Summe der qPCR-Werte für *E. faecalis* und *E. faecium* lag in den Proben der Vorgrube (äquilibrierte Verhältnisse, kaum abgestorbene Zellen, s. 3.1.1.1) im Mittel etwa 5 mal so hoch wie die KBE-Werte für intestinale Enterokokken (Abb. 18, Abb. 20). Es wurden



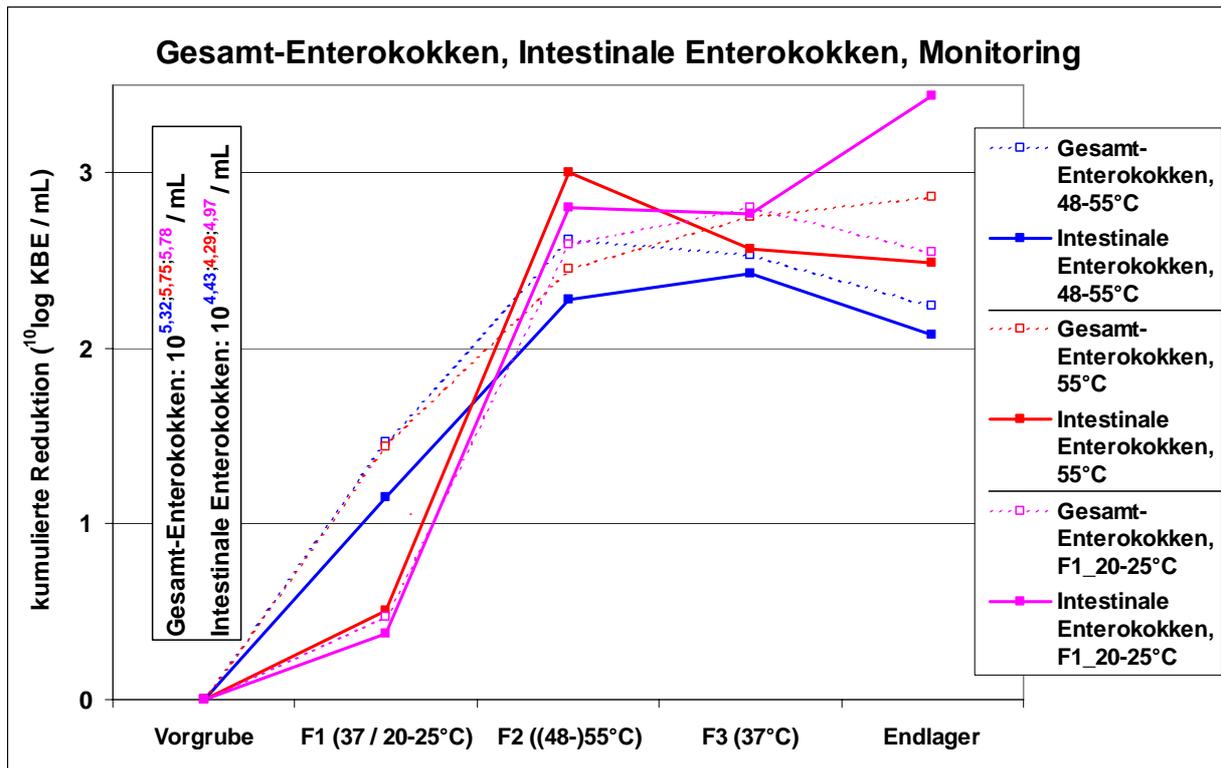
eher höhere KBE-Werte für intestinale Enterokokken erwartet, da hier neben *E. faecalis* und *E. faecium* auch *E. hirae* miterfasst werden sollte, der bei Rindern neben *E. faecium* als dominant beschrieben wurde (KÜHN et al., 2003) aber nicht in den qPCRs für *E. faecalis* und *E. faecium* reagierte. Dies weist auf eine Unterbestimmung (Faktor  $\geq 5$ ) intestinaler Enterokokken durch die Membranfiltrationsmethode ISO / DIS 7899-2 hin. Ob die nicht erfassten intestinalen Enterokokken aus den Vorgruben-Proben als ABNC (LLEÒ et al., 2001) vorgelegen haben, oder ob andere Gründe (z.B. behinderte Nährstoff-Diffusion durch die Filter) verantwortlich waren, muss Gegenstand weiterer Forschung sein.



48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Vorschläge, Richtlinien und Belastungsniveaus skizziert.

Abbildung 18: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* (qPCR), Pilotanlage Berbling, Monitoring

Nach Durchgang durch den thermophilen Fermenter F2 bei gesicherten 55°C lagen die Werte für intestinale Enterokokken immer unter der Marke von  $1 \times 10^2$  (intestinalen) Enterokokken / mL (LARSEN et al., 1994) und damit um mehr als eine Zehnerpotenz unter dem Vorschlag von PHILIPP (2002) mit  $5 \times 10^3$  Fäkalstreptokokken / g für Gärrest aus Anaerobbehandlung (Abb. 18, Abb. 20). Eine Reduktion auf die Grundbelastung in Sickerwässern ungedüngter Ackerflächen von etwa 35 KBE 'fäkale Streptokokken' / mL (WEIß und POPP, 2004) wurde nur direkt nach dem F2 nach gesicherten 55°C erreicht, danach lagen die Gehalte geringfügig darüber. Bis auf die 2 Darmenterokokken / mL der Badegewässerrichtlinie 2002/0254 (COD) gingen die Werte allerdings niemals zurück (Abb. 18, Abb. 20). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus stabilem Betrieb bei 55°C im F2 wurden bei suboptimalem Temperaturmanagement des F2 (48 - 55°C) 200 intestinale Enterokokken / g FG zumeist überschritten, in einem Fall wurden auch 500 intestinalen Enterokokken / g FG erreicht. Im mesophil betriebenen Fermenter F1 wurde in Einzelfällen auch die o.g. Marke von  $5 \times 10^3$  intestinalen Enterokokken / g FG überschritten (Abb. 18, Abb. 20).



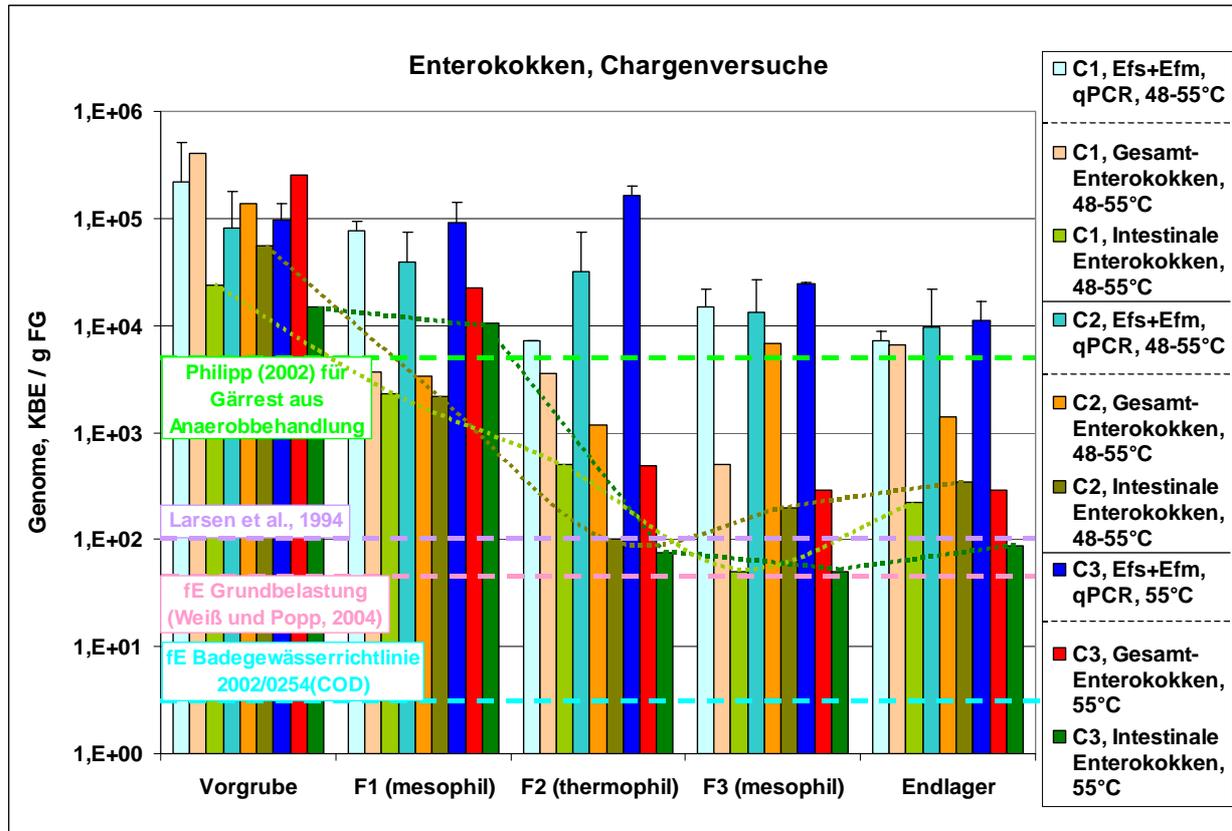
48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. 2.1.1.1).

Abbildung 19: Gesamt- und intestinale Enterokokken im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage

Die Reduktion der intestinalen Enterokokken durch den mesophilen Fermenter F1 war mit 0,15 - 2,05 log-Stufen relativ gering. Nach Durchgang durch den thermophilen Fermenter F2 lag die Reduktion bei gesicherten 55°C im Bereich 2,5 - 3,3 log-Stufen (Abb. 19, 21) und damit meist unterhalb der von LARSEN et al. (1994) als ausreichend eingestufte Reduktion (intestinaler) Enterokokken um 3 - 4 log-Stufen. Bei psychrophilem Betrieb des F1 (Intestinale Enterokokken, F1\_20-25°C in Abb. 19), der kaum Reduktion intestinaler Enterokokken bewirkte, ergab sich durch den thermophilen F2 eine Reduktion der intestinalen Enterokokken um 2,39 log-Stufen. HOFERER (2001) beschreibt für *E. faecium* DSM 2146<sup>T</sup> einen D-Wert (T<sub>90</sub>-Wert) bei 55°C in Rindergülle von 1,70 h. Rechnerisch ergibt letztere Angabe, dass zu einer Reduktion um 2,39 log-Stufen nur 4,06 h bei 55°C in Rindergülle nötig sein sollten. Bereits bei der minimal gesicherten Verweilzeit von 8 - 9 h im F2 (Tab. 1) hätte sich nach dem D-Wert von HOFERER (2001) rein rechnerisch durch den F2 der Berblinger Pilotanlage bei den intestinalen Enterokokken eine Reduktion um 5 log-Stufen zeigen sollen.

Eine Diskrepanz besteht allerdings nur vordergründig. Sensitivitätsunterschiede zwischen dem dotierten Laborstamm und den nativen Enterokokken bestehen wohl nicht (HOFERER, 2001), und die errechnete freie NH<sub>3</sub>-Konzentration entsprach mit im Mittel 600 mg / L im F2 (EFFENBERGER et al., 2006) in etwa den Angaben (582 mg / L) von HOFERER (2001) für die Vergärung von Rindergülle bei 55°C. Vielmehr lassen sich in der Inaktivierungskinetik sowohl von *E. faecium* (HOFERER, 2001) als auch von nativen intestinalen Enterokokken (O'REILLY and COLLERAN, 2004) zwei verschiedene Phasen beobachten, initial ein schnelles Absterben, für das HOFERER (2001) den D-Wert von 1,70 berechnete, und anschließend ein Stagnations-Plateau auf niedrigem Niveau, das bei HOFERER (2001) wie in den eigenen Ergebnissen im Bereich 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> KBE / mL lag und offenbar nur mit härteren Maßnahmen wie Pasteurisierung (O'REILLY and COLLERAN, 2004) unterschritten werden kann. Ein

solches 'Tailing' beschreiben auch UGWUANYI et al. (1999) u.a. für *Enterococcus faecalis* und führen es u.a auf die Präsenz besonders thermotoleranter Subpopulationen zurück.



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3 (s. Text); Efs+Efm: *Enterococcus faecalis* + *E. faecium*. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Richtlinien skizziert.

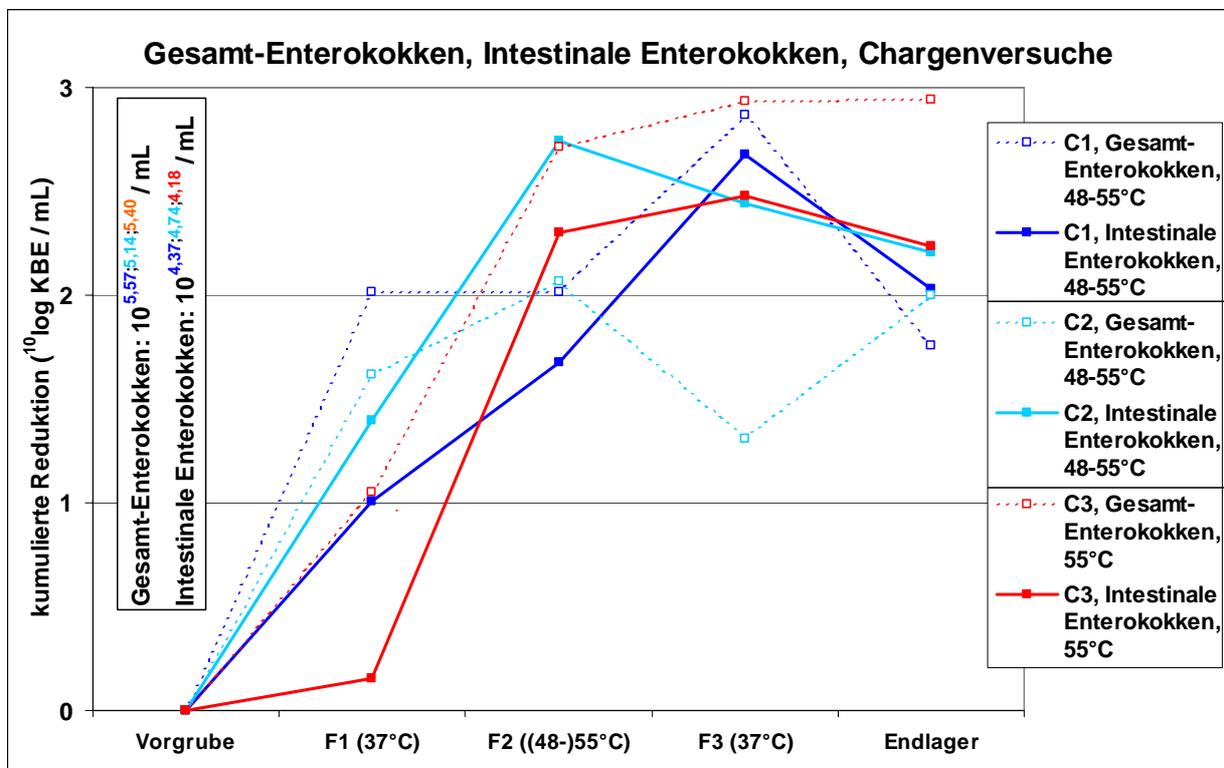
Abbildung 20: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* (qPCR), Pilotanlage Berbling, Chargenversuche

Da die intestinalen Enterokokken im F1 nur  $10^{4,53}$  KBE / g FG betragen (Intestinale Enterokokken, F1 20-25°C in Abb. 19), konnten diese bestenfalls auch nur um 2,8 log-Stufen auf das Niveau  $10^{1,7}$  KBE / g FG reduziert werden. Dies spricht für eine sehr gute und den Angaben von HOFERER (2001) entsprechende Hygienisierungsleistung des thermophilen Berblinger F2. Im Berblinger F2 war das Basal-Plateau von etwa  $10^{1,7}$  KBE / g FG wahrscheinlich bereits nach einer Verweilzeit von etwa 4 h (s. oben) erreicht und änderte sich beim weiteren Durchgang nicht mehr. Demnach würden wahrscheinlich im Berblinger F2 in der vermuteten Verweilzeit der Hauptfraktion von 48 h (Tab. 1) auch wesentlich höhere Eingangs-Gehalte an intestinalen Enterokokken auf das Niveau von etwa  $10^{1,7}$  KBE / g FG reduziert werden, was einen wesentlich höheren Betrag abgetöteter Zellen ergäbe als die beobachtete Differenz von etwa 3 log-Stufen. Dementsprechend erreichten O'REILLY und COLLERAN (2004) bei 55°C in  $\leq 24$  h sowie HOFERER (2001) nach 12 h eine Reduktion intestinaler Enterokokken in Rindergülle um etwa 7 log-Stufen.

Ähnlich wie für *E. coli*- und *Enterobacteriaceae*-DNA beobachtet (s. 3.1.1, 3.1.2), nahm die Anzahl der DNA-Kopien von *E. faecalis* und *E. faecium* im Vergleich zu den KBE von intestinalen Enterokokken bis zum Endlager nur unwesentlich ab (Abb. 18, 20). Dies unterstreicht, dass über qPCR mit DNA als Zielmolekül nach lethalem Stress lebende Zellen massiv überschätzt werden. Die Methode eignet sich daher zwar hervorragend für äquilibrierte aber nicht für (partiell) lethal gestörte Systeme.



Zwischen den Ergebnissen vom Monitoring (Abb. 18, Abb. 19) und den Chargenversuchen (Abb. 20, Abb. 21) ergaben sich für die intestinalen Enterokokken keine nennenswerten Unterschiede. Im Endlager trat bei suboptimalen Temperaturen im F2 (48 – 55°C) immer eine leichte Wiederverkeimung mit intestinalen Enterokokken auf, bei 55°C im F2 war sie mit maximal 0,5 log-Stufen unerheblich oder nicht vorhanden (Abb. 19, Abb. 21). Bei suboptimalen Temperaturen im F2 lagen auch die Keimzahlen der intestinalen Enterokokken im F3 und im Endlager im Mittel und in den Chargenversuchen überwiegend knapp über der Marke von  $10^2$  KBE / mL (LARSEN et al., 1994), während sie bei 55°C im F2 immer knapp unter dieser Marke und im Bereich der Hintergrundbelastung in Dränwässern ungedüngter Ackerflächen lagen (Abb. 18, Abb. 20). Aus den extrapolierten Ergebnissen ergibt sich im Zusammenhang, dass bei einem entsprechend höheren Ausgangsniveau eine Reduktion intestinaler Enterokokken um 5 log-Stufen innerhalb der gesicherten minimalen Verweilzeit von 8 - 9 h erhalten worden wäre. Aus den Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass die Berblinger Fermenterkette, besonders der thermophile F2, bei gesichertem Betrieb bei 55°C geeignet war, auch intestinale Enterokokken ausreichend abzutöten.



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. 2.1.1.1).

Abbildung 21: Gesamt- und intestinale Enterokokken, kumulierte Reduktion in den Chargenversuchen, Berblinger Pilotanlage

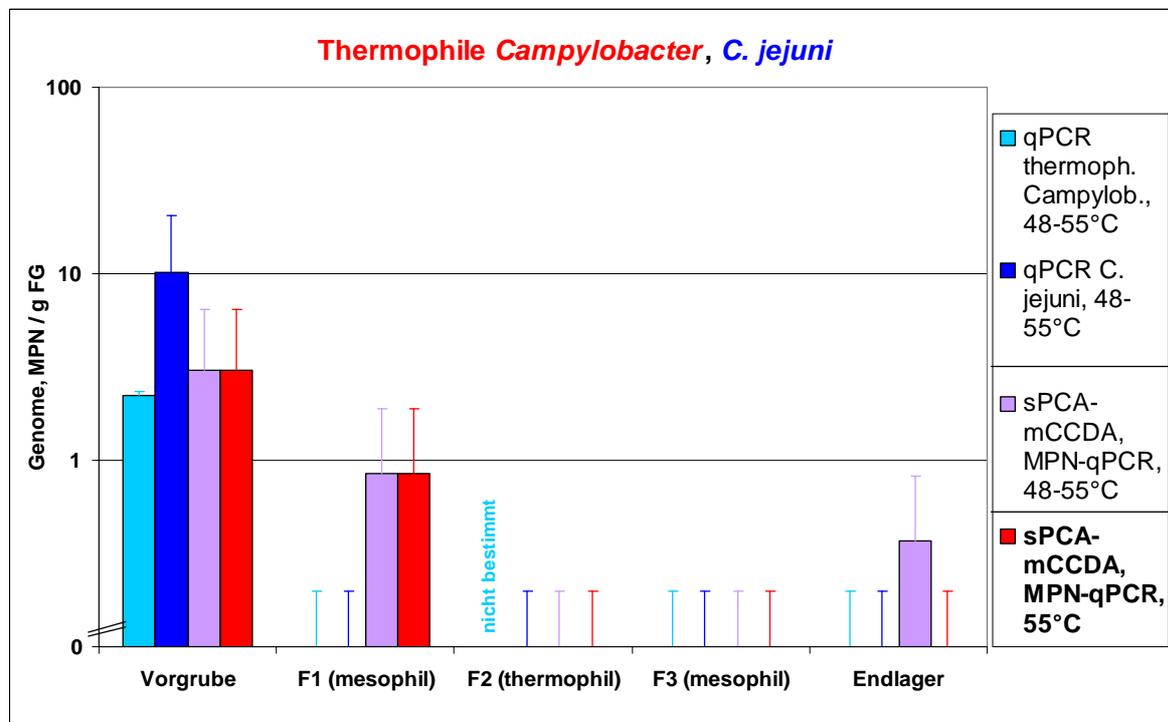
Obwohl die Bestimmung der intestinalen Enterokokken 2 Tage dauert, also viel Zeit vergeht bevor in der Praxis auf eventuell nötige Eingriffe reagiert werden kann, ist der Parameter infolge seiner Robustheit und wegen der Thermotoleranz und Tenazität der intestinalen Enterokokken sehr geeignet, den Hygienisierungserfolg der (thermophilen) anaeroben Vergärung zu dokumentieren. Hervorzuheben ist dabei, dass die Empfindlichkeit veterinärmedizinisch besonders wichtiger Viren, wie die Erreger der klassischen Schweinepest, der Aujeszky'sche Krankheit, der vesikulären Schweinekrankheit, der afrikanischen Schweinepest, der Maul- und Klauenseuche, von Polio- und Rotaviren sowie der meisten enteropathogenen Bakterien (außer Sporenbildner) bei der Vergärung von



Rindergülle bzw. gegenüber 55°C größer ist als die der intestinalen Enterokokken (HOFERER, 2001; PHILIPP, 2002). Auch UGWUANYI et al. (1999) fanden, dass *E. faecalis* bei der thermophilen anaeroben Vergärung von landwirtschaftlichem Abfall bei 55°C und 60°C einen höheren D-Wert als *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* and sogar als die als thermotolerant bekannte *Serratia marcescens* aufwies. Demzufolge wären die genannten Pathogenen in der Berblinger Pilotanlage allein durch die 55°C-Behandlung im F2 (potentiell) um mindestens 5 log-Stufen reduziert worden. Eine Reduktion um mindestens 5 log-Stufen konnte bereits nach 4 h 55°C für infektiöse Kryptosporidien-Oozysten nachgewiesen werden (s. 3.1.8), und auch für die anderen untersuchten Parameter ließ sich aus den vorhandenen Daten eine Reduktion um mindestens diesen Faktor extrapolieren (s. 3.1.4, 3.1.5, 3.1.9, 3.1.10, 3.1.11, 3.1.12). Eine Ausnahme bilden die bakteriellen Sporenbildner, die allerdings im Prozessverlauf auch nicht (nennenswert) zunahm (s. 3.1.6, 3.1.7). Damit stellen die intestinalen Enterokokken einen idealen Indikator für die Hygienisierungseffizienz in Biogasanlagen dar. ERREBO LARSEN and MUNCH (1990) kamen zum gleichen Schluss. LARSEN et al. (1994) schlugen vor, dass eine dokumentierte Reduktion intestinaler Enterokokken um 3 - 4 log-Stufen auf ein Niveau von etwa 10<sup>2</sup> KBE / mL im Gärrest eine uneingeschränkte Verwendung des (entgasten) Gärrests in der Landwirtschaft ermöglichen soll. Ihr Vorschlag gewinnt im Zusammenhang mit den eigenen Befunden (s. oben, s. Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21) erneut Bedeutung.

### 3.1.4 Thermophile *Campylobacter*

Analysen über qPCR-Bestimmung mit direkter Nukleinsäure-Extraktion aus dem Probenmaterial (s. 2.3.3.2.3) wiesen auf eine sehr geringe Konzentration thermophiler *Campylobacter*-Arten im Vorgruben-Material hin. In den Fermentern und im Endlager konnte mit diesem Ansatz keine thermophiler *Campylobacter* nachgewiesen werden (Abb. 22).



sPCA: selektives Preston *Campylobacter* Anreicherungsmedium; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1)

Abbildung 22: Thermophile *Campylobacter* und *C. jejuni*, Monitoring, Pilotanlage Berbling



Da die qPCR-Bestimmung mit direkter Nukleinsäure-Extraktion aus dem Probenmaterial bei sehr geringen Keimzahlen (bzw. Konzentrationen des Zielmoleküls) aus statistischer Sicht problematisch ist bzw. Extraktions- und Messwiederholungen in kaum praktikablem Umfang erfordert (s. 2.3.3.1), andererseits die direkte Plattierung von Probenmaterial auf mCCDA-Agar wegen Bildung starker Hintergrundmikroflora nicht erfolgreich war, wurde der Plattierung eine MPN-Anreicherung aus seriellen Verdünnungen vorgeschaltet (sPCA, s. 2.3.2.3). Die auf mCCDA erhaltenen Kolonien wurden mittels spezifischer qPCR auf Zugehörigkeit zur Gruppe der thermophilen *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) getestet und aus den positiven und negativen Platten die MPN bestimmt (s. 2.3.3.2.3).

Abb. 22 zeigt, dass eine leichte Reduktion thermophiler *Campylobacter* bereits im mesophilen F1 der Berblinger Pilotanlage stattfand, und im thermophilen F2 sowie im nachgeschalteten mesophilen F3 keine thermophilen *Campylobacter* mehr nachgewiesen werden konnten. Bei suboptimalen Temperaturen im F2 (48 - 55°C) waren thermophile *Campylobacter* im Endlager in nur einer von 5 analysierten Proben in sehr geringer Konzentration vorhanden, während bei gesicherten 55°C auch für die Endlagerproben alle Ergebnisse negativ waren. Dies spricht, ähnlich wie bereits zuvor diskutiert (s. 3.1.1.5, 3.1.2, 3.1.3) dafür, die Vergärung thermophil und bei gesicherten 55°C durchzuführen, wenn der Gärrest in sensiblen Zonen oder Gebieten ausgebracht werden soll.

In der Literatur ist *C. jejuni* eher als wenig thermotolerant beschrieben (USFDA, 2000), besonders wenn landwirtschaftliche Abfälle und Gülle thermophil vergoren werden (UGWUANYI et al., 1999). Es ist nicht zu erwarten, dass die anderen Species des thermophilen *Campylobacter*-Komplexes wegen ihrer sehr ähnlichen Ökologie wesentlich resistenter als *C. jejuni* sind, allerdings wäre ein entsprechender Nachweis wünschenswert. Die D-Werte für *C. jejuni* lagen bei 55°C im Bereich 0,62 - 2,22 min (UGWUANYI et al., 1999; USFDA, 2000) und waren damit um den Faktor 8 - 50 kleiner als die Werte für *E. faecium* bzw. *E. faecalis* (UGWUANYI et al., 1999; HOFERER, 2001). Demzufolge wären thermophile *Campylobacter* in der Berblinger Pilotanlage allein durch die 55°C-Behandlung im F2 (potentiell) um mindestens 5 log-Stufen reduziert worden. Die thermophilen *Campylobacter* sind damit bei der thermophilen Vergärung kein kritischer Parameter und mit dem Indikator intestinale Enterokokken bei Weitem ausreichend abgedeckt.

### 3.1.5 *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* wurde quantitativ über MPN-qPCR nach Voranreicherung Ossmer-Bouillon und Plattierung auf CIN-Agar bestimmt (s. 2.3.2.4) sowie über qPCR nach DNA-Extraktion direkt aus den Proben (s. 2.3.3.2.3).

Mit vorgeschalteter selektive Anreicherung war der qPCR-Test auf *Y. enterocolitica* für die auf CIN-Agar gewachsenen (typischen) Kolonien für keine der analysierten Proben der Berblinger Biogasanlage positiv. Demnach hätten selbst in der Vorgrube weniger als 1 *Y. enterocolitica* pro g FG vorgelegen. Die Ergebnisse aus dem qPCR-Nachweis über direkte DNA-Extraktion aus den Proben wiesen allerdings etwa  $10^2$  *Y. enterocolitica*-Genomen / g FG in der Vorgrube und im mesophilen F1 aus (Abb. 23), allerdings war nur ¼ der Proben aus der Vorgrube qPCR-positiv. Möglicherweise hatten die selektiven Zusätze bei den Kultivierungsschritten das Wachstum von *Y. enterocolitica* gehemmt. Die Gülle oder die Bedingungen in der Vorgrube könnten sublethale Effekte auf *Y. enterocolitica* gehabt haben, und möglicherweise wurden ABNC-Zellen gebildet, die sich nicht in der gegebenen Zeit bzw. unter den gegebenen Bedingungen kultivieren ließen. Wahrscheinlicher entsprachen die in der Vorgrube und im F1 gemessenen DNA-Gehalte abgestorbenen Zellen, da nach Durchgang durch den thermophilen F2 auch über die direkte qPCR keine *Y. enterocolitica*-Genome in

den Kompartimenten der Berblinger Fermenterkette mehr nachweisbar waren (Abb. 23). Die geringen Eingangskonzentrationen von *Y. enterocolitica*-DNA wurden offenbar im F2 abgebaut. Dies spricht dafür, dass die vor dem F2 gemessenen *Y. enterocolitica*-Genome aus abgestorbenen und weitgehend degradierten Zellen gestammt hatte, da DNA nur langsam abgebaut wird (s. 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3).

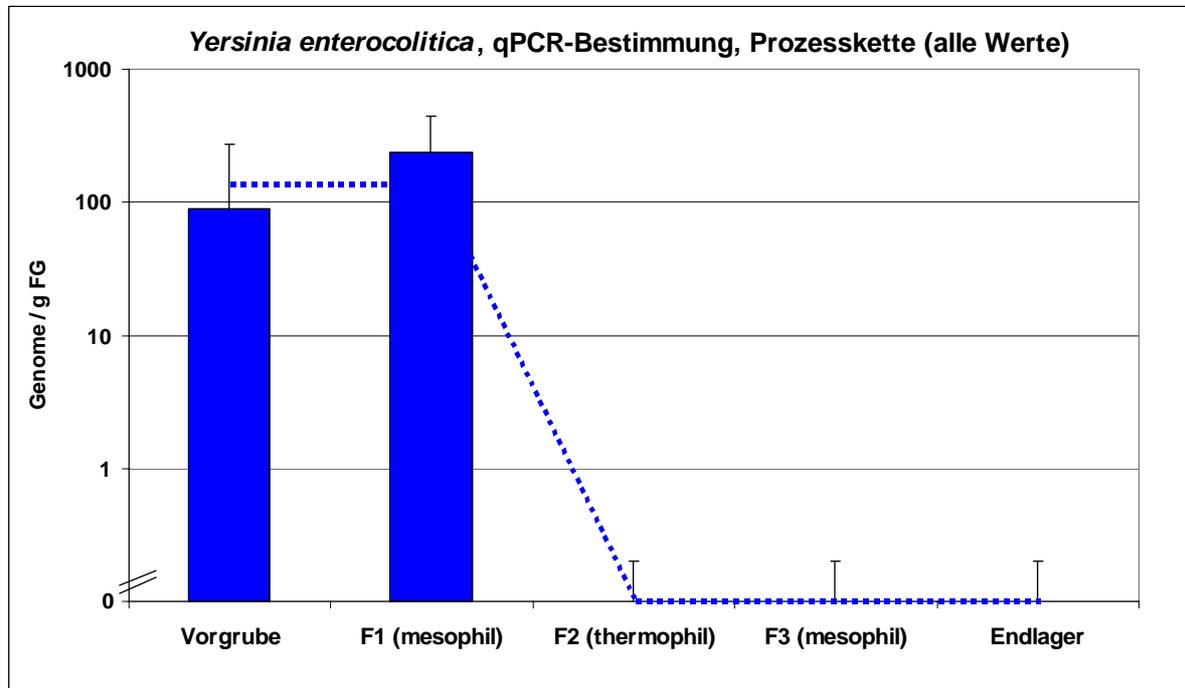


Abbildung 23: *Yersinia enterocolitica*, Monitoring, Pilotanlage Berbling

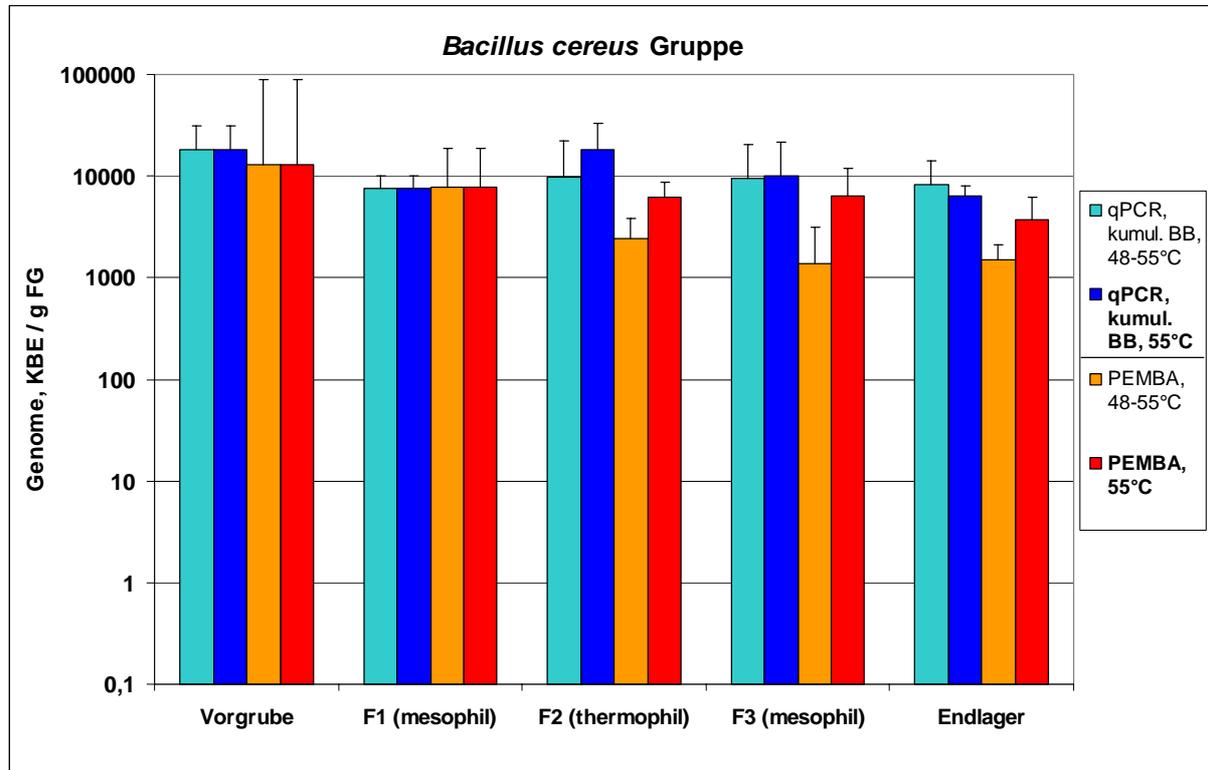
Bezüglich potentiellen hygienischen Gefahren bei Ausbringen des Gärrests ist *Y. enterocolitica* höchstwahrscheinlich ähnlich wie die thermophilen *Campylobacter*-Arten (s. 3.1.4) ein unkritischer Parameter, da die für Inaktivierung von *Y. enterocolitica* bestimmten D-Werte bei 55°C im Bereich 0,03 - 0,05 h liegen (USFDA, 2000; LAKE et al, 2004), und damit um den Faktor 30 bis 50 kleiner sind als die D-Werte für intestinale Enterokokken (UGWUANYI et al., 1999; HOFERER, 2001). Demzufolge wäre *Y. enterocolitica* in der Berblinger Pilotanlage allein durch die 55°C-Behandlung im F2 (potentiell) um mindestens 5 log-Stufen reduziert worden. Die Inaktivierung von *Y. enterocolitica* ist damit bei Weitem ausreichend durch den Parameter intestinale Enterokokken als Indikator abgedeckt.

### 3.1.6 Bacillus cereus-Gruppe

Die Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe (s. 2.3.2.5) können verschiedene Toxingene in unterschiedlichem Ausmaß produzieren. Sie können zur Überdauerung ungünstiger Bedingungen Endosporen bilden und sind in diesem Zustand sehr resistent gegenüber Hitze und anderen Stressfaktoren (BROWN, 2000). Sie wurden direkt aus den Proben der Berblinger Vorgrube, der Fermenterkette und dem Endlager über Kultivierung auf PEMBA (s. 2.3.2.5) sowie parallel zur Absicherung der Ergebnisse über qPCR (s. 2.3.3.2) bestimmt.

Abb. 24 zeigt praktisch identische Werte für die Analysen über qPCR und Kultivierung auf PEMBA. Dies spricht für annähernde Äquivalenz beider Techniken, obwohl die Auswertung spezifischer Kolonien auf PEMBA wegen teilweise starken Überwuchses durch Hintergrund-Mikroflora meist problematisch war (s. 2.3.2.5). Eine methodische Problematik ergab sich innerhalb des qPCR-Ansatzes zuweilen auch beim 4-minütigen kumulativen Bead-Beating (nicht bei 30 s BB) infolge von Glasmilchbildung, die vermutlich durch Abrieb der Glaskugeln beim BB verursacht war. In diesen Fällen ergaben sich (fälschlich) negative

qPCR-Ergebnisse, die vermutlich auf DNA-Sorption an die Glasmilch (Silika-Partikel mit großer Oberfläche) zurückzuführen war. Für beide Methoden sind daher Verbesserungen wünschenswert.



kumul. BB: kumulative Extraktion mit 4 min. Bead-Beating, s. 2.3.3.1.1); 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1)

Abbildung 24: *Bacillus cereus*-Gruppe, Kultivierung und qPCR, Pilotanlage Berbling, Monitoring

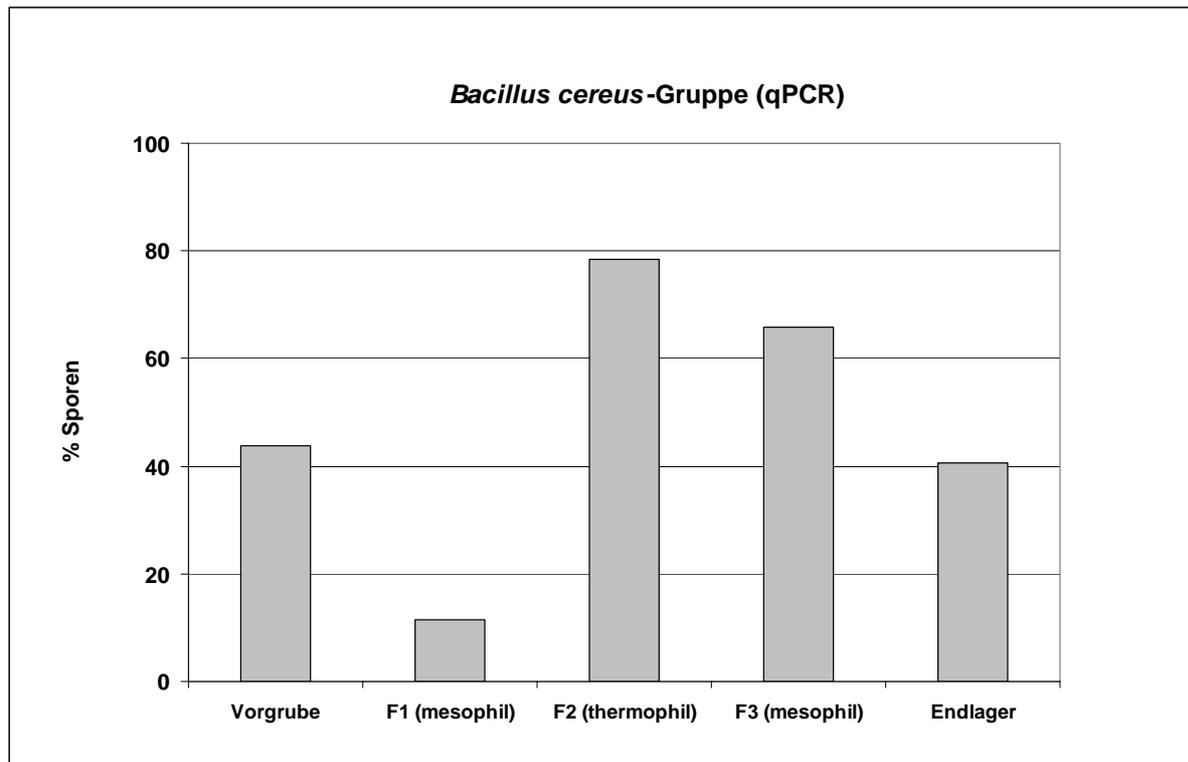
In der Vorgrube fanden sich etwas über  $10^4$  KBE Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (*BcG*) / g FG, was in dieser Höhe bei gesunden Tieren (s. 2.1.1.1) nicht erwartet wurde. In der Literatur finden sich praktisch keine Daten zu *BcG*-gehalten in Rindergülle. Die eigenen Ergebnisse lassen sich daher nur schwer einordnen.

Bis zum Endlager ergab sich eine marginale Reduktion der auf PEMBA bestimmten *BcG* um etwa 0,5 log-Stufen (Abb. 24). Angesichts der ausgeprägten Hitzeresistenz der Sporen, die partiell sogar einige Minuten Abkochen überstehen (BROWN, 2000), war auch keine stärkere Reduktion zu erwarten. Entsprechend den eigenen Ergebnissen wurde *B. cereus* bei thermophiler Vergärung von Rinder- und Schweinegülle bei 53°C nicht reduziert (ERREBO LARSEN and MUNCH, 1990; BENDIXEN, 1999).

Die etwas geringeren auf PEMBA bestimmten *BcG*-Gehalte im F2, F3 und Endlager bei suboptimalen Temperaturen im F2 (48 - 55°C) könnten auf unter diesen Bedingungen verstärkte Sporulation zurückzuführen sein, da die qPCR-Werte im thermophilen F2 (55°C) entsprechend leicht erhöht waren (Abb. 24). Möglicherweise keimt nur eine Fraktion der Sporen unter den gewählten Inkubationsbedingungen auf PEMBA aus, während das harsche, insgesamt 4 min währende Bead-Beating (BB) während der kumulativen Extraktion (s. 2.3.3.1.1) offenbar auch bakterielle Sporen aufbricht, und damit über qPCR wahrscheinlich (annähernd) die gesamte Population erfasst wird. Hierfür spricht, dass vegetative gramnegative sowie grampositive Bakterien nach 30 s BB quantitativ aufgeschlossen wurden (s. 3.1.1.1, 3.1.1.3, 3.1.2, 3.1.3), während für die *BcG*-Gruppe durch das kumulative BB im



Mittel 2,15 mal mehr *BcG*-Vertreter detektiert wurden als nach 30 s BB. Darauf, dass im thermophilen F2 eine Sporulation verstärkt stattgefunden hat, weist das besonders dort hohe Verhältnis der Ausbeute an *BcG*-Vertretern nach kumulativem 4 min. BB gegenüber 30 s BB hin, aus dem der prozentuale Gehalt an Sporen errechnet wurde (Abb. 25). Danach verringerte sich dieses Verhältnis, was auf relative Zunahme vegetativer Zellen hindeutet. Gleichzeitig vergrößerte sich das Verhältnis qPCR / PEMBA-detektierte *BcG*-Vertreter (Abb. 24) etwas, was auf leichtes Absterben (ca. 0,5 log-Stufen) dieser vegetativen Zellen schließen lässt. Demnach hat im thermophilen F2 Sporulierung aber keine Inaktivierung der *BcG*-Vertreter stattgefunden, während ein (geringes) Absterben in den Stationen nach dem thermophilen F2 erfolgt ist.



Der prozentuale Gehalt an Sporen wurde aus dem Verhältnis vegetative Zellen + Sporen (4 min. kumulatives Bead-Beating) zu vegetativen Zellen (30 s Bead-Beating) errechnet

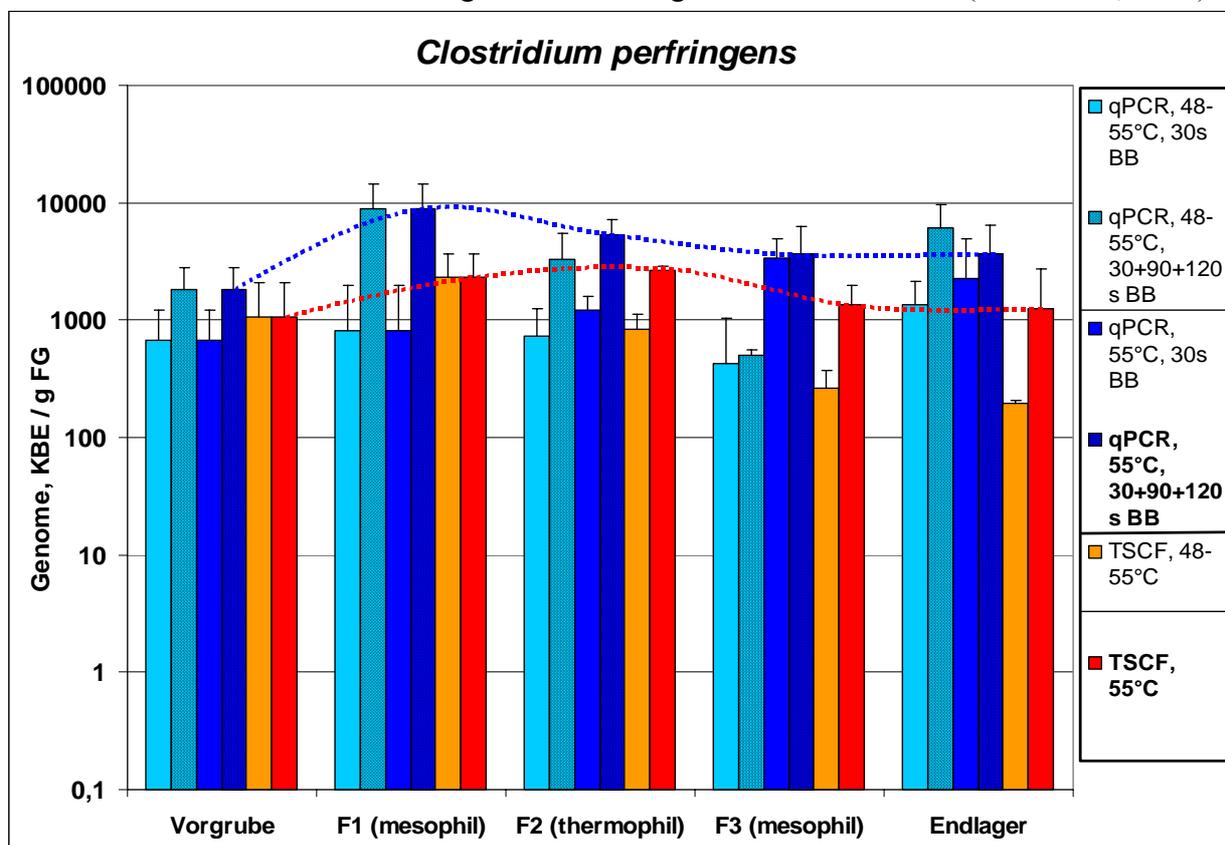
Abbildung 25: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, *Bacillus cereus*-Gruppe, Pilotanlage Berbling, Monitoring

Eine nennenswerte Vermehrung der *BcG*-Vertreter während der anaeroben Vergärung in der Pilotanlage Berbling kann anhand der in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden, eher trat bis zum Endlager eine (sehr geringe) Reduktion ein. Bei Düngung mit (empfohlenerweise verdünntem) Gärrest werden also in etwas geringerem Ausmaß als bei Gülle-Düngung ausgebracht. Erste vorläufige Bodenanalysen auf *BcG*-Vertreter ergaben weder für Gärrest- noch für Gölledüngung Unterschiede zu *BcG*-Gehalten im Boden der Wasserschutzzone I (s. 3.2.4). Zur Zeit kann also davon ausgegangen werden, dass bei Gärrest- und Gölledüngung im empfohlenen Ausmaß keine Beaufschlagung durch Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe über das natürliche Maß hinaus stattfindet, allerdings wird empfohlen, über weiterführende regelmäßige Analysen diese Einschätzung abzusichern.

### 3.1.7 *Clostridium perfringens*

Ähnlich wie *B. cereus* (s. 3.1.6) ist *Clostridium perfringens*, der Erreger des Gasbrands, ebenfalls ein Toxin-produzierender Sporenbildner, lebt allerdings anaerob und zeigt ein Wachstumsoptimum im thermophilen Bereich (BROWN, 2000). Er findet sich ubiquitär im Boden und in den Faeces verschiedener Tiere sowie des Menschen (GELDREICH, 1978). Er ist Indikator für Verunreinigungen des Trinkwassers durch Oberflächen-Abschwemmungen und spielt daher als fakultativer Parameter in der Trinkwasserverordnung eine Rolle.

*C. perfringens* wurde im Koch'schen Plattengussverfahren in TSCF-Agar bestimmt, da ARAUJO et al. (2001, 2004) zeigten, dass diese gegenüber anderen Methoden insbesondere für die Sporen eine höhere Wiederfindungsrate aufweist (Faktor knapp 1,5 gegenüber mCP-Agar) und spezifischer ist. Demnach entsprechen 1000 in TSCF-Agar bestimmte *C. perfringens* etwa 750 in mCP-Agar. Das chromosomale  $\alpha$ -Toxin-Gen *plc* wurde als Ziel der qPCR verwendet, da dieses in Einzelkopie in allen *C. perfringens* Toxinotypen (A - E) vorkommt (PETIT et al., 1999). Zur Erfassung vegetativer Zellen wurde eine Extraktion mit 30 s Bead-Beating (BB) durchgeführt, zur Erfassung der Gesamtpopulation (vegetative Zellen + Sporen) eine kumulative Extraktion mit insgesamt 4-minütigem BB in Intervallen (s. 2.3.3.1.1, 3.1.6).



30+90+120s BB: kumulatives (4 min) Bead-Beating; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt.

Abbildung 26: *Clostridium perfringens*, Monitoring, Pilotanlage Berbling

Ähnlich wie für die *B. cereus*-Gruppe (s. 3.1) war auch für *C. perfringens* praktisch keine Reduktion zwischen Vorgrube und Endlager festzustellen (Abb. 26). Die Werte lagen im Mittel mit etwa  $10^3$  KBE bzw. Genome / g FG am oberen Rand der Spanne der von ZETHNER et al. (2002) angegebenen 10 - 3000 KBE *C. perfringens* / g FG Rindergülle. GELDREICH (1978) fand mit 200 KBE *C. perfringens* / g Rindergülle ebenfalls etwas geringere Werte.



Hier können methodische Unterschiede (s.o.) Ursache einer Unterbestimmung gewesen sein, natürliche oder Fütterungs-bedingte Variabilität könnten ebenfalls eine Rolle spielen. ERREBO LARSEN and MUNCH (1990) fanden annähernd  $10^4$  KBE *C. perfringens* / mL in (Gärresten von) verschiedenen biologischen Abfällen. Es sollte untersucht werden, ob zwischen einem höheren Besatz von Gülle mit *C. perfringens* und Fütterung mit Produkten tierischer Herkunft ein Zusammenhang besteht. In Gülle von Milchvieh, das ausschließlich auf pflanzlicher Basis ernährt wird, sind keine erhöhten Gehalte potentiell toxinogener bakterieller Sporenbildner wie *C. perfringens* zu erwarten, der Gärrest ist daher hinsichtlich dieser Parameter bei pflanzlicher Fütterung als unkritisch anzusehen. Den Hinweisen zufolge könnten allerdings bei Fütterung mit (anteilig) tierischen Produkten höhere Gehalte bakterieller Sporenbildner (Leitparameter *C. perfringens*) in Gülle und Gärrest auftreten, entsprechendes kann auch für Gärrest aus der Co-Vergärung mit anderem tierischem oder kontaminiertem pflanzlichen Material gelten.

In Fällen mit solchen Unsicherheiten ist anzuraten, das Eingangsmaterial und/oder den Gärrest auf *C. perfringens* zu überprüfen. Bei  $\geq 3000$  *C. perfringens* / mL (bzw. g FG) muss bei aktueller Kenntnislage von einer Kontamination (z.B. mit Kot von Fleischfressern) ausgegangen werden. Ein Gärrest mit solchen Gehalten an *C. perfringens* sollte nicht in sensiblen Gebieten wie der WZ II oder auch direkten Einzugsgebieten von Badegewässern ausgebracht werden (vgl. 4.3, 4.4), da sonst mit einer Anreicherung bakterieller Sporenbildner im Boden gerechnet werden muss bzw. eine Kontamination des Grundwasserstroms oder des Badegewässers nicht auszuschließen ist (s. 3.2.5).

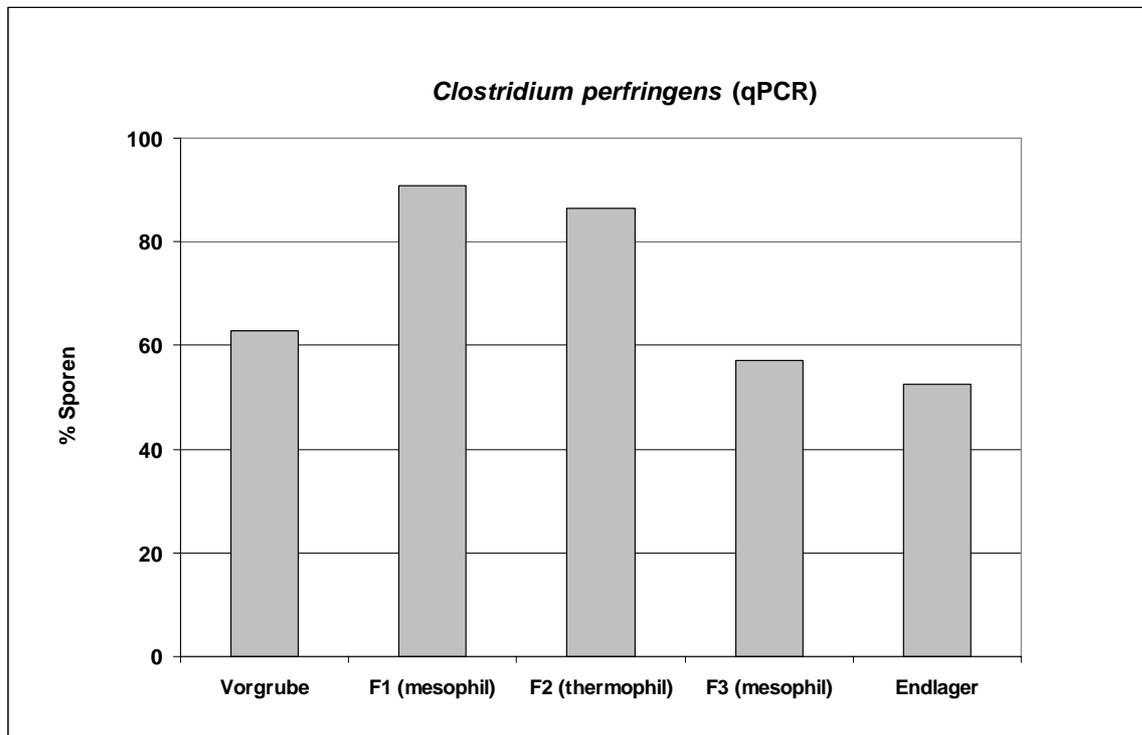
In keiner bekanntgewordenen Untersuchung konnte *C. perfringens* bisher durch anaerobe Vergärung reduziert werden (z.B. ERREBO LARSEN and MUNCH, 1990; BENDIXEN, 1999; ZETHNER et al., 2002), nicht einmal durch eine vorgeschaltete Pasteurisierung (O'REILLY and COLLERAN, 2004), was die eigenen Befunde (Abb. 26) bestätigt. Ein sicheres Abtöten kann nur durch Dampfdrucksterilisation erreicht werden (BROWN, 2000), was für einen Landwirt nicht durchführbar ist. *C. perfringens*-Sporen bleiben in der Umwelt über Jahre, wahrscheinlich Jahrzehnte überlebensfähig (HILL et al., 1996) und können fäkale Verunreinigung indizieren (CONBOY and GOSS, 2001). Da *C. perfringens* aber ubiquitär in der Umwelt vorkommt (Trinkwasser sollte allerdings frei von *C. perfringens* sein) und die Verunreinigung wegen seiner langen Überlebensfähigkeit praktisch nicht zurückdatiert werden kann, ist er als Indikator für aktuelle fäkale Kontamination so gut wie wertlos (ASHBOLT et al., 2001).

Abb. 27 zufolge fand besonders im mesophilen F1 und im thermophilen F2 Sporulation von *C. perfringens* statt, dabei nahm gleichzeitig auch die Gesamtpopulation der *C. perfringens* vorübergehend geringfügig zu (Abb. 26). Im weiteren Verlauf ging die *C. perfringens*-Gesamtpopulation auf Werte um oder unwesentlich unter das Ausgangsniveau zurück, und gleichzeitig sank der Anteil der Sporen wieder auf etwa 50 % (Abb. 26, Abb. 27). Abb. 26 zufolge schienen konstante Temperaturen von 55°C im thermophilen F2 die *C. perfringens*-Gesamtpopulation eher leicht zu fördern, während bei 48 – 55°C wegen der leicht unterschiedlichen Entwicklungen der TSCF- und qPCR-Werte kein klarer Trend erkennbar war.

Die Quantifizierung von *C. perfringens* war nicht unproblematisch (vgl. 2.3.2.6). Die in vielen Fällen bei der Kultivierung in TSCF erhaltene Ausbildung konfluenter Schwarzfärbung mit fluoreszierenden Rändern in den Agarplatten erlaubte häufig nur eine grobe Schätzung der Anzahl verantwortlicher Einzelkolonien. Gut auswertbare Platten ohne die konfluenten Bereiche hatten meist nur 1 – 5 für *C. perfringens* typische Einzelkolonien, die Auswertung war damit allerdings statistisch ziemlich unsicher. Die Problematik der Glasmilchbildung beim 4-minütigen kumulativen Bead-Beating mit vermuteter DNA-Sorption und (fälschlich)



negativen qPCR-Ergebnissen ist bei 3.1.6 genauer dargestellt. Wegen der guten Übereinstimmung der qPCR- und TSCF-Ergebnisse (Abb. 26) kann dennoch davon ausgegangen werden, dass diese zuverlässig sind. Verbesserungen sind allerdings für beide Methoden wünschenswert.



Der prozentuale Gehalt an Sporen wurde aus dem Verhältnis vegetative Zellen + Sporen (4 min. kumulatives Bead-Beating) zu vegetativen Zellen (30 s Bead-Beating) errechnet

Abbildung 27: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, *Clostridium perfringens*, Pilotanlage Berbling, Monitoring

Zusammenfassend wird festgestellt, dass *C. perfringens* wegen seiner ausgesprochen hohen Tenazität auch bei konstanten 55°C und gesicherter minimaler Verweilzeit von 8 – 9 h nicht oder nur unwesentlich reduziert wird. Eine vorübergehende (marginale) Zunahme um 0,2 – 0,5 log-Stufen ging zum Endlager wieder zurück (Abb. 26). *C. perfringens* zeigte also praktisch keine Veränderungen in der Populationsgröße und nur vorübergehende geringe Veränderungen in der Populationsstruktur während des mesophil-thermophil-mesophilen Biogas-Prozesses. Dies steht im Einklang mit den eingangs erwähnten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. *C. perfringens* kann damit nicht als Parameter zur Bestimmung der Effizienz von Hygienisierungsprozessen in Biogasanlagen empfohlen werden, und wurde aus den genannten Gründen auch nicht in die VERORDNUNG (EG) NR. 1774/2002 für Material der Kategorie 3 aufgenommen.

Dennoch wird *C. perfringens* als wichtiger Parameter angesehen. Eine Anreicherung bakterieller toxinogener Sporenbildner in der Umwelt sollte vermieden werden, besonders wenn dadurch eine Gefährdung des Grundwassers und von Lebewesen entstehen könnte. Aus den eigenen Analysen und den o.g. Berichten geht hervor, dass *C. perfringens* in Gülle von gesundem Milchvieh mit adäquater Grünfütterung sowie im Gärrest nach anaerober Behandlung im Bereich  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  ( $3 \times 10^3$  über TSCF-Kultivierung) KBE / mL liegt. Dieser Wert könnte als vorläufige Zielgröße für eine Substrat- oder Produktprüfung angesehen werden, wenn hinsichtlich der Herkunft des Ausgangssubstrat Zweifel bestehen (s. oben).



Es wird angeraten, das Verhalten der Populationsgröße nicht nur von *C. perfringens* sondern auch von *C. botulinum* in Gülle und Gärrest sowie nach deren Ausbringung in verschiedenen Böden verstärkt wissenschaftlich zu untersuchen. Nach der Güll- und Gärrest-Ausbringung konnten die eigenen Ergebnisse dazu (s. 3.2.5) allenfalls eine Momentaufnahme für *C. perfringens* und ein kleines Spektrum verschiedener Böden bieten. Dabei ergab sich kein klarer Trend, allenfalls zeichnete sich eine leichte Belastung bei Güll-Düngung ab (s. 3.2.5). Die Ergebnisse konnten bisher nur in eine vorläufige Belastungsklassifikation geordnet werden, da vor allem die natürliche Hintergrundbelastung in Böden noch ungenügend geklärt ist. Möglicherweise wird aufgrund entsprechender Daten zu fordern sein, dass *C. perfringens* (sowie u.U. auch *C. botulinum*) in bestimmten Güllen und Gärresten durch geeignete Maßnahmen generell vor einer landwirtschaftlichen Verwertung zu reduzieren ist (vgl. 3.2.5).

### 3.1.8 *Cryptosporidium parvum*

Der alte Species-Name *C. parvum* wird hier stellvertretend für *C. parvum* + *C. hominis* verwendet (s. 2.3.2.7). Das qPCR-System war spezifisch für die humanpathogenen Arten *C. parvum* und *C. meleagridis* sowie für *C. wrairi*, dessen Wirtsspezifität noch ungenügend bekannt ist. Das qPCR-Monitoring erfasste damit alle humanpathogenen Kryptosporidien.

#### 3.1.8.1 Monitoring, Berblinger Pilotanlage

Das Monitoring der Berblinger Pilotanlage auf *C. parvum* wurde ausschließlich mit dem qPCR-System (s. 2.3.3.2, 3.1.8) durchgeführt, da über diese Technik die Gesamtpopulation (lebende + tote) überwacht als Screening werden kann. Eindeutig positive Befunde wären über metabolische Tests (s. 2.3.2.7.5, 2.3.2.7.6, 2.3.2.7.7, 2.3.2.7.8, 2.3.3.2.2) zu bestätigen

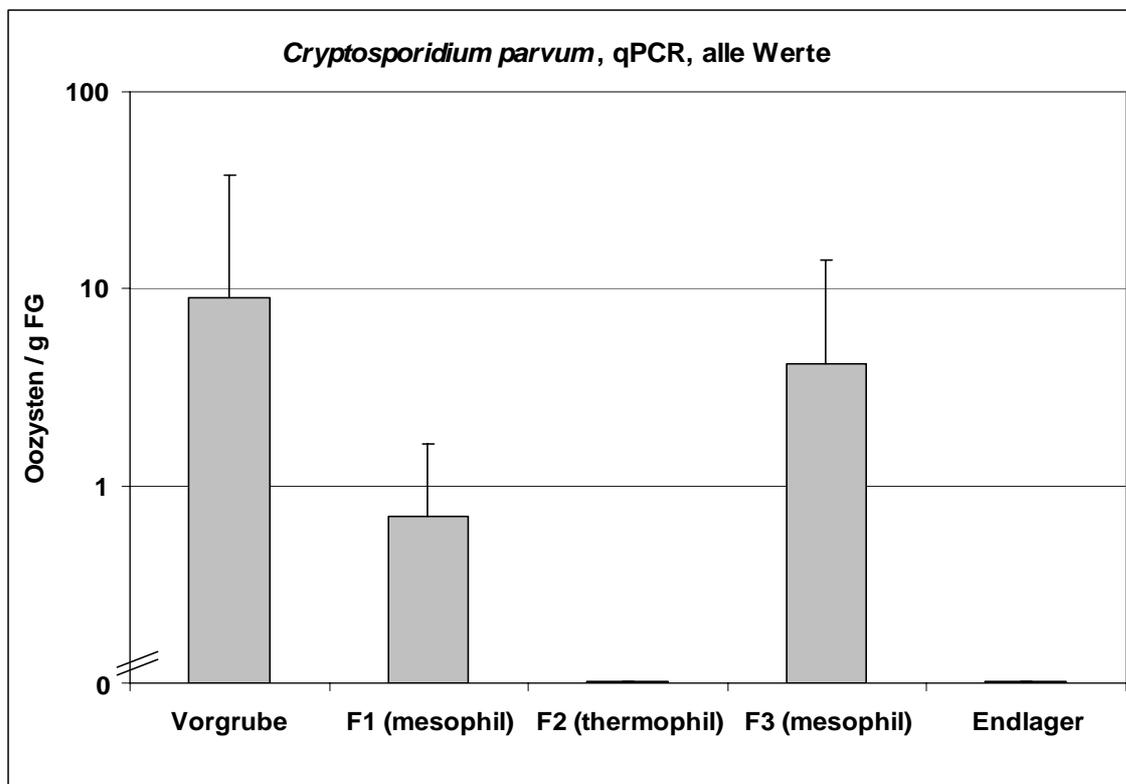


Abbildung 28: *Cryptosporidium parvum*-DNA, qPCR-Monitoring, Pilotanlage Berbling gewesen, die wegen ihrer Aufwändigkeit im Routine-Screening nicht durchgeführt wurden.



Abb. 28 zeigt, dass in den Proben aus der Vorgrube und den Fermentern teilweise DNA-Spuren von *C. parvum* an der Nachweisgrenze (82,5 Oozysten bei 40  $\mu$ L extrahierter Michprobe) festgestellt wurden, in keinem Fall aber in den Endlager-Proben. Unterschiede zwischen suboptimalem (48 - 55°C) und optimalem Betrieb im F2 (gesicherte 55°C) konnten nicht festgestellt werden.

Da DNA in der Fermenterkette praktisch nicht abgebaut wird obwohl die Organismen abgestorben sein können (GARCÉS et al., 2005; LEBUHN et al., 2005; s. 3.1.1 - 3.1.7; Abb. 32, Abb. 33), und hohe statistische Unsicherheit bei sehr geringen Konzentrationen des Ziel-Organismus in der (Misch-)Probe besteht, ist der positive Nachweis in einer von 6 Proben im mesophilen F3 in Abb. 28 nicht verwunderlich. Dennoch sprechen die positiven Befunde dafür, dass entweder die von den Nachbarbetrieben zugeführte Gülle oder die des Betriebs Schweiger (ohne dass Symptome erkannt wurden, s. 2.1.1.1) in Einzelfällen geringfügig kontaminiert war. Die unten dargestellten Ergebnisse zu metabolischen Parametern aus den Keimträgerexperimenten sowie der negative Nachweis für die Endlagerproben belegen aber, dass über den Gärrest wohl keine vitalen Oozysten ausgetragen wurden, während das für die ausgebrachte Gülle nicht gesagt werden kann.

### 3.1.8.2 Keimträgerexperimente und Wasserbadversuche

#### 3.1.8.2.1 Wasserbadversuche

In den Wasserbadexperimenten (s. 2.3.1.2, 2.3.2.7) zeigte sich für die Exzystierung eine 2-stufige Reduktions-Kinetik (Abb. 29). Bei 55°C ergab sich eine sehr schnelle Reduktion der Exzystierbarkeit innerhalb 10 - 30 min auf 3,5 - 1,3 nicht-exzystierbare Oozysten und damit ein D-Wert von 8,76 min für die schnelle Inaktivierung. Die Anzahl nicht-exzystierbarer Oozysten blieb danach praktisch konstant (Abb. 29).

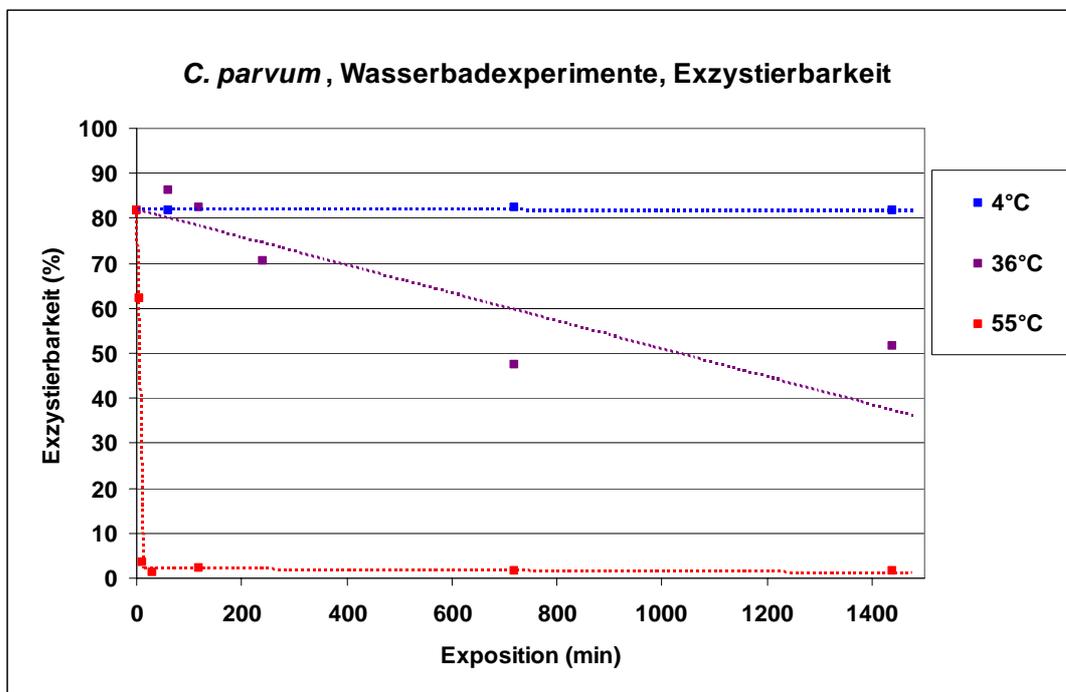
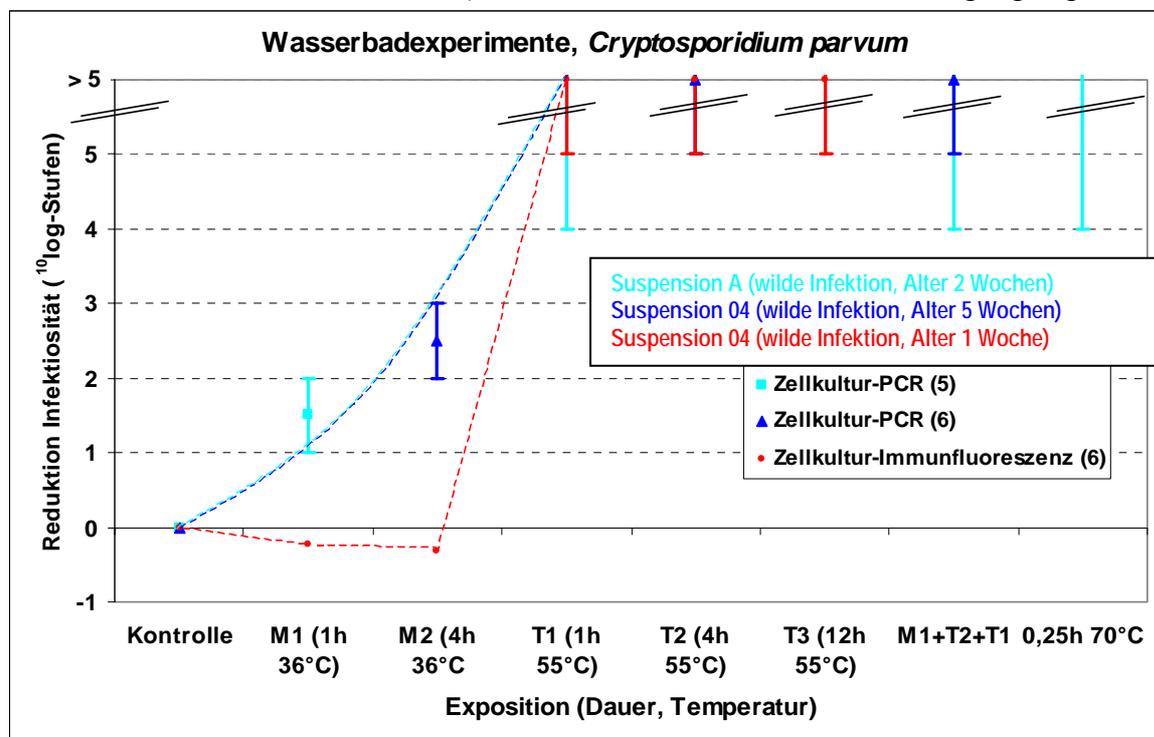


Abbildung 29: *Cryptosporidium parvum*, Wasserbadexperimente, Exzystierbarkeit in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen

Zellkultur-PCR (2.3.2.7.5) sowie Zellkultur-Immunfluoreszenz (2.3.2.7.6) zeigten bei 55°C eine Reduktion infektiöser Oozysten innerhalb einer Stunde um mehr als 5 log Stufen (Abb. 30), was einer Reduktion um 1 log Stufe innerhalb < 12 min (D-Wert < 12 min) entspricht

und damit etwa im Bereich der ersten, schnellen Inaktivierungs-Kinetik der Exzystierung (D-Wert zwischen 7 und 43 min; über Regression: 8,8 min,  $R^2=0,777$ ) liegt, die also wahrscheinlich als Surrogat die Inaktivierung anzeigen kann. Die residualen, nicht-exzystierbaren Oozysten in der zweiten Phase bei 55°C (ohne Veränderung) sind demnach ausschließlich nicht infektiös und abgetötet, und entsprechen einer Fraktion, um die die Exzystierung die Infektiosität nach Stress überbestimmt.

BUKHARI et al. (2000) berichten ebenfalls, dass nach Stresseinflüssen über Analyse der Exzystierbarkeit und der Membranintegrität infektiöse Oozysten überschätzt werden. NEUMANN et al. (2000) zeigten, dass in ungestressten Oozysten eine nicht-exzystierbare aber infektiöse Fraktion vorliegen kann. Auch in den eigenen Versuchen war eine solche Fraktion zu erkennen (Abb. 29). HOU et al. (2004) kamen trotz Optimierung der in-vitro-Exzystierung zu demselben Schluss. Sie folgerten, dass die Exzystierung kein geeigneter Parameter zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von *C. parvum*-Oozysten ist. Demnach wäre für eine realistische Beurteilung einer Gefährdung allein der Infektiositätstest (insbesondere mit menschlicher Zellkultur, s. 2.3.2.7.4) bzw. ein daran standardisiertes Surrogat geeignet.



(5): maximal  $10^5$  Oozysten eingesetzt, daher nicht mehr als 4 log-Stufen Reduktion nachzuweisen; (6): maximal  $10^6$  Oozysten eingesetzt. Die farbigen Balken der Standard-Abweichungen stellen Detektionsgrenzen dar und bedeuten, dass die entsprechenden Werte innerhalb bzw. über diesen Schwellen lagen. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt.

Abbildung 30: *Cryptosporidium parvum*, Wasserbadexperimente, Infektiosität in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen

Bei 4°C sowie 20°C ergab sich innerhalb 24 h weder eine Reduktion der Exzystierbarkeit noch der Infektiosität. Bei 36°C waren nach 1 h die Exzystierbarkeit (Abb. 29) und die über Zellkultur-Immunfluoreszenz bestimmte Infektiosität (Abb. 30) leicht erhöht, danach ging die Exzystierbarkeit mit einem relativ geringen D-Wert von 83,3 h zurück. In Extrapolation wären damit 17,4 Tage zur mesophilen Reduktion vitaler Oozysten um 5 log-Stufen nötig, was allerdings schon aufgrund der Streuung der bisherigen Werte (Abb. 29) zu bestätigen wäre. In der Literatur klaffen die entsprechenden Angaben mit D-Werten zwischen 8 h und keine Reduktion mesophil ebenfalls weit auseinander (GODFREE and FARRELL, 2005). Hierfür



können etwas unterschiedliche Tenazitäten verschiedener und/oder verschieden alter Isolate verantwortlich sein. Dementsprechend wurden bei Verwendung verschiedener Isolate verschiedenen Alters sogar qualitativ verschiedene Infektiositäts-Ergebnisse nach 1 h und 4 h Exposition bei 36°C erzielt (Abb. 30): Diese Behandlungen steigerten die Infektiosität frischer (1 Woche alt) Oozysten etwas gegenüber gleichalten gelagerten, während sie ältere Oozysten schädigte. In der Literatur sind ähnliche Effekte der Alterung beschrieben (FAYER et al., 1998; BUKHARI et al., 2000; FAYER et al., 2000). Infektiositäts-Unterschiede zwischen den Oozysten aus den verschiedenen 'wilden' Infektionen können ebenfalls Ursache der verschiedenen Ergebnisse gewesen sein. Solche Unterschiede sind für verschiedene Kryptosporidien-Stämme bekannt (FAYER et al., 2000; ROSE et al., 2002; ROCHELLE, 2004).

Wegen der sehr unterschiedlichen Effekte im mesophilen Bereich (Abb. 30) kann eine mesophile Behandlung ohne weitere Hygienisierungsstufe auf Basis der derzeitigen Datenlage keine Reduktion um mindestens 4,2 log-Stufen (WHO, 2004b) garantieren. Die mesophile Vergärung allein kann daher - auch im Zusammenhang mit den anderen Befunden dieser Studie - nicht gewährleisten, dass der Gärrest hygienisch einwandfrei ist, und kann damit auch nicht für eine Anwendung in Wasserschutzgebieten empfohlen werden.

Dagegen zeigen die Infektiositätstests im Wasserbad (Abb. 30, Abb. 31), dass die Reduktion um diese Spanne bereits bei  $\geq 1$ -stündigen gesicherten 55°C (und genügend hoher eingesetzter Oozysten-Konzentration) in allen getesteten Fällen erzielt wurde. Die Infektiosität frischer Oozysten wurde sogar um mehr als 5 log-Stufen reduziert. Abb. 31 zufolge reichte allerdings das 1-stündige Einwirken von 50°C im Wasserbad dazu nicht aus, und ein (langsames) Absterben begann bei 1 h Einwirkzeit erst bei 44°C (Abb. 31). Bei 47,5°C, die bei Reaktor-Ausfällen durchaus erreicht werden (s. 2.1.1.1), wären errechnet 3,24 h nötig, um die von WHO (2004b) empfohlene Reduktion um 4,2 log-Stufen zu erreichen. Ein entsprechender Puffer zumindest in diesem Ausmaß sollte bei der Verfassung von Richtlinien oder Empfehlungen zur Ausbringung thermophil behandelten Gärrests berücksichtigt werden, um bei (kurzfristigen) Reaktorausfällen ein Ausschleusen eventuell infektiöser Kryptosporidien ins Endlager zu verhindern.

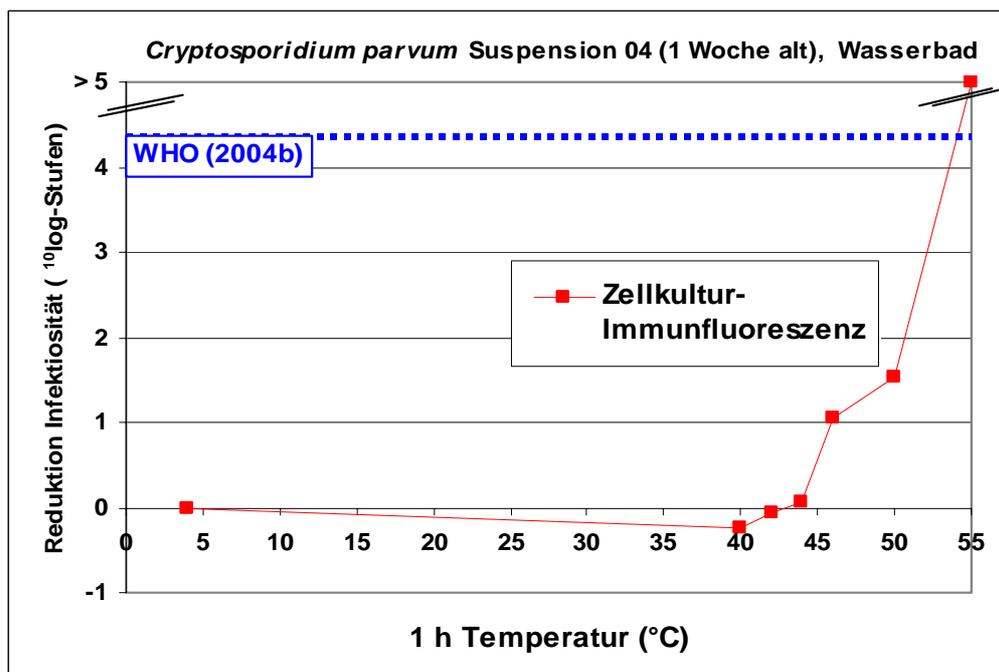
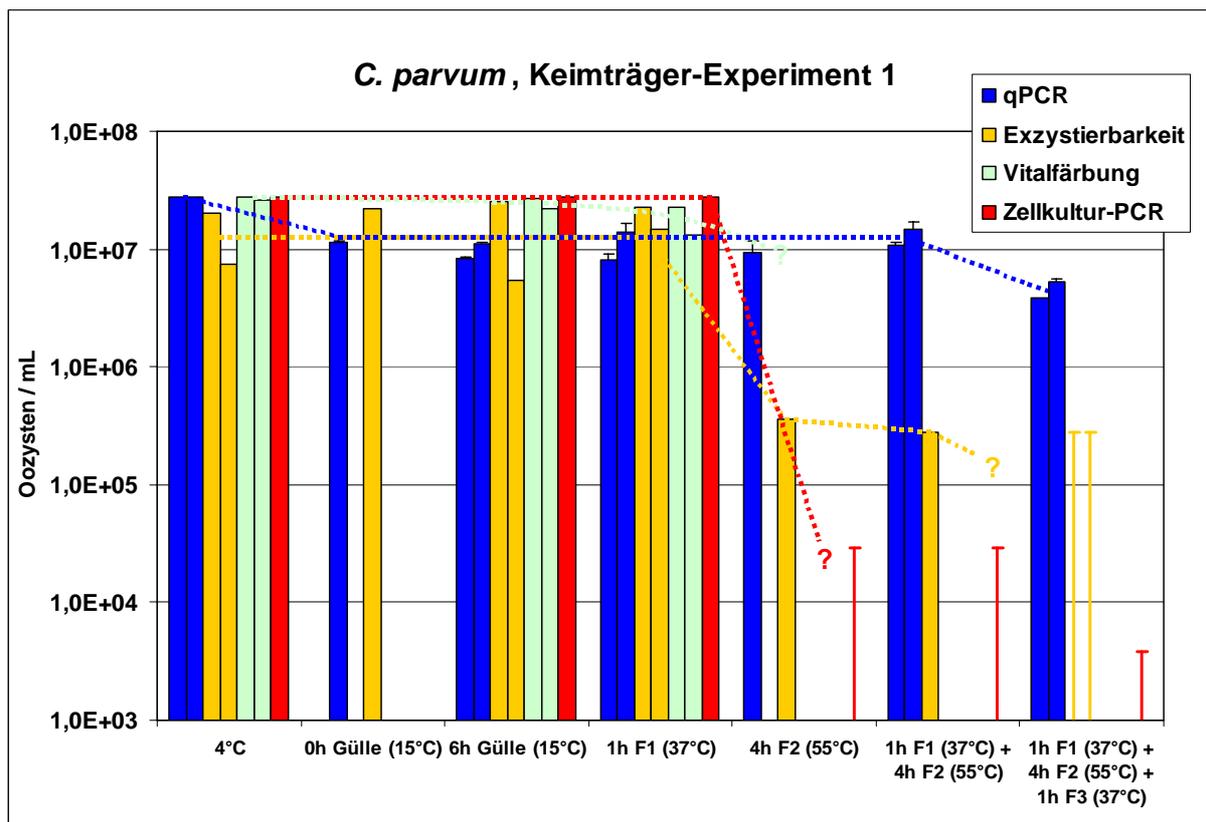


Abbildung 31: Einfluss 1-stündiger Einwirkzeit auf *Cryptosporidium parvum* Oozysten, Wasserbadexperiment

Den Daten aus den Wasserbadexperimenten zufolge weisen Oozysten von Kryptosporidien bei 55°C einen D-Wert von < 12 min auf. Wegen der bioziden Einflüsse in Gülle und Gärrest (s. unten) sollte die Reduktionszeit in diesen Medien noch weiter verkürzt sein. Die Temperatur ist allerdings bei der Inaktivierung der dominierende Faktor (GODFREE and FARRELL, 2005). In jedem Fall sind Oozysten von Kryptosporidien deutlich empfindlicher als intestinale Enterokokken (D-Werte 60 - 102 min in Gülle). Um intestinale Enterokokken (in Gülle) um 4 log-Stufen zu dezimieren sind 4 - 6,8 h nötig (s. 3.1.3), also wesentlich mehr als zum sicheren Abtöten der Kryptosporidien um über 5 log-Stufen. Die häufig als Surrogat für Parasiten verwendeten *Ascaris*-Eier zeigten D-Werte bei 55°C von nur 7 min (JONES and MARTIN, 2003) und wären damit ebenfalls wesentlich empfindlicher als intestinale Enterokokken. ERREBO LARSEN and MUNCH (1990) berichten, dass alle getesteten Parasiten-Eier nach 1 - 4 h Behandlung bei 53°C ihre Lebensfähigkeit verloren hatten. Die intestinalen Enterokokken können damit als sicheres Surrogat für Kryptosporidien bei der Keimreduktion betrachtet werden.

### 3.1.8.2.2 Keimträger-Experimente

In der Modellanlage (s. 2.1.1.2) wurden 3 Keimträger-Experimente (s. 2.3.2.7.2) durchgeführt, die sich in wesentlichen Punkten unterschieden: (i) der Art der Reinigung der Keimträgerinhalte, (ii) der Nachweismethode der Infektiosität und (iii) der Länge der Verweilzeiten in der einzelnen Kompartimenten.



Die Daten aus qPCR, Exzystierbarkeit (%), Vitalfärbung (%) und Zellkultur-PCR ( $10^5$  bzw.  $10^3$  bzw.  $10^4$  Oozysten eingesetzt, s. Text) wurden zur Vergleichbarkeit hochgerechnet auf den Gehalt an Oozysten in 1 mL Keimträger-Volumen. Die farbigen Balken der Standard-Abweichungen stellen Detektionsgrenzen dar und bedeuten, dass die entsprechenden Werte unter diesen Schwellen lagen. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt.

Abbildung 32: *Cryptosporidium parvum*, Keimträger-Experiment 1, Modellanlage, qPCR, Exzystierbarkeit, Vitalfärbung und Zellkultur-PCR



In den ersten beiden Experimenten wurden die Keimträger-Inhalte über Kochsalzflotation gereinigt, die zum Teil sehr schlechte Wiederfindungsraten aufwies (s. 2.3.2.7.1). Die im ersten Experiment (Abb. 32) relativ hohen Werte für die metabolischen Parameter aus den meso- und thermophilen Behandlungen deuteten an, dass die Kochsalzflotation für vitale Oozysten selektierte. So ging z.B. die Exzystierbarkeit nach 4-stündiger 55°C Behandlung sowie bei 1 h 37°C + 4 h 55°C in Experiment 1 nur um ca. 81 % zurück (Abb. 32), während nach der effizienteren Reinigung über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (s. 2.3.2.7.3) nach diesen Behandlungen keine Oozysten mehr infektiös oder exzystierbar waren (Abb. 33). Vergleichende mikroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Reinigungstechniken stützten die Vermutung, dass vitale Oozysten durch Kochsalzflotation selektiv angereichert werden (M. Najdrowski, IPL Leipzig, persönl. Mitteilg.), und dadurch der Anteil lebender Oozysten in den entsprechenden Proben überschätzt wird. Zu den relativ hohen Werten für die metabolischen Parameter kann auch wesentlich beigetragen haben, dass infektiöse Oozysten nach Temperatur-Stress über Bestimmung der Membranintegrität und der Fähigkeit zur Exzystierung überschätzt werden (s. 3.1.8.2.1; BUKHARI et al., 2000).

Wie in allen anderen Experimenten in dieser Studie beobachtet, nahm auch der *C. parvum*-DNA-Gehalt während der unterschiedlichen Behandlungen nicht oder nur marginal ab, während starke Reduktionen bei der Fähigkeit zur Exzystierung und der Infektiosität erkennbar waren (Abb. 32, Abb. 33). Auch hier zeigte sich also, dass sich qPCR hervorragend zur zuverlässigen spezifischen Quantifizierung der (DNA-) Gesamtpopulation eignet, die Ergebnisse aber keinen Aufschluss über den Anteil lebensfähiger Individuen in den Proben liefern können.

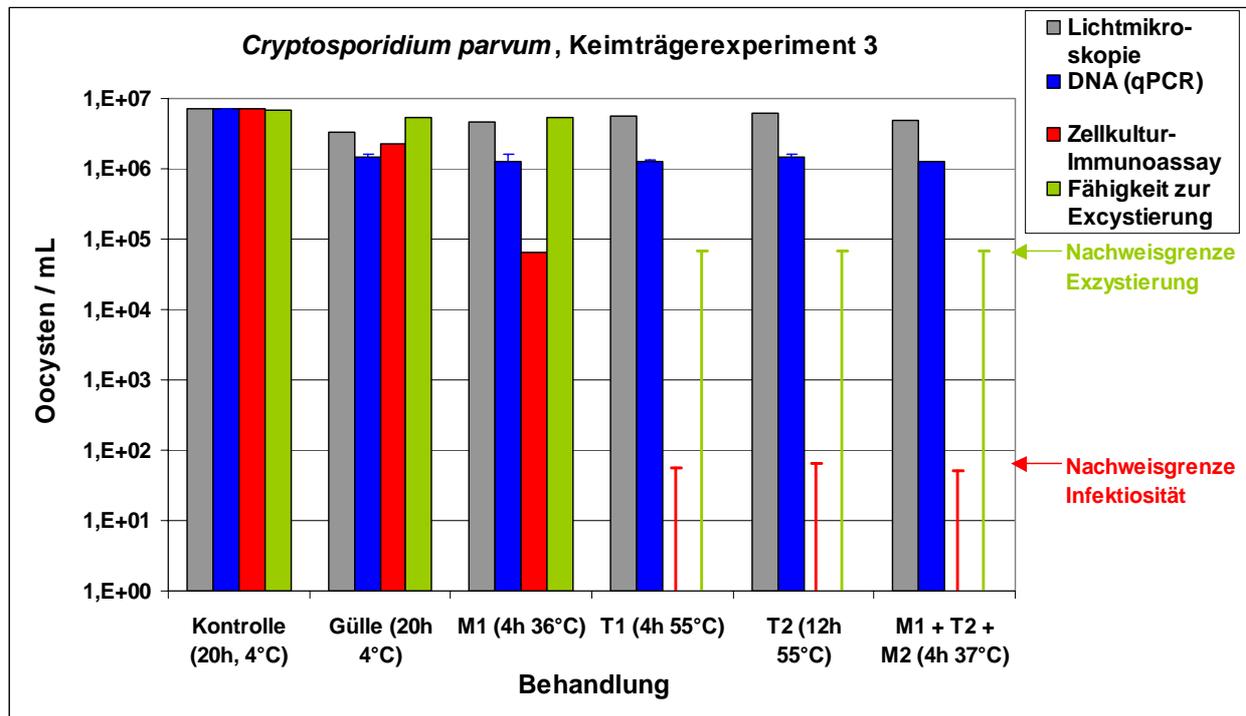
Zur Analyse auf Exzystierbarkeit werden gewöhnlich (nur) ca. 100 Oozysten untersucht. Deswegen kann auch keine Reduktion um über 2 log-Stufen dokumentiert werden (Nachweisgrenzen in Abb. 32, Abb. 33), selbst wenn ggf. stärker inaktiviert wurde. Zum Nachweis einer von der WHO (2004b) für *Cryptosporidium* vorgeschlagenen Reduktion um 4,2 log-Stufen, die nötig ist um ein tolerables Risiko bei der Wasseraufbereitung zu Trinkwasser zu erzielen, hätten also mehr als  $10^{4.2}$  Oozysten analysiert werden müssen, was praktisch nicht durchführbar ist. Selbst nach 4 h 55°C waren noch 1,3 % und nach 1 h F1 + 4 h F2 noch 1,0 % exzystierbare Oozysten vorhanden (Abb. 32). MEYER et al. (1999) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Hier handelte es sich wohl um die in 3.1.8.2.1 beschriebene, abgestorbene Restfraktion des 2-stufigen Abbaus (Abb. 29). Die Zellkultur-PCR-Werte bestätigen, dass diese Oozysten-Fraktion nicht mehr infektiös war (Abb. 32). Dies untermauert, dass infektiöse Oozysten nach Temperatur-Stress über Analyse der Exzystierbarkeit überschätzt werden (s. 3.1.8.2.1).

Im ersten Experiment wurde zur Bestimmung der Infektiosität ein Zellkultur-PCR-Assay verwendet (s. 2.3.2.7.5), während im dritten Experiment Infektiosität über einen Zellkultur-Immunfluoreszenz-Assay (s. 2.3.2.7.6) bestimmt wurde. Mit der Zellkultur-PCR waren Infektiositäts-Unterschiede nur in ganzen log-Stufen darstellbar. Das kann neben der selektiven Anreicherung vitaler Oozysten dazu beigetragen haben, dass in Abb. 32 nach 1 h mesophiler Behandlung keine Reduktion der Infektiosität über Zellkultur-PCR festgestellt wurde, während in Experiment 3 nach 1 h 37°C über den Immunfluoreszenz-Assay eine verminderte Infektiosität der Oozysten um 2 log-Stufen gemessen wurde (Abb. 33). Das liegt etwas über entsprechenden Werten in der Literatur (FAYER et al., 1998; GODFREE and FARRELL, 2005). Dafür können neben den methodischen Differenzen auch Infektiositäts- und Alters-Unterschiede zwischen den verwendeten Oozysten verantwortlich sein (3.1.8.2.1).

Über Zellkultur-PCR war in Versuch 1 wohl vor allem aus methodischen Gründen (s. oben) keine Reduktion der Infektiosität nach 1 h mesophiler Behandlung festzustellen. Dagegen waren infektiöse Oozysten nach den 4 h im thermophilen F2 (55°C gesichert) sowie 1 h F1 + 4 h F2 um mehr als 3 log Stufen reduziert, nach 1 h F1 + 4 h F2 + 1 h F3 (Fermenterkette

gesamt) sogar um mehr als 4 log Stufen (Abb. 32). Eine höhere Abbaurrate war in diesem Experiment kaum zu erzielen, da wegen Reinigungsverlusten (s. 2.3.2.7.1) in den Varianten 4 h F2 sowie 1 h F1 + 4 h F2 nur  $10^3$  Oozysten und in in der Variante 1 h F1 + 4 h F2 + 1 h F3 nur  $10^4$  Oozysten eingesetzt werden konnten. Wegen der hohen Reinigungsverluste konnten für diese 3 Varianten auch keine Vitalfärbungen durchgeführt werden. Wegen der mangelhaften Nachweisgrenze wurde das Experiment wiederholt. Die Ergebnisse der Wasserbadexperimente (s. 3.1.8.2.1) ließen ja Inaktivierungsraten über 5 log-Stufen erwarten.

In Experiment 2 ergaben die qPCR-Daten das gleich Bild wie in Experiment 1 (Abb. 32) und 3 (Abb. 33), und werden daher nicht dargestellt. Bei der Reinigung der Keimträgerinhalte durch Kochsalzflotation an IPL war der Verlust an Oozysten so groß (M. Najdrowski, persönl. Mitteilg.), dass keiner der metabolischen Parameter Exzystierbarkeit, Vitalfärbung und Infektiosität bearbeitet werden konnte.



Die Daten aus lichtmikroskopischer Zählung (Neubauer-Zählkammer), qPCR, Exzystierbarkeit (%) und Zellkultur-Immunoassay ( $10^5$  Oozysten eingesetzt) wurden zur Vergleichbarkeit hochgerechnet auf den Gehalt an Oozysten in 1 mL Keimträger-Volumen. Die farbigen Balken der Standard-Abweichungen stellen Detektionsgrenzen dar und bedeuten, dass die entsprechenden Werte unter diesen Schwellen lagen.

Abbildung 33: *Cryptosporidium parvum*, Keimträger-Experiment 3, Modellanlage, lichtmikroskopische Zählung, qPCR, Exzystierbarkeit und Zellkultur-Immunoassay

Es wurde daher ein drittes Keimträger-Experiment mit Reinigung über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (s. 2.3.2.7.3) und Bestimmung der Infektiosität über den Zellkultur-Immunfluoreszenz-Assay (s. 2.3.2.7.6, 3.1.8.2.1) durchgeführt. Dabei wurde grobes partikuläres Material vor Einsatz in die Keimträger zur leichteren Reinigung und störungsfreien Analyse durch IPL entfernt, und die Überständen mit den Oozysten (Keimträger-Inhalte) bei Beibehaltung des jeweiligen chemischen Milieus und osmotischen Drucks in den Gülle- bzw. Fermenter-Kompartimenten exponiert (s. 2.3.2.7.2). Auf Bestimmung der Vitalität durch Membranintegrität (s. 2.3.2.7.8) wurde in diesem Experiment verzichtet, da sich in einer Reihe von Bestimmungen vor allem in Gegenwart partikulären organischen Materials schlechte Färbungseffizienz, hohe Streuung der Werte und schlechte Reproduzierbarkeit ergab (nicht dargestellt). Zudem hätten über diesen Parameter mehr als



$10^{4,2}$  Oozysten analysiert werden müssen, um eine Reduktion über 4,2 log-Stufen (WHO, 2004b) demonstrieren zu können. Sie bringt damit gegenüber der Exzystierung keine Vorteile. Darüber hinaus ist die Überschätzung infektiöser Stadien mit dieser Methode dokumentiert (s. 3.1.8.2.1; BUKHARI et al., 2000). Abb. 33 zeigt die Ergebnisse für das dritte Keimträgerexperiment in der Modellanlage.

Bei zunehmender Behandlungs-Intensität nahm die Gesamtzahl der Oozysten (lichtmikroskopische Zählung, modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung) praktisch nicht, die Anzahl detektierter *C. parvum* Genome (qPCR) nur marginal, jedoch die Exzystierbarkeit und die Infektiosität besonders mit der thermophilen Behandlung drastisch ab (Abb. 33). Dies bestätigt, dass DNA der Oozysten nur unwesentlich abgebaut wird, diese aber nicht mehr vital und infektiös sind. Dabei nahm die Zahl der Oozysten pro Zählkammervolumen nicht ab. Das spricht dafür, dass die Percoll-Dichtegradienten-Reinigung im Gegensatz zur Kochsalz-Flotation (s. oben) nicht für intakte Oozysten selektierte.

Abb 31 zeigt, dass sich bereits durch den Einfluss von Komponenten in der Gülle bei 4°C (wahrscheinlich hauptsächlich  $\text{NH}_3$ , HOFERER, 2001; LEPEUPLE et al., 2004) eine geringe Reduktion bei allen Parametern ergab. Dies belegt, dass die Ergebnisse zur abtötenden Wirkung der Temperatur aus den Wasserbadexperimenten (s. 3.1.8.2.1) realistisch sind und die tatsächlichen, in den Fermentern erzielten Abtötungsraten wegen der zusätzlichen bioziden Wirkung der Inhaltsstoffe sogar eher unterschätzen.

Die 4 h mesophile Behandlung reduzierte die Infektiosität der Oozysten um ca. 2 log-Stufen, während die Exzystierbarkeit praktisch unverändert blieb (Abb. 33). Dies dokumentiert die potentielle Überschätzung infektiöser Oozysten durch Bestimmung der Exzystierung (s. 3.1.8.2.1). Die Höhe der Reduktion um etwa 2 log-Stufen entsprach dem höchsten Ergebnis in den Wasserbadexperimenten nach 4 h 36°C (Abb. 30) und war daher plausibel. Dennoch war die erzielte Reduktion zu gering, als dass die 4 h mesophile Behandlung allein als Hygienisierungsmaßnahme für sensible Gebiete als ausreichend bezeichnet werden könnte. In Extrapolation ergibt sich, dass zur Reduktion um 5 log-Stufen etwa 10 - 13 h mesophile Vergärung von Rindergülle ausreichen sollten.

Effektiv, um über 5 log-Stufen, reduzierten dagegen die 4- und 12-stündigen thermophilen (55°C gesichert) Behandlungen und genauso die Kombination mit den mesophilen Vor- und nachgeschalteten Stufen (Abb. 33). Demnach reicht die 4-stündige thermophile anaerobe Vergärung von Rindergülle auch ohne die mesophilen Stufen, um die Infektiosität von Kryptosporidien-Oozysten um über 5 log Stufen zu reduzieren. Den Wasserbad-Experimenten zufolge ist dafür sogar 1 h 55°C ausreichend (Abb. 30, Abb. 31). Den D-Werten für die resistenteren intestinalen Enterokokken (s. 3.1.8.2.1, 3.1.3) zufolge würden diese rechnerisch in 4 h 55°C in Gülle um 2,4 – 4 h reduziert werden, was im Bereich des Vorschlags von LARSEN et al. (1994) liegt. Eine gesicherte Verweilzeit von 4 h bei gesicherten 55°C wäre damit eine sinnvolle Zielgröße zur Behandlung von Rindergülle in Biogasanlagen, wenn der Gärrest vom bakteriologischen und parasitologischen Standpunkt her einwandfrei und auch zur Ausbringung in sensiblen Regionen (WZ II) geeignet sein soll.

### 3.1.9 Giardia duodenalis

Auf die Bestimmung von *G. duodenalis* wurde aus den bei 2.3.2.8 genannten Gründen verzichtet. Die Resistenz von *G. duodenalis* und *C. parvum* gegenüber äusseren Einflüssen ist BETANCOURT and ROSE (2004) zufolge praktisch identisch. Damit sind bezüglich der Hygienisierungseffizienz keine relevanten Unterschiede zwischen diesen beiden Parasiten zu erwarten. Bis zur Veröffentlichung gegenteiliger Befunde gelten damit die Ergebnisse und die Diskussion für *Cryptosporidium parvum* (s. 3.1.8) stellvertretend auch für die Giardien.



### 3.1.10 Rotaviren

Humane Rotaviren wurden für am 10.2.2005 genommene Proben aus den Kompartimenten der Berblinger Anlage durch LGL über den dort etablierten Enzym-Immunoassay gegen das Rotavirus-Antigen bestimmt (s. 2.3.2.9). Im relevanten Zeitraum vor der Probenahme funktionierte die Berblinger Anlage optimal, nach Mitte Februar 2004 wurde im thermophilen Fermenter gesichert 55°C eingehalten (s. 2.1.1.1).

Für alle Proben (Vorgrube, mesophiler F1, thermophiler F2, mesophiler F3, Endlager) fiel der Test auf humane Rotaviren negativ aus, allerdings ist die Detektionsgrenze des Systems für Rindergülle nicht bekannt.

Trotz der methodischen Unsicherheit kann davon ausgegangen werden, dass sowohl humane als auch bovine Rotaviren bei Vorhandensein in der Vorgrube wegen ihrer Temperatur-Sensitivität (D-Werte 7 - 18 min bei 55°C, SPILLMANN et al., 1987) durch die thermophile Behandlung bei 55°C und minimaler gesicherter Verweilzeit von 8 - 9 h im Berblinger F2 rechnerisch um weitaus mehr als 6 log Stufen reduziert worden wären. Bei der gegenwärtigen Kenntnislage müssen Rotaviren daher hinsichtlich Hygienisierung durch thermophile Vergärung als unkritischer Parameter angesehen werden.

### 3.1.11 Enterovirus

Enteroviren wurden für am 10.2.2005 genommene Proben aus den Kompartimenten der Berblinger Anlage durch LGL über die dort etablierte RT-PCR nachgewiesen (s. 2.3.2.10). Im relevanten Zeitraum vor der Probenahme funktionierte die Berblinger Anlage optimal, nach Mitte Februar 2004 wurde im thermophilen Fermenter gesichert 55°C eingehalten (s. 2.1.1.1).

Für alle Proben (Vorgrube, mesophiler F1, thermophiler F2, mesophiler F3, Endlager) fiel der Test auf Enteroviren negativ aus, allerdings ist die Detektionsgrenze des von LGL verwendeten Systems für Rindergülle nicht bekannt.

In den Untersuchungen mit dem eigenen RTqPCR-System mit vorgeschalteter optimierter RNA-Extraktion (s. 2.3.2.10) wurde ebenfalls in keiner der untersuchten Proben ein positiver Nachweis erzielt. Die Methoden-Detektionsgrenze (incl. Extraktion) lag hier bei  $8,3 \times 10^3$  RNA-Kopien pro mL Gülle, die Gehalte der Enteroviren daher sicher unter diese Marke.

Die Tenazität von Enteroviren ist der Literatur zufolge sehr gering. GODFREE and FARRELL (2005) beschreiben sie als kleiner als die der Coliformen. HOFERER (2001) bestimmte D-Werte für humane, bovine und porcine Enteroviren bei 55°C im Bereich 2 - 14 min. Polioviren, die auch zur Gattung *Enterovirus* gehören, waren mit D-Werten von 1,8 - 5,4 min bei 55°C eher noch empfindlicher (HOFERER, 2001). Sie wären damit durch die thermophile Behandlung bei 55°C und der minimalen gesicherten Verweilzeit von 8 - 9 h im Berblinger F2 rechnerisch um weitaus mehr als 6 log Stufen reduziert worden. Bei der gegenwärtigen Kenntnislage müssen Enteroviren daher hinsichtlich Hygienisierung durch thermophile Vergärung ebenfalls als unkritischer Parameter angesehen werden.

### 3.1.12 Norovirus

Noroviren der Genogruppen I und II wurden für am 10.2.2005 genommene Proben aus den Kompartimenten der Berblinger Anlage durch LGL über die dort etablierten RT-PCR-Systeme nachgewiesen (s. 2.3.2.11). Im relevanten Zeitraum vor der Probenahme funktionierte die Berblinger Anlage optimal, nach Mitte Februar 2004 wurde im thermophilen Fermenter gesichert 55°C eingehalten (s. 2.1.1.1).



Für alle Proben (Vorgrube, mesophiler F1, thermophiler F2, mesophiler F3, Endlager) fiel der Test auf *Norovirus* Gg I und Gg II negativ aus, allerdings ist die Detektionsgrenze der von LGL verwendeten Systeme für Rindergülle nicht bekannt.

In den Untersuchungen mit dem eigenen RTqPCR-System mit vorgeschalteter optimierter RNA-Extraktion (s. 2.3.2.11) wurde ebenfalls in keiner der untersuchten Proben ein positiver Nachweis erzielt. Die Methoden-Detektionsgrenze (incl. Extraktion) lag hier bei  $8,3 \times 10^3$  RNA-Kopien pro mL Gülle, die Gehalte der Noroviren daher sicher unter diese Marke.

Da für Noroviren bisher noch kein allgemein akzeptiertes System zur Bestimmung der Infektivität bekannt ist, wird konventionell das ebenfalls zu den *Caliciviridae* gehörende feline Calicivirus (FCV) als Surrogat für Noroviren verwendet. DOULTREE et al. (1999) beschreiben für das FCV einen D-Wert bei 56°C von 8 min. Das FCV (für Noroviren sollten ähnliche Verhältnisse gelten) ist damit ähnlich wie die Rotaviren (s. 3.1.10) und Enteroviren (s. 3.1.11) sehr empfindlich gegenüber Temperatur-Stress. Das FCV hätte damit durch die thermophile Behandlung bei 55°C und minimaler gesicherter Verweilzeit von 8 - 9 h im Berblinger F2 rechnerisch um weitaus mehr als 6 log Stufen reduziert werden können. Sobald ein geeignetes Modell zur Überprüfung der Infektivität für Noroviren zur Verfügung steht, sollten die Verhältnisse für Noroviren überprüft werden.

## 3.2 Bodenproben

Ziel der Untersuchung war, erste Anhaltspunkte zu bekommen, ob sich durch Gärrest- im Vergleich zu Gülleausbringung mikrobiologische Bodeneigenschaften ändern. Insbesondere sollten die mikrobiologischen Ergebnisse erste Informationen liefern, ob sich bei Ausbringung des Gärrests im Boden eine Wiederverkeimung oder eine Anreicherung mit bestimmten Keimen ergeben kann. Die Untersuchungen können wegen der Kürze des überspannten Zeitraums keinesfalls einen entgeltigen Schluss zulassen, sollten aber Information darüber zulassen, ob und in welchen Bereichen ein Gefahrenpotential besteht, das ggf. verstärkt weiteruntersucht werden sollte.

Die Berblinger Standorte und wichtige Hintergrundinformationen zu diesen sind bei 2.1.2.1 beschrieben. Abb. 2 zeigt eine Skizze der Probenahmepunkte mit der Abfolge der Beprobungen und Tab. 2 Details zu den Probenahmen. Näheres zur Analyse zusätzlicher, als Referenzen verwendeter Standorte findet sich bei 2.1.2.2 und 2.1.2.3. Beobachtungen bei den Bodenprobenahmen, die Entnahme selbst und die Aufbereitung der Proben sind bei 2.2.2 dargestellt. Hintergrundinformationen zu den für die Bodenproben untersuchten mikrobiologischen Parametern finden sich bei 2.3.1.4.

Zum Verständnis der Ergebnisse ist wichtig, dass die als Verlaufskontrolle vorgesehene Kontrollparzelle bereits nach der ersten Beprobung 2003 aufgegeben werden musste. Der von Herrn Schweiger zum Frühjahrstermin 2004 empfohlene Probenahmepunkt (Abb. 2) war der Kontamination durch Gülle und Tierkot verdächtig (s. 2.1.2.1). Die entsprechenden Proben können daher nicht als Kontrolle angesehen werden. Die einmalige Verschiebung der Beprobungsfläche der Gülle-Variante zum Frühjahrstermin 2004 (Abb. 2) bewirkte den Ergebnissen zufolge keine Unterschiede. Bodenprofil, -Substrat, Vorgeschichte und Düngung zwischen Gülleplot Hof Schweiger und dem nur wenige 100 m entfernten Standort unterschieden sich auch praktisch nicht (s. 2.1.2.1). Ab dem Herbsttermin 2004 wurde in der Wasserschutzzone I eine Null-Variante (natürliche Hintergrundbelastung) angelegt (s. 2.1.2.1).

Bei allen Schritten von Bodenprobenahme über Aufbereitung bis Analyse wurde größter Wert auf Vermeidung von Kreuzkontamination gelegt. Dementsprechend wurden auch möglichst manuelle Techniken gewählt (s. 2.2.2).

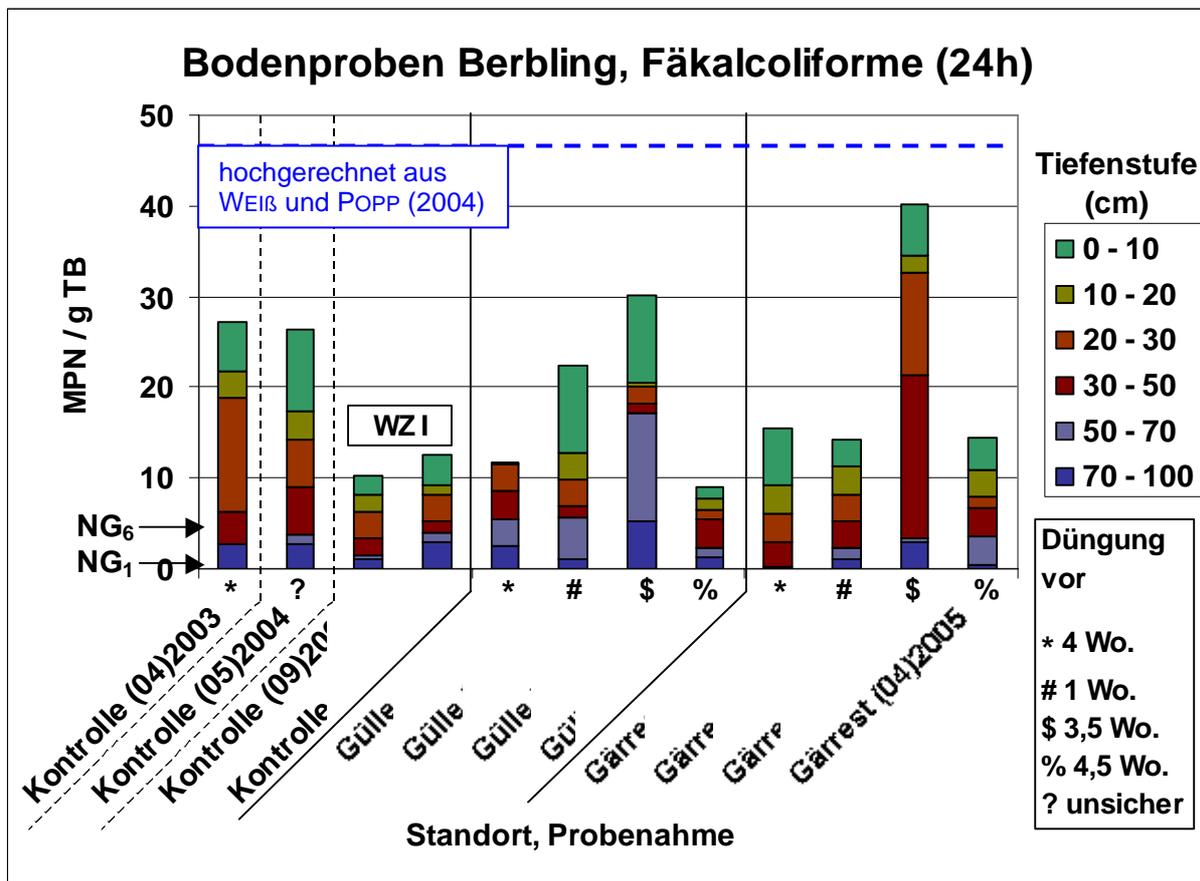


### 3.2.1 Fäkalcoliforme

Die Fäkalcoliformen-Keimzahlen wurden über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. 2.3.2.1) bestimmt.

Abb. 34 zeigt die Gehalte an Fäkalcoliformen im Boden der untersuchten Berblinge Standorte. Hier ist die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung zu beachten. Ebenfalls ist generell in den Darstellungen der bakteriellen Gehalte in den Böden zu beachten, dass die Gehalte für die 6 beprobten Tiefenstufen kumuliert (aufsummiert) dargestellt sind. Zur Berechnung des mittleren Gehalts im Boden eines Standorts zu einem Termin muss der kumulierte Wert (y-Achse: MPN / g TB) durch 6 dividiert werden.

Abb. 34 zeigt, dass sich die untersuchten Standorte nicht oder nur marginal im Besitz des Bodens mit Fäkalcoliformen unterscheiden. Im Beprobungs-Zeitraum war auch keine eindeutige Tendenz einer Zu- oder Abnahme zu erkennen. Unterschiede infolge verschiedener Düngung (Gülle / Gärrest) waren nicht zu erkennen, allenfalls ein im Mittel marginal höherer Besitz mit Fäkalcoliformen im Gülle- (3,1 MPN / g TB) und Gärrest-Plot (3,5 MPN / g TB) gegenüber den Gehalten im Boden der WZ I (1,9 MPN / g TB). Für das IAB-1f-Lysimeter (s. 2.1.2.2) wurden im Mittel 0,7 MPN Fäkalcoliforme / g TB gemessen.



NG<sub>1</sub>, NG<sub>6</sub>: Nachweisgrenze bei Analyse einer Tiefenstufe bzw. kumuliert für 6 Tiefenstufen. 24h: Bebrütungszeit in Fluorocult®. WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr.

Abbildung 34: Bodenproben Berbling, Gehalte an Fäkalcoliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

In der Literatur finden sich praktisch keine Angaben zu Gehalten an Fäkalcoliformen in den Berblinge Standorten vergleichbaren Böden. Hier besteht erheblicher Forschungsbedarf, da momentan keine abgesicherte Aussage zur 'natürlichen' Hintergrundbelastung gemacht



werden kann, die eine vergleichende Einschätzung der eigenen Daten ermöglichen könnte. Für unbelastete (sub)tropische Süßwasser- bzw. marine Sedimentböden finden sich stark unterschiedliche Angaben zu *E. coli* / Fäkalcoliformen im Bereich (rechnerisch) 0 - 0,18 / g (PIANETTI et al., 2004), 0,3 - 5 / g (CRAIG et al., 2002), 10 - 20 / g (DESMARAIS et al., 2002) und 0,05 - 100 / g (SKANAVIS and YANKO, 2001), was eine für eine Einschätzung der Ergebnisse für die Berblinger Böden nicht hilfreich ist.

Zu einer Einschätzung, ob durch die Düngung eine Belastung entstanden sein könnte, sind demnach die eigenen Werte für das unbelastete IAB-1f-Lysimeter und die Proben der WZ I am ehesten geeignet. Von diesen unterschieden sich die Werte für Fäkalcoliforme für die Gülle- und Gärrest-Plots nur marginal (s. oben). Demnach schien in den Berblinger Wiesenböden ein relativ schneller Abbau der eingetragenen Fäkalcoliformen stattgefunden zu haben, den Daten in Abb. 34 zufolge wahrscheinlich sogar innerhalb 1 Woche. Hiermit konform sind Angaben zum Überleben Fäkalcoliformer von typischerweise < 15 d auf Pflanzenoberflächen und < 20 d in Böden (FAO, 1997). PALUSZAK et al. (2003) stellten ebenfalls einen schnellen, den Daten zufolge hauptsächlich bereits an der Bodenoberfläche stattfindenden Abbau Fäkalcoliformer im Boden nach Begüllung von Wiesenstandorten fest. Allerdings scheinen sich einzelne Stämme oder deren Abkommen auch lange im Boden halten zu können, da in der Literatur Überlebenszeiten von *E. coli* in Boden/Wasser von fast 1 Jahr zu finden sind (PICKUP et al., 2003). Den eigenen Daten zufolge fand also durch Gärrest- und Gölledüngung allenfalls eine marginale Anreicherung Fäkalcoliformer im Boden statt. Die eigenen Werte lagen auch in allen Fällen unter den aus WEIB und POPP (2004) pro g TB hochgerechneten Werten aus der natürlichen Hintergrundbelastung in Dränabflüssen ungedüngter Ackerböden (Abb. 34).

Wahrscheinlich sind die mit der Gülle bzw. dem Gärrest eingetragenen Fäkalcoliformen im Boden nicht verstärkt in einen ABNC-Zustand übergegangen, da der Faktor der MPN nach 96 h Bebrütung zu MPN nach 24 h Bebrütung für die Bodenproben aller Parzellen bei etwa 1,9 lag, und damit eher kleiner war als die für Gärreste beobachteten Werte (s. 3.1.1).

Erstaunlich war, dass für alle Standorte selbst in 1 m Bodentiefe, also unterhalb des charakteristischen Schlufflehmbands (s. 2.1.2.1), noch Fäkalcoliforme nachzuweisen waren, wenn auch in zumeist sehr geringer Konzentration (Abb. 34). *E. coli* ist relativ leicht verlagerbar (s. 2.1.1.1). Eine schnelle Verlagerung in die Tiefe könnten bei stärkerer Austrocknung des Bodens im Schlufflehmband auftretende Schwundrisse bewirken, die als Makroporen bei Beregnung bzw. Düngung Oberflächenwasser mit kleinen Partikeln wie Bakterien tiefgründig ableiten können. WEIB und POPP (2004) schlossen aus ihren Analysen, dass ein Makroporenfluss noch bis 4,5 m Bodentiefe stattfinden kann. Sogar für tiefe Quellen wurde beobachtet, dass ein Zusammenhang zwischen bakterieller Kontamination und heftigen Regenereignissen bestand (SANTAMARIA and TORANZOS, 2003). Definitive Aussagen, ob durch Düngung eine Belastung des Grundwassers (außer durch Oberflächenabschwemmung) bei Vorhandensein von tiefgründigen Schwundrissen durch direkten vertikalen Eintrag stattfinden kann, müssen Daten liefern, die über direkte Tiefenbohrungen bis in den Grundwasserbereich und Probenahme nach der Düngung bei entsprechenden Verhältnissen (Regen nach Trockenheit) gewonnen wurden.

### 3.2.2 Coliforme

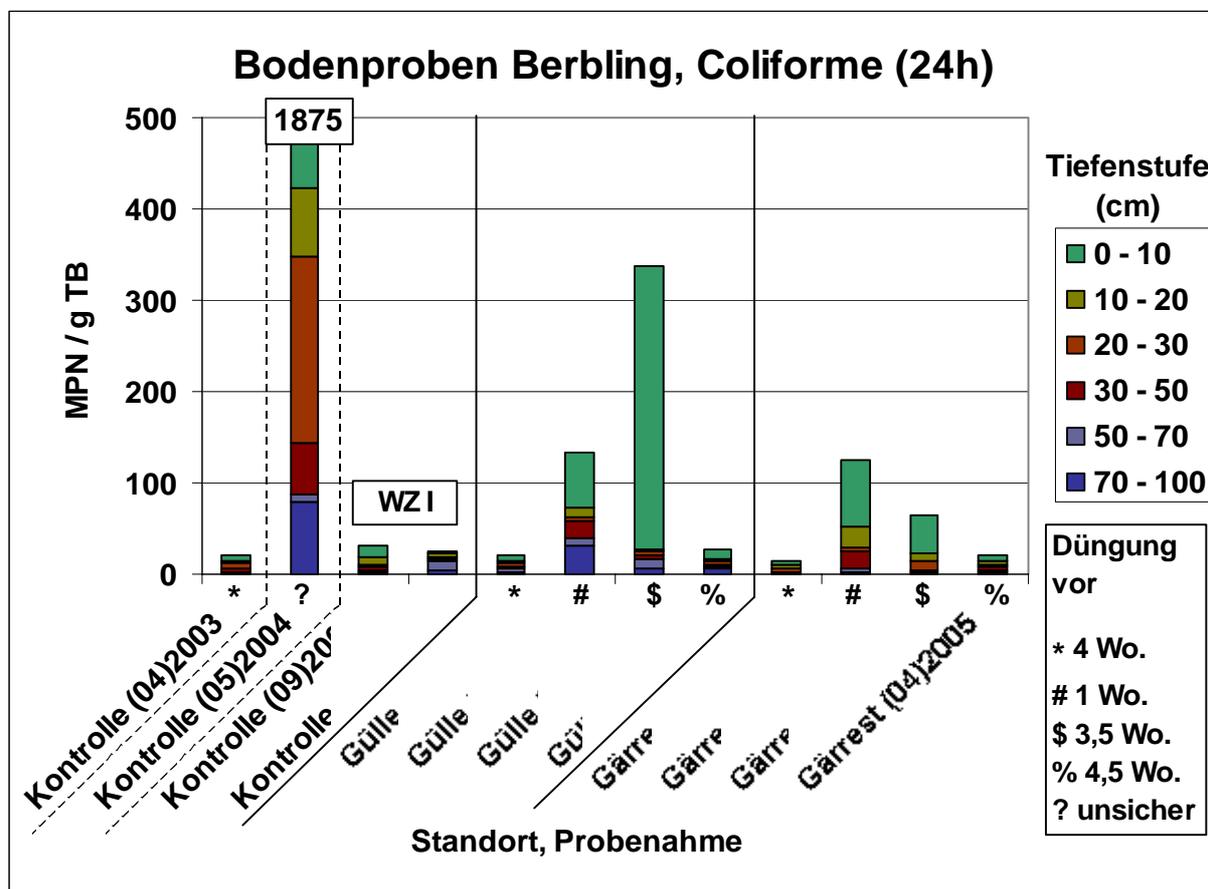
Die Coliformen-Keimzahlen wurden über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. 2.3.2.1) bestimmt.

Abb. 35 zeigt die Gehalte an Coliformen im Boden der untersuchten Berblinger Standorte. Die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung sowie die kumulierte Darstellung über die Tiefenstufen sind zu beachten (vgl. 3.2.1).



Im Beprobungs-Zeitraum war für keinen Standort eine eindeutige Tendenz zu einer Zu- oder Abnahme Coliformer zu erkennen. Die höchsten Gehalte an Coliformen fanden sich erwartungsgemäß immer im Oberboden. Positive Nachweise für Coliforme (im Gülleplot bis 30 MPN / g TB) ergaben sich in allen Standorten auch noch in 1 m Bodentiefe (Abb. 35), was auf Bildung von Schwundrissen zurückzuführen sein könnte (s. 3.2.1). Die untersuchten Standorte unterschieden sich voneinander im Besitz des Bodens mit Coliformen (Abb. 35) etwas deutlicher als für die Fäkalcoliformen beobachtet (s. 3.2.1). Der Besitz mit Coliformen lag im Mittel über die Tiefenstufen im Gülleplot mit 21,7 MPN / g TB höher als im Gärrest-Plot (9,4 MPN / g TB) sowie im Boden des Lysimeter (8,1 MPN / g TB) und der WZ I (4,8 MPN / g TB). Mit Abstand die meisten Coliformen fanden sich im Oberboden der 'Kontrolle' (Ausweichplot) im Mai 2004 (Abb. 35), was den Verdacht der Kontamination durch Gülledüngung und Eintrag anderer Tierfaeces der Probenahmestelle (s. 3.2) untermauert.

Auffällig war der in allen Parzellen und Tiefenstufen relativ hohe Faktor der MPN Coliformer nach 96 h gegenüber 24 h Bebrütung von im Mittel 8,9. Er lag damit im selben Bereich wie nach dem Stress der thermophilen Vergärung (s. 3.1.2), was auf geringe Aktivierbarkeit Coliformer bzw. starkem Übergang im Boden in den ABNC-Status schließen lässt.





sind autochthone Bodenbewohner, ein positiver Nachweis (in geringer Höhe) sagt also noch nichts über eine Kontaminations-Situation aus. Für marine Sedimentböden schwanken die Angaben zu Coliformen stark mit (rechnerisch) 0,04 - 10 / g (PIANETTI et al., 2004) und 0,05 - 100 / g (SKANAVIS and YANKO, 2001), geben also auch keinen Anhaltspunkt. Damit sind die eigenen Werte für das unbelastete IAB-1f-Lysimeter und die Proben der WZ I am ehesten zu einer Einschätzung geeignet, ob die Düngung eine Belastung mit Coliformen bewirkt haben könnte. Von diesen unterschieden sich die Werte vom Gärrest-Plot nur marginal, während die Werte vom Gülle-Plot im Mittel um den Faktor 2 – 5 höher lagen (s. oben). Damit lag kein Anhalt für eine Belastung des Bodens durch Coliforme nach Ausbringung von Gärrest vor, während sich nach Güllendüngung eine Belastung im Oberboden abzeichnete (Abb. 35), die weiter verfolgt werden sollte, um die Tendenz zu bestätigen und ggf. Gegenmaßnahmen einzuleiten. Hilfreich zur Einschätzung einer eventuellen Belastung wären Tiefenbohrungen unter den Flächen mit mikrobieller Analyse des Grundwassers (s. 3.2.1).

### 3.2.3 Intestinale (und Gesamt-) Enterokokken

Intestinale (und Gesamt-) Enterokokken wurden über Membran-Filtration und Kultivierung auf m-Enterokokken und Äsculin-Agar (s. 2.3.2.2) möglichst aus den Verdünnungen  $10^{-1}$  bestimmt, da sich zeigte, dass in stärkeren Verdünnungen die tatsächlichen Gehalte intestinaler Enterokokken unterschätzt wurden (s. 3.1.3). Dies war für die Bodenproben besonders ausgeprägt (vgl. 2.3.2.2), wahrscheinlich wegen starker Adsorption an Ton-Humuskomplexe, die typisch für viele Gram-positiver Bakterien ist (KAGAWA, 1971). Vergleichenden Berechnungen zufolge konnte die Unterschätzung > 1 log-Stufe betragen (nicht dargestellt).

Für die Gesamt-Enterokokken (nicht dargestellt) wurden im Mittel über die Tiefenstufen und Beprobungstermine Werte von 310,9 KBE / g TB (WZ I-Kontrolle), 3525,8 KBE / g TB (Gülle-Plot), 521,6 KBE / g TB (Gärrest-Plot) und 47,7 KBE / g TB (Lysimeter) erhalten. Damit wurden etwa 1,5 - 7 mal mehr Gesamt- als intestinale Enterokokken (s. unten) im Boden festgestellt, wobei die Verteilungsmuster über die Tiefenstufen und Probenehmertermine denen für die intestinalen Enterokokken (Abb. 36) praktisch entsprachen. Die Ergebnisse werden deswegen und aus den bei 2.3.2.2 und 3.1.3 genannten Gründen nicht diskutiert.

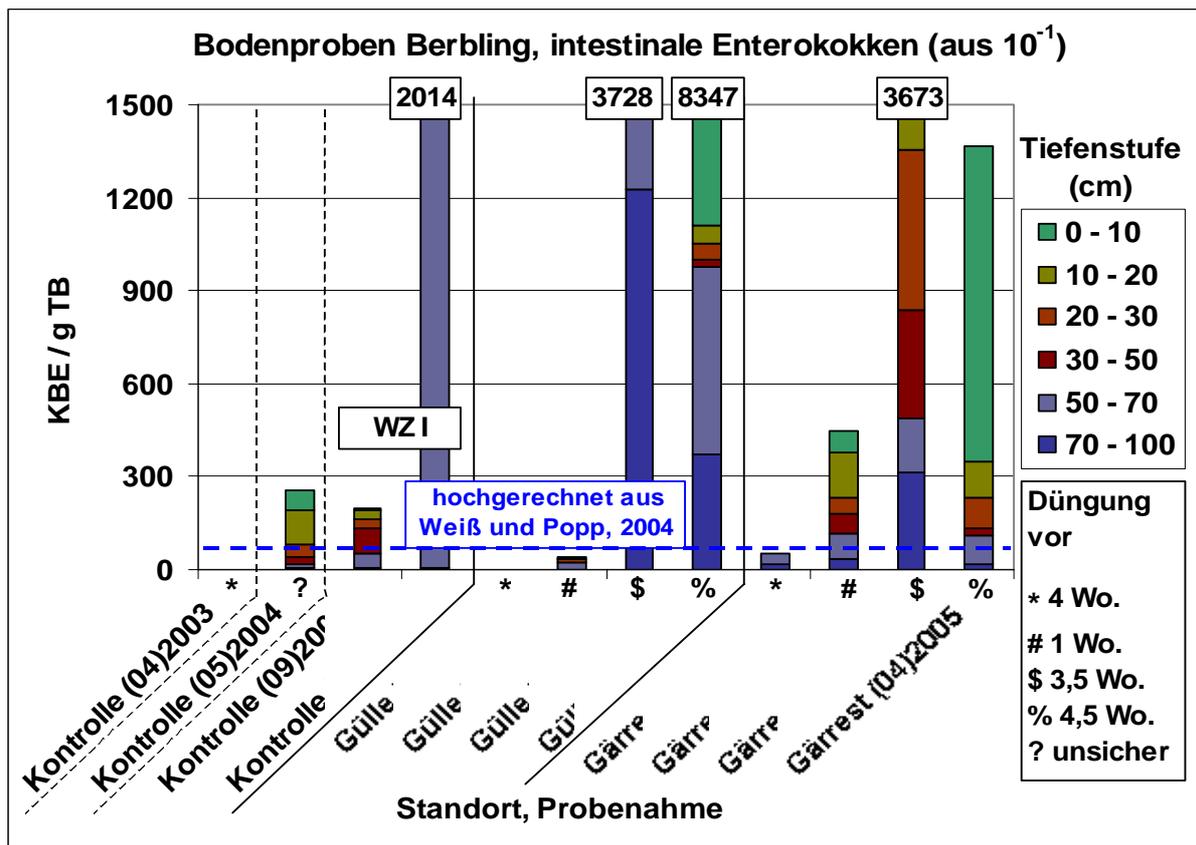
Abb. 36 zeigt die Gehalte an intestinalen Enterokokken im Boden der untersuchten Berblinger Standorte. Die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung sowie die kumulierte Darstellung über die Tiefenstufen sind zu beachten (vgl. 3.2.1).

Besonders auffällig bei den Daten zu den Gehalten der intestinalen Enterokokken im Boden der Berblinger Standorte waren zum einen die vergleichsweise hohen Werte im Herbst 2004 und April 2005, die ziemlich niedrigen Werte für intestinale Enterokokken in Dränwässern ungedüngter Ackerstandorte (WEIß und POPP, 2004; umgerechnet auf 1 g Trockenboden bei Annahme eines mittleren Wassergehalts von 30 %) und die z.T. sehr hohen Gehalte intestinaler Enterokokken noch in 1 m Bodentiefe (Abb. 36).

Die Zunahme bis Versuchsende war vor allem im Gülleplot zu beobachten, allerdings wurde auch für die Kontrolle WZ I eine solche Zunahme beobachtet, und im Gärrest-Plot schienen die Gehalte intestinaler Enterokokken wieder zurückzugehen. Damit war eine Zunahme allenfalls teilweise auf die Düngung zurückzuführen sondern wahrscheinlich stark von einem Witterungs-bedingten und jahreszeitlich-klimatischen Effekt überlagert. Zudem streuten die Wiederholungen für die einzelnen Tiefenstufen teilweise stark, was auf Inhomogenitäten in den Mischproben hinweist. Solche Inhomogenitäten können z.B. auf lokale Kotablagerungen von Bodenbewohnern (z.B. Wühlmäuse, s. 2.2.2) in den Gängen zurückgehen, die bei den Bohrungen unterschiedlich getroffen werden können. Die Wühlmäuse können ihre Gänge



durchaus bis in den Bereich des Lehmbands (s. 2.1.2.1) vorgetrieben haben. Die teilweise hohen Gehalte intestinaler Enterokokken noch in 1 m Bodentiefe könnten dann über eine Weiterverlagerung durch bei Trockenheit gebildete Schwundrisse durch einen Spülstoß verursacht sein. Methodische Verbesserungen sollten insbesondere bei einer effektiveren Homogenisierung der Bodenproben angreifen, zudem sollten zukünftige Ergebnisse besonders für die intestinalen Enterokokken über eine höhere Anzahl der Analyse-Wiederholungen besser statistisch abgesichert werden. Eine Bestätigung der Vermutungen sowie die Verifizierung einer eventuellen Anreicherung kann nur über eine Weiterführung der Untersuchungen erreicht werden.



$10^{-1}$ : Daten aus Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ . WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr. Hochgerechnet aus WEIß und POPP, 2004: berechnet aus Dränwässer-Gehalten ungedüngter Ackerstandorte, die allerdings als Referenz ungeeignet sind (s. Text).

Abbildung 36: Bodenproben Berbling, Gehalte an intestinalen Enterokokken kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Im Mittel über die Probenahmeterminale und Tiefenstufen betragen die intestinalen Enterokokken für den Lysimeterboden 35,4 KBE / g TB, die WZ I-Kontrolle 184,5 KBE / g TB, den Gärrest-Plot 230,7 KBE / g TB und den Gülle-Plot 504,9 KBE / g TB. Hier ist zu bemerken, dass in der Tiefenstufe 50 - 70 cm der WZ I-Kontrolle im April 2005 1953,5 intestinale Enterokokken / g TB festgestellt wurden. Ein Wert in dieser Höhe wurde zu keinem Termin in einer der Tiefenstufen des Lysimeters oder des Gärrest-Plots gemessen, im Gülle Plot aber einmal übertroffen. Die sehr geringen Gehalte intestinaler Enterokokken im Boden des Lysimeters lassen sich dadurch erklären, dass das Lysimeter frei von Wühlmäusen und damit auch von Kotablagerungen war. Das Lysimeter wies auch einen sehr hohen Schluff- und sehr geringen C-Gehalt im Oberboden auf (Tab. 3), was Indiz für relative Nährstoffarmut und schlechte Durchwühlbarkeit ist. Orientierungswerte für eine natürliche Hintergrundbelastung in Böden temperater Klimabereiche finden sich in der Literatur auch für intestinale Enterokokken nicht. Für unbelastete (sub)tropische Süßwasser- bzw. marine



Sedimentböden finden sich stark unterschiedliche Angaben zu intestinalen Enterokokken im Bereich (rechnerisch) 0 - 0,15 / g (PIANETTI et al., 2004), 1 - 100 / g (SKANAVIS and YANKO, 2001) und 10 - 1643 / g (DESMARAIS et al., 2002). Eine Einschätzung kann also am ehesten die Kontrolle WZ I liefern, für die die Ergebnisse allerdings stark streuten (Abb. 36). Den Mittelwerten zufolge (s. oben) unterschied sich allenfalls der Gülle-Plot etwas von den Kontrollen. Dafür, dass dies eine Folge der Gülle-Düngung sein könnte, liefert die beobachtete Zunahme im Beprobungszeitraum (Abb. 36) ein deutliches Argument. Für den Gärrest-Plot war eine Düngungs-bedingte Anreicherung intestinaler Enterokokken den Daten zufolge eher unbedeutend.

Die vergleichsweise niedrigen Werte für intestinale Enterokokken in Dränwässern ungedüngter Ackerstandorte (44 KBE / g TB; Abb. 36; WEIß und POPP, 2004) sind ebenfalls keine guten Referenzen, da in Äckern wegen der Pflügung typischerweise keine Bodentiere wie Wühlmäuse vorkommen (und damit auch keine Kotablagerungen in Gängen). Die natürliche Belastung von Wiesenböden wäre damit stark unterschätzt. Zudem wird in den Dränwässern nur der Oberflächen- bzw. Oberbodenabfluss erfasst. Kotablagerungen von Wühlmäusen können sich aber viel tiefer finden, und die Enterokokken sorbieren relativ stark an die Bodenmatrix. Potentiell ist damit bei der Extrapolation der Gehalte (intestinaler) Enterokokken in Dränwässern auf Gehalte im Boden eine weitere Unterschätzung verbunden.

Wegen der starken Adsorption der (intestinalen) Enterokokken an Ton-Humus-Komplexe ist nicht mit einer Belastung des Grundwasserstroms durch diese Organismen zu rechnen. Hier ist allerdings anzuraten, absichernde Analysen des Grundwassers über Tiefenbohrungen durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die intestinalen Enterokokken im Boden sehr heterogen verteilt und dabei relativ fest an Bodenaggregate sorbiert sind. Dies bedingt, dass die natürliche Belastung in Wiesenböden mit autochthoner Bodenfauna sehr heterogen (lokale Kotablagerungen in Gängen im Boden) sein kann, und damit eine Belastungssituation nur schwer festzustellen ist. Gehalte intestinaler Enterokokken von  $2,0 \times 10^3$  KBE / g TB kommen natürlicherweise (offenbar als hot spots) vor, über das gesamte Profil scheinen mittlere Gehalte von 200 - 500 intestinale Enterokokken / g TB ein erster Anhaltswert für natürliche Hintergrundbelastung zu sein. Wegen der potentiellen Heterogenität ist eine Abschätzung einer Düngungs-bedingten Belastung auf Basis eines solchen Hintergrund-Werts nur im Zusammenhang mit einem gleichartigen Befund für einen anderen mikrobiellen Parameter belastbar. Zur Bestätigung der Befunde sind weiterführende Untersuchungen unerlässlich. Ein Anhalt für eine Anreicherung mit intestinalen Enterokokken im Boden war nach Gülledüngung zu erkennen, nicht aber nach Gärrest-Düngung. Die Tendenzen müssen zur Absicherung weiterverfolgt werden.

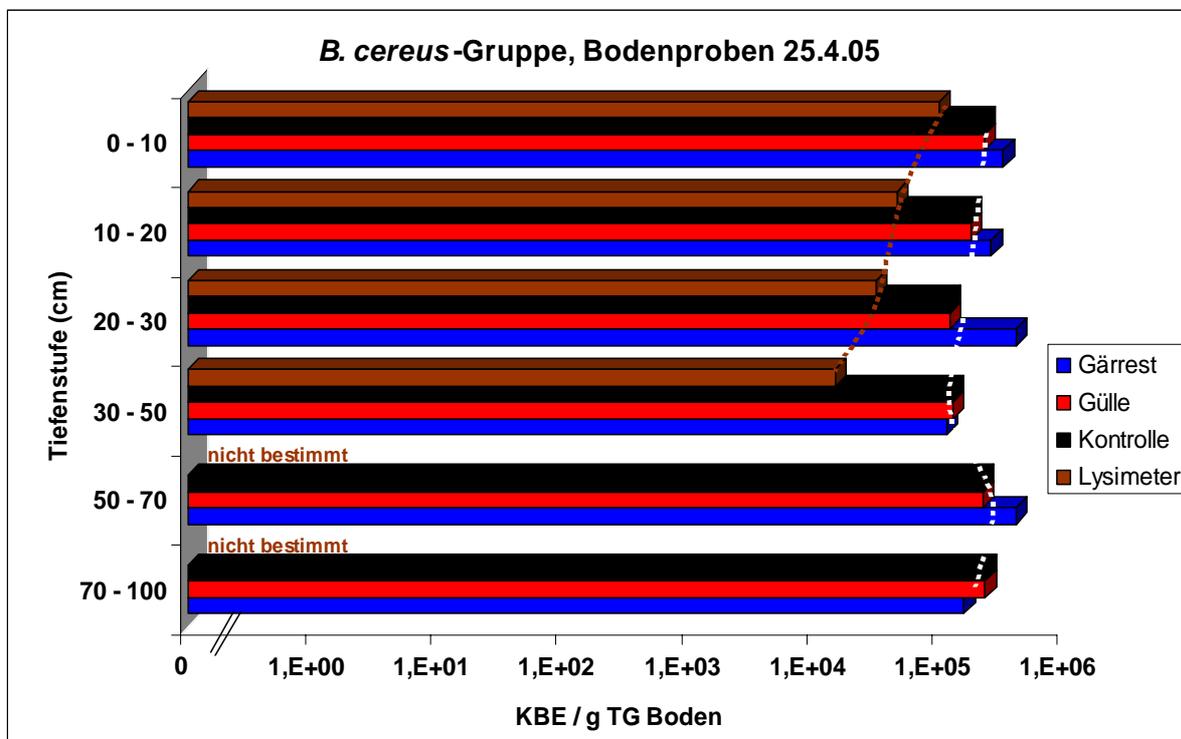
### 3.2.4 *Bacillus-cereus* (Gruppe)

Dieser Parameter wurde 2005 zusätzlich ins Programm aufgenommen, da diese Sporenbildner während des Biogasprozesses nicht oder nur marginal reduziert wurden (s. 3.1.6). Die Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (BcG, s. 2.3.2.5) wurden aus den Verdünnungsreihen der Boden-Suspensionen (s. 2.2.2) für die Berblinger Standorte (s. 2.1.2.1) und das Lysimeter (s. 2.1.2.2) über Kultivierung auf PEMBA (s. 2.3.2.5) bestimmt.

Abb. 37 zeigt die Ergebnisse für die am 25.4.05 beprobten Tiefenstufen. Zu beachten ist, dass das Lysimeter nur bis zur Tiefe 50 cm in 10 cm Abständen beprobt werden konnte. Der Wert für 30 - 50 cm ist daher der Mittelwert der Stufen 30 - 40 und 40 - 50 cm für das Lysimeter. Die Kontrolle wurde dem Boden der Wasserschutzzone I entnommen (s. 2.1.2.1).



Aus Abb. 37 geht hervor, dass weder im Gärrest- noch im Gülleplot eine Anreicherung mit Vertretern der *B. cereus*-Gruppe festgestellt werden konnte. Eine Anreicherung war allerdings auch angesichts des relativ hohen natürlichen Besatzes von Boden mit Vertretern der BcG im Bereich  $10^5$  KBE / g TB (Abb. 37: Kontrolle) eher unwahrscheinlich. *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* sind typische Bodenbewohner und zeichnen sich durch ausgeprägte proteolytische und chitinolytische Aktivität im Boden aus. Damit sind sie stark an der Zersetzung von Insekten und Tier-Rückständen beteiligt. Neben Nährstoffarmut und schlechter Durchwühlbarkeit im Oberboden (s. 0) kann dies erklären, warum im Boden des Lysimeter um 0,5 - 1 log-Stufe geringere Werte als für die Berblinger Standorte erhalten wurden (Abb. 37). Im Lysimeter waren keine größeren Bodentiere zu finden, an deren Zersetzung *Bacillus* spp. proteolytisch direkt beteiligt sind und auch indirekt über chitinolytische Zersetzung Tieranteil-verwertender Insekten und Pilze. Dieser Mangel hat offenbar besonders in größeren Tiefen, in die z.B. Wühlmäuse natürlicherweise vordringen (s. 3.2.3), eine geringere Populationsdichte der BcG im Boden des Lysimeters bewirkt, nicht aber in den Böden der Berblinger Standorte (Abb. 37).



Kontrolle: Boden der Wasserschutzzone I

Abbildung 37: Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe in den Böden der Berblinger Standorte und im Lysimeter-Boden

Eine Erklärungsmöglichkeit für das starke Auftreten der Vertreter der BcG selbst noch in 1 m Bodentiefe der Berblinger Standorte liefert die Präsenz von Wühlmausgängen in Zusammenhang mit wahrscheinlich bei Trockenheit im Sommer auftretenden Schwundrissen im Lehmband (s. 2.1.2.1), über die bei Starkregenereignissen überdauerungsfähige Mikroorganismen (s. 3.2.3, 3.2.5) mit dem Spülstoß in die Tiefe verlagert sein könnten. Während eine Belastung des Grundwassers durch (intestinale) Enterokokken wegen deren starker Adsorption an Bodenpartikel unwahrscheinlich ist (s. 3.2.3), könnten die inerten Sporen der BcG und Clostridien mit dem Massenstrom durchaus bei mangelnder Filtereffizienz der darüberliegenden Bodenschichten in den Grundwasserstrom gelangen. Dabei wird allerdings wegen der extremen Überdauerungsfähigkeit der Sporen kaum zwischen einer (eventuellen) Belastung durch eine (eventuelle) Gärrest-Düngung in WZ II und einer



Güledüngung außerhalb dieses Bereichs unterschieden werden können. In einem solchen Fall sollte die (organische) Düngung generell, also auch im entfernteren Zustrombereich, auf ein Maß reduziert werden, das der Filterkapazität des darüberliegenden Bodens entspricht.

Den Ergebnissen zufolge sind die Daten für den Lysimeterboden nicht zur Definition einer natürlichen Hintergrundbelastung mit Vertretern der *B. cereus*-Gruppe geeignet sondern eher die Daten für die WZ I-Kontrolle. Vergleichbare Daten für andere Standorte konnten in der Literatur nicht gefunden werden, hier ist entsprechende Forschung wünschenswert.

Zusammenfassend konnte aufgrund der vorliegenden Daten keine Düngungs-bedingte Anreicherung im Boden mit Vertretern der *B. cereus*-Gruppe festgestellt werden, weder im Gülle- noch im Gärrest-Plot. Allerdings sollte ein solcher Trend über fortlaufende Untersuchungen bestätigt werden, da die momentane Beurteilung nur auf einer Einzeluntersuchung basiert.

### 3.2.5 *Clostridium perfringens*

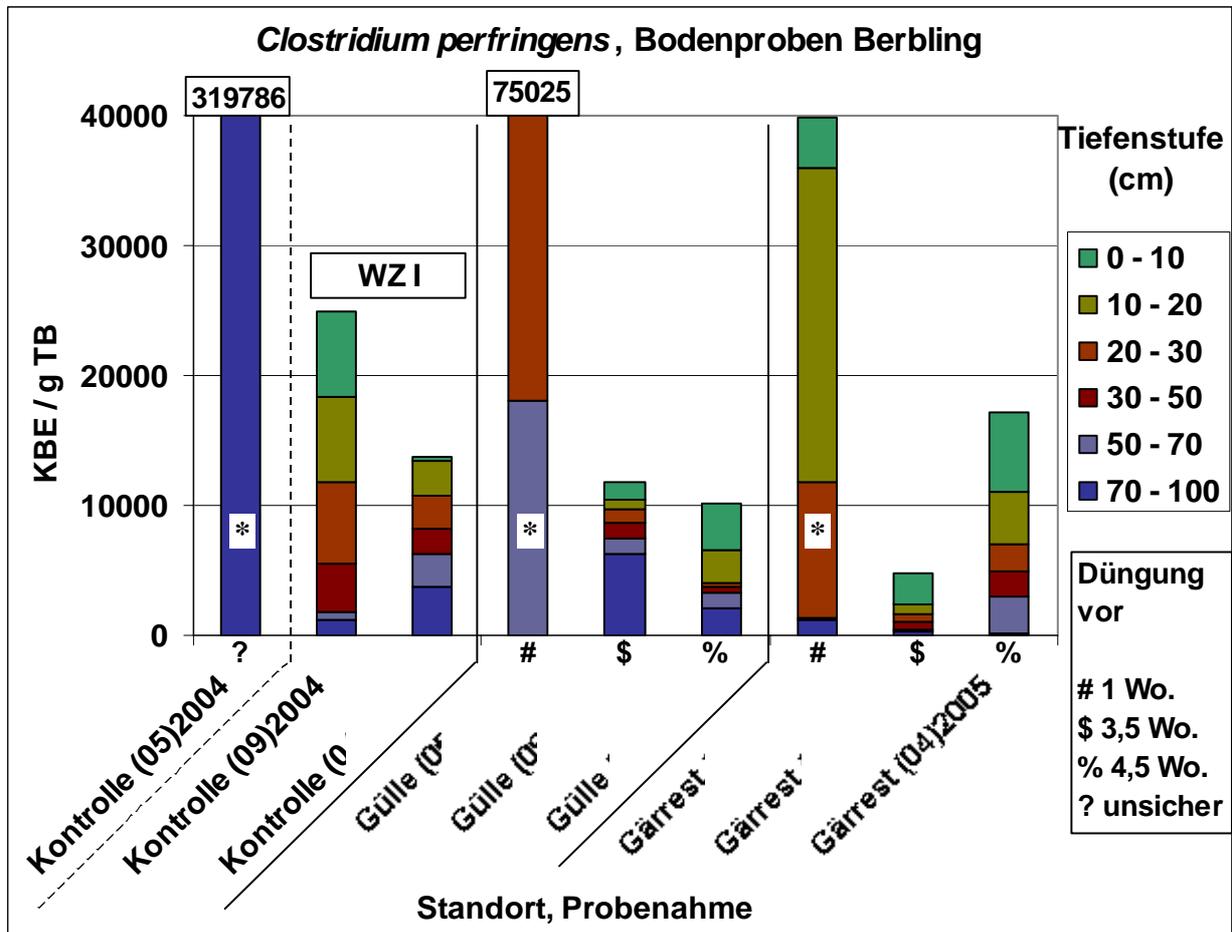
*Clostridium perfringens* wurde ab Mai 2004 zusätzlich mit ins Programm aufgenommen, da diese thermophilen Sporenbildner im Verlauf der Vergärung nicht reduziert wurden (s. 3.1.7). *C. perfringens* wurde 2004 und 2005 für die Berblinger Standorte (s. 2.1.2.1) und 2005 für das Lysimeter (s. 2.1.2.2) sowie die bayerischen Standorte aus dem LfL-Dauerbeobachtungsprogramm (s. 2.1.2.3) über Kultivierung in TSCF-Agar (s. 2.3.2.6) bestimmt. Dabei traten methodische Probleme auf (s. 2.3.2.6), wegen denen die Werte für den Maitermin 2004 wahrscheinlich systematisch um etwa 1 log-Stufe, möglicherweise sogar mehr, überschätzt wurden. Entsprechend sind in Abb. 38 die sehr hohen Werte für alle Standorte zum Maitermin 2004 besonders auffällig und wahrscheinlich aufgrund der Auswertungsprobleme systematisch um etwa 1 log-Stufe überschätzt. Diese Werte werden daher im Folgenden nicht weiter diskutiert. Spätere Vergleiche mit Verdünnungsreihen erhärteten den Verdacht, dass eine wolkige Schwarzfärbung (s. 2.3.2.6) von einer einzelnen Kolonie verursacht sein kann. Um dieses Problem zu vermeiden, sollten möglichst nur Platten mit < 10 Kolonien ausgewertet werden, da bei dieser Anzahl Kolonien die wolkigen Strukturen seltener auftreten. Das geht zwar auf Kosten der statistischen Sicherheit, vermeidet aber systematische Überschätzungen.

Abb. 38 zeigt die Ergebnisse für die Berblinger Standorte. Die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung sowie die kumulierte Darstellung über die Tiefenstufen sind zu beachten (vgl. 3.2.1). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist die o.g. genannte vermutete Überschätzung für den Maitermin 2004 (\* in Abb. 38) zu berücksichtigen.

Eine Tendenz zu einer Zu- oder Abnahme von *C. perfringens* im Versuchszeitraum konnte für keinen der untersuchten Standorte festgestellt werden. Dabei ist allerdings die Kürze des Untersuchungszeitraums zu bedenken. Hier ist eine Weiterverfolgung der Untersuchung zur Absicherung bzw. Feststellung von Trends unbedingt erforderlich. Anhand der vorliegenden Daten liegt z.Zt. kein Anhalt dafür vor, dass sich *C. perfringens* auf den Berblinger Standorten bei vergleichbarer Düngung im Boden anreicherte. Weder im Gülle- noch im Gärrestplot lagen die *C. perfringens*-Gehalte deutlich höher als im Boden der WZ I (Abb. 38). Unterschiedliche *C. perfringens* Gehalte im Boden nach Gülle- bzw. Gärrestdüngung konnten nicht erwartet werden, da *C. perfringens* in beiden Düngemitteln in gleichen Anteilen vorhanden war (s. 3.1.7). In anderen Böden ließ sich eine Anreicherung mit *C. perfringens*-Sporen aufgrund anthropogener Tätigkeiten (z.B. Klärschlamm-Ablagerung) feststellen (MATCHES et al., 1974; HILL et al., 1996; SKANAVIS and YANKO, 2002), und auch für die bayerischen Grünlandböden ergaben sich Anhaltspunkte für eine leichte Anreicherung mit *C. perfringens* im Boden infolge Gülle- bzw. Festmistdüngung (s. unten, Abb. 39). DESMARAIS et al. (2002) konnten zwar keine Wiederverkeimung durch *C. perfringens* in Sedimentböden



feststellen, *C. perfringens* kann sich aber infolge seiner saprophytischen Lebensweise mit wichtiger Mineralisationsfunktion im C- und N-Zyklus in Gegenwart geeigneten Substrats wie z.B. Tierkörperteilen (DENT et al., 2004) oder in offenen Wunden unter anaeroben (thermophilen) Bedingungen explosionsartig vermehren.



WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr. \*: Wahrscheinlich systematische Überschätzung um ca 1 log-Stufe (s. Text).

Abbildung 38: Bodenproben Berbling, Gehalte an *Clostridium perfringens* kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Diese ökologischen Präferenzen können der Grund sein, warum im Mittel über die Beprobungstermine und Tiefenstufen im Gärrest- (1823 KBE / g TB) und Gülleplot (1835 KBE / g TB) sowie im Boden der WZ I (3227 KBE / g TB) deutlich höhere *C. perfringens*-Gehalte gemessen wurden als im Lysimeter (197 KBE / g TB). Der Lysimeterboden beherbergte keine größeren Bodentiere (s. 2.1.2.2), war im Oberboden eher nährstoffarm und schlecht durchwühlbar (Tab. 3), und bot wahrscheinlich daher für *C. perfringens* weniger günstige Vermehrungsmöglichkeiten. Ähnliches wurde für die (allerdings aeroben) intestinalen Enterokokken (s. 3.2.3) und die Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (s. 3.2.4) diskutiert. Das Lysimeter kann damit keine gute Referenz für natürliche Hintergrundbelastung darstellen. Diese läge den eigenen (vorläufigen) Befunden nach im Bereich 1800 - 3300 KBE *C. perfringens* / g TB (s. oben). Für *C. perfringens* in unbelasteten (sub)tropischen Süßwasser- bzw. marinen Sedimentböden geben HILL et al. (1996) 40 - 200 KBE / g, DESMARAIS et al. (2002) 5 - 500 KBE / g und SKANAVIS and YANKO (2001) 10 - 1000 KBE / g an. Sehr unterschiedlich wird von den Autoren die Frage nach dem Beginn einer Kontamination beantwortet, die Angaben schwanken zwischen  $6 \times 10^2$  und  $10^8$  KBE *C. perfringens* / g. Angaben zu *C. perfringens* in Böden, die den Berblinger Standorten



vergleichbar sind, finden sich in der Literatur nicht. Hier besteht akuter Forschungsbedarf. Ein erster Ansatz in dieser Richtung wurde für ausgewählte bayerische Grünlandstandorte bereits in dieser Studie begonnen (s. unten). Um diese Grundlagen zur Definition einer natürlichen Hintergrundbelastung mit *C. perfringens* zu erarbeiten und einen eventuellen Aufschlag mit *C. perfringens* durch Düngung mit Gülle oder Gärrest festzustellen, sollten die hier begonnenen Untersuchungen unbedingt weitergeführt werden.

*C. perfringens* fand sich in z.T. erheblichen Konzentrationen selbst noch in 1 m Tiefe im Boden der Berblinger Standorte (Abb. 38), während im Lysimeterboden an der Sohle (40 - 50 cm Bodentiefe) nur noch 23 KBE *C. perfringens* / g TB festgestellt wurden. Ähnlich wie für die anderen untersuchten mikrobiellen Parameter diskutiert (s. 3.2.1; 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4) ermöglichten wahrscheinlich Wühlmausgänge in den Berblinger Böden (nicht im Lysimeterboden vorhanden) und ggf. Schwundrisse im Lehmband (s. 2.1.2.1) einen schnellen Transport in die Tiefe. Möglich ist auch ein lateraler Zustrom von *C. perfringens* von benachbarten Standorten, da der Organismus extrem persistent in der Umwelt ist (s. 3.1.7). Sehr wünschenswert wäre es, hier über Tiefenbohrungen *C. perfringens* im Grundwasser zu analysieren.

Bei der Frage einer eventuellen Kontamination des Grundwassers durch (pathogene) bakterielle Sporenbildner (insbesondere der *B. cereus*-Gruppe sowie toxische Clostridien) durch Aufbringen von Gärrest ist auch deren extreme Überdauerungsfähigkeit zu bedenken. Hier kann kaum zwischen einer (eventuellen) Kontamination durch Sporen im Zustrombereich in der WZ II und der WZ III oder entfernteren Bereichen unterschieden werden (s. 3.2.4). In einem solchen Falle wäre generell die organische Düngung im Zustrombereich zu reduzieren (s. 3.2.4).

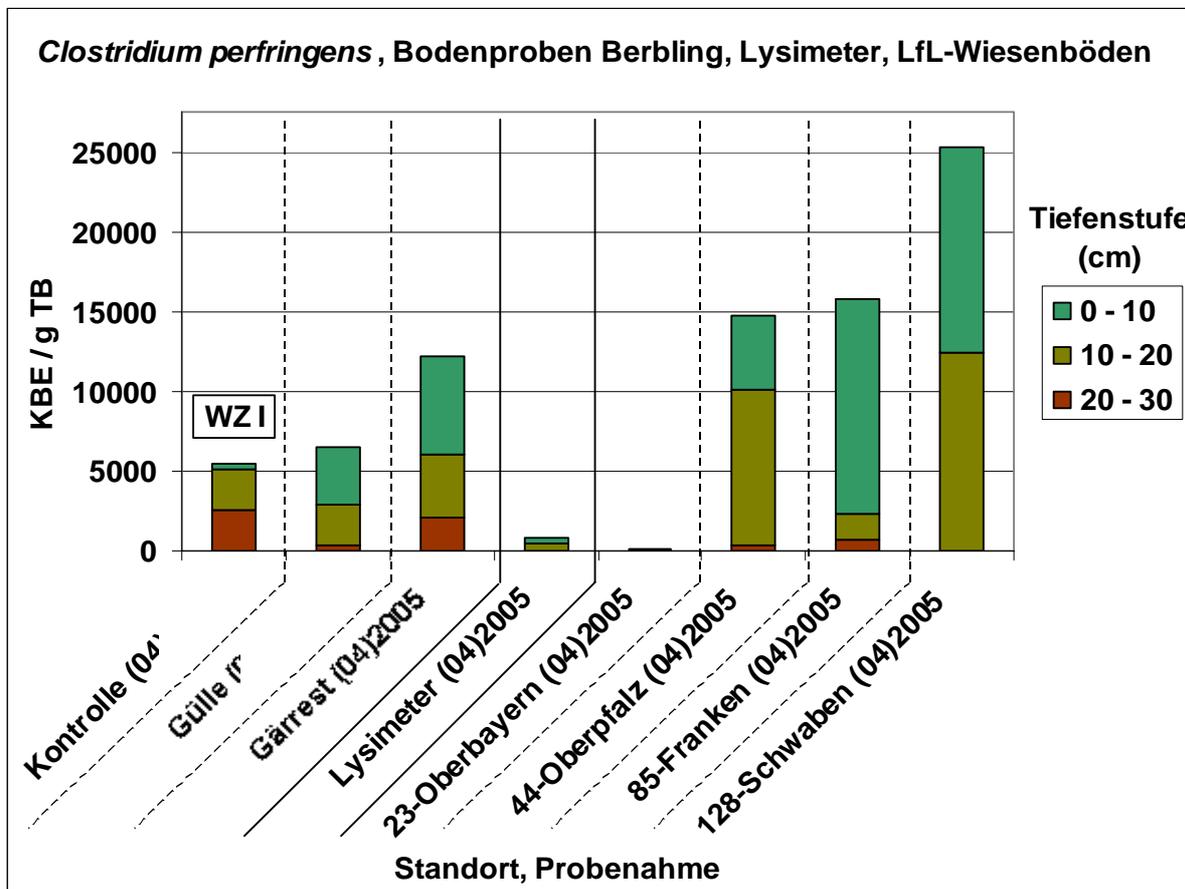
Um die natürliche Hintergrundbelastung mit *C. perfringens* näher zu charakterisieren, wurden ausgewählte bayerische Grünlandstandorte aus dem Dauerbeobachtungsprogramm der LfL (s. 2.1.2.3) auf *C. perfringens* analysiert. Die Proben wurden allerdings im Gegensatz zu den Proben vom Gülle- und Gärrestplot aus Berbling noch vor der ersten Güllendüngung genommen, und die Böden nur bis 30 cm Tiefe in 10 cm-Fraktionen (3 Tiefenstufen) beprobt (s. 2.1.2.3). Die entsprechenden Vergleiche für den Probenahmetermin April 2005 sind in Abb. 39 dargestellt.

Abb. 39 zeigt eine starke Variabilität in den *C. perfringens*-Gehalten in den Böden der untersuchten Wiesenstandorte. Im Mittel über die Tiefenstufen wurden für den Standort Grünland 1 50 KBE *C. perfringens* / g TB gemessen, was sogar noch unter den entsprechenden Werten für das Lysimeter lag (s. oben). Vermutlich bedingte der auf Standort Grünland 1 nur unregelmäßige Tierbesatz (Stall-/Wanderschafhaltung, s. 2.1.2.3) wesentlich die dort sehr geringen *C. perfringens*-Gehalte. Die zumindest im Oberboden sehr geringen C- und hohen Schluff-Gehalte (Tab. 3) sind Indiz für relative Nährstoffarmut und schlechte Bedingungen für wühlende Bodentiere (s. 3.2.3). Dies könnte auch zu den geringen *C. perfringens*-Gehalten beigetragen haben.

Die Grünlandstandorte 2, 3 und 4 wiesen im Oberboden relativ hohe C- und höhere Sand-Gehalte als Grünlandstandort 1 und Lysimeter auf (Tab. 3), was auf nährstoffreichere Bedingungen und bessere Duchwühlbarkeit und damit intensiveres Bodenleben und bessere Vermehrungsmöglichkeiten (u.a.) für *C. perfringens* hinweist. Die Grünlandstandorte 2 und 3 wiesen im Mittel 1,5- bis 3-fach höhere *C. perfringens*-Gehalte als die Berblinger Standorte (incl. WZ I) auf, wurden aber vor der Probenahme letztmalig im Herbst des Vorjahrs mit Gülle gedüngt (s. 2.1.2.3). Ob dies erste Anzeichen einer Anreicherung mit bakteriellen Sporen infolge Gülle-Düngung im Laufe der Jahre sind, sollte Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung sein. Für den Festmist-gedüngten Standort Grünland 4 (s. 2.1.2.3) wurde der höchste *C. perfringens*-Gehalt (im Mittel 8439 KBE / g TB) in dieser



Studie gemessen. Möglicherweise ist dies auch auf Anreicherung mit Sporen zurückzuführen, die den Daten zufolge nach Festmistdüngung besonders ausgeprägt sein könnte. Allerdings ist eine gesicherte Einschätzung, ob wiederholte Gülle- oder Festmistdüngung eine Belastungssituation auslösen, wegen des Fehlens der notwendigen Referenzen (s. oben) z.Zt. noch nicht möglich. Es wird daher angeraten, diese Studien weiterzuführen.



WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr bzw. LfL-Code (Monat)Jahr.

Abbildung 39: Bodenproben Berbling, Lysimeter, Bayerische Wiesenböden, Gehalte an *Clostridium perfringens* kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Aus den z.Zt. vorliegenden Daten läßt sich der vorläufige Schluss ziehen, dass *C. perfringens* bei der Biogasproduktion aus Rindergülle (sowie wohl auch aus nachwachsenden Rohstoffen) eine untergeordnete Rolle spielt, dass er sich also während des Prozesses offenbar nicht wesentlich vermehrt (s. 3.1.7) und sich anscheinend auch nicht über Düngung mit Gärrest im Boden anreichert. Allerdings sollte dies über längerfristige Messreihen im Gärrest und im Boden nach Ausbringung des Gärrests dokumentiert werden, da eine Kontamination des Grundwassers oder von Badegewässern mit diesem Organismus vermieden werden sollte. Ein anderes Bild ergibt sich möglicherweise bei Verwertung anderer tierischer Produkte für die Biogasproduktion (z.B. Vogelkot), hier müssten entsprechende Untersuchungen durchgeführt werden. Bis zur endgültigen Evaluierung der Unbedenklichkeit könnten damit Richtlinien für den Gärrest von  $\leq 3000$  *C. perfringens* / mL geltend gemacht werden. Im Boden sollte die natürliche Hintergrundbelastung nicht überschritten werden, für den Berblinger Standorten vergleichbare Böden wäre das im Mittel über die Tiefenstufen  $\leq 3300$  *C. perfringens* / g TB.



## Übergreifende Diskussion

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um wissenschaftliche Grundlagen zur Beantwortung von 2 zentralen Fragen zu liefern:

- 1) ist die 3-stufig mesophil-thermophil-mesophil betriebene Berblinger Pilot-Biogasanlage geeignet, Rindergülle in einen hygienisch verbesserten Zustand zu bringen, der
  - a) im Falle eines hygienisch einwandfreien und gesicherten Zustands eine Ausbringung als Wirtschaftsdünger in sensiblen Gebieten wie (z.B. bestimmten Bereichen mit besonderen Merkmalen) der Wasserschutzzone II ermöglichen könnte?
  - b) bei Ausbringung wesentlich dazu beitragen kann, die diffusen Belastungen von sensiblen Oberflächen- (z.B. Bade-) Gewässern und Trinkwassereinzugsgebieten (z.B. im Karst, weitere Schutzzone) mit potentiell pathogenen Keimen stark zu reduzieren und damit kommende Richtlinien zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie bereits im Vorgriff zu erfüllen?
- 2) gibt es Anhaltspunkte für eine Rückverkeimung im Endlager oder im Boden, oder erfolgt ein unnatürlich hoher Aufschlag auf den Boden nach Ausbringung des Gärrests?

### **4.1 Mikrobiologische Methodik**

Zur Beantwortung der bei 4 genannten zentralen Fragen wurden klassische (selektive) Kultivierung, Infektiositätstests für Kryptosporidien (neben anderen, weniger geeigneten Techniken) und quantitative Real-Time PCR (qPCR) mit direkter Extraktion von DNA aus den Proben (oder in Einzelfällen nach Voranreicherung) eingesetzt.

Es zeigte sich, dass qPCR mit direkter DNA-Extraktion zwar eine verlässliche Quantifizierung der insgesamt vorhandenen Ziel-DNA in den Proben erlaubt, aber nach Abtötungsmaßnahmen die vitale Fraktion der Ziel-Organismen massiv um die tote Fraktion überschätzt, deren DNA offenbar nur sehr langsam in den Fermentern und im Endlager abgebaut wird. Dagegen eignete sich qPCR nach (selektiver) Voranreicherung hervorragend, über klassische (selektive) Kultivierung sonst nur schwierig und aufwändig zu bestimmende Pathogene über einen MPN-Ansatz in Proben zu quantifizieren.

Infektiositätstests (mit humaner HCT-8-Zelllinie) waren hervorragend geeignet, infektiöse Kryptosporidien-Oozysten in den Proben zu quantifizieren und übertrafen herkömmlich verwendete Techniken (Membranintegrität, Exzystierung) hinsichtlich Verlässlichkeit und Spanne des Analysebereichs (Inaktivierung > 5 log-Stufen) bei weitem.

Die klassische (selektive) Kultivierung erwies sich als zuverlässig, auch wenn sich einzelne Methoden als verbesserungsbedürftig herausstellten, und nach den Abtötungsmaßnahmen eine Unterschätzung um die Fraktion sublethal geschädigter Zellen erkennbar war. Diese konnte zwar > 1 log-Stufe betragen, ist aber nach momentanem Kenntnisstand als eher unerheblich einzustufen.

### **4.2 Hygienisierungsleistung der Berblinger Biogasanlage**

Die Überprüfung der Hygienisierungsleistung der Berblinger Biogasanlage sollte, soweit möglich, anhand der autochthonen Pathogenen und Indikatororganismen erfolgen, da Ergebnisse für zugesetzte Laborstämme für diesen Zweck angezweifelt werden könnten. Da dabei die Zielorganismen im Ausgangssubstrat (Rindergülle von gesundem Milchvieh) teilweise nicht in ausreichenden Ausgangskonzentrationen vorhanden waren, ließen sich die angestrebten Reduktionsraten (> 5 log-Stufen) für diese Organismen zumeist nicht dokumentieren. Es konnte aber die Freiheit des Produkts (Gärrest) von diesen Organismen



und eine sehr effiziente Reduktion der Gehalte der untersuchten Populationen festgestellt werden (Ausnahme: bakterielle Sporenbildner).

Bei gesicherten 55°C im thermophilen F2 der Berblinger Biogasanlage (sowie in der maßstäblich 1:6 verkleinerten Modellanlage) wurde in den folgenden Kompartimenten bezüglich Fäkalcoliformer und Coliformer Badegewässerqualität festgestellt. Die intestinalen Enterokokken wurden (infolge geringer Ausgangsgehalte in der Gülle nur) um 2,5 – 3,3 log-Stufen reduziert. Dabei standen mittlerweile Ergebnisse zur Verfügung, die eine Reduktion auch der intestinalen Enterokokken um > 5 log-Stufen durch gesicherte 55°C bei gesicherter Verweilzeit von (festgestellten) 8,5 h im thermophilen Berblinger F2 nahelegen, wenn die entsprechende Populationsgröße in der Rindergülle vorhanden gewesen wäre. Mit der Reduktion auf Gehalte zwischen 10 - 100 intestinale Enterokokken / g FG wurde die Marke der Badegewässerrichtlinie 2002/0254(COD) nicht ganz erreicht, die Werte lagen aber etwa im Bereich der in Dränwässern aus ungedüngten Ackerstandorten festgestellten (WEIB und POPP, 2004) natürlichen Hintergrundbelastung. Ergebnisse aus Experimenten mit Diffusions-Keimträgern in einer Modellanlage dokumentierten eine Reduktion infektiöser Kryptosporidien-Oozysten um > 5 log-Stufen bereits nach 4 h 55°C in Rindergülle. Die mesophile Behandlung allein war dazu keinesfalls in der Lage. Für die Sporenbildner (*Bacillus cereus*-Gruppe und *Clostridium perfringens*) blieb die Populationsgröße praktisch unverändert, eine Reduktion konnte aber wegen ihrer extremen Tenazität auch nicht erwartet werden. Eine nennenswerte Anreicherung mit diesen Pathogenen in der Biogasanlage (incl. Endlager) fand nicht statt.

Da die intestinalen Enterokokken eine höhere Tenazität aufweisen als alle anderen untersuchten Bakterien(gruppen) (Ausnahme: bakterielle Sporenbildner), Viren und Parasiten, eignen sich die intestinalen Enterokokken als idealer Indikator, die Hygienisierungseffizienz während der (thermophilen) Biogasproduktion zu dokumentieren. Hier wird der Vorschlag gemacht, die Prozesseffizienz über die Reduktion intestinaler Enterokokken um > 4 log-Stufen innerhalb der gegebenen minimalen gesicherten Verweilzeit in Prozesskontrollen (ggf. in Keimträgern) nachzuweisen. Um einen hygienisch einwandfreien Status des Gärrests auszuweisen, sollte der Gehalt intestinaler Enterokokken in einer Produktkontrolle (im Endlager, kurz vor Ausbringung) unter 150 KBE / mL liegen. In Grenzfällen sollte die Rückverkeimung über eine Bestimmung coliformer (und fäkalcoliformer) Keime kurz vor Ausbringung im Endlager überprüft werden, da diese am empfindlichsten mit Rückverkeimung auf Störungen im Prozess reagierten. Die Coliformen beinhalten eine Reihe thermotoleranter potentiell enteropathogener Bakterien, die bei (unentdeckten) Prozessstörungen wieder aufkeimen könnten. Coliforme sollten dabei 150 MPN / mL und Fäkalcoliforme 5 MPN / mL bei (konventioneller) 24 h Bebrütung bei 37°C nicht überschreiten.

Ein Effekt der in der Berblinger Fermenterkette vor- und nachgeschalteten mesophilen Stufen auf die Hygienisierungsleistung konnte nicht festgestellt werden. Die thermophile Stufe allein genügte (bei gesicherten 55°C) den Daten zufolge, die für die Gesamtanlage beobachtete Hygienisierungsleistung zu erreichen, keinesfalls aber eine mesophile Behandlung allein. Den Ergebnissen zufolge ist die konsequente Einhaltung einer Prozesstemperatur von 55°C über eine gesicherte Verweilzeit von mindestens 4 h (besser 8 - 9 h) unbedingt erforderlich. Interessanterweise wird eine 4 h Behandlung bei 55°C als einer Pasteurisierung (30min, 70°C) adäquat angesehen (GODFREE and FARRELL, 2005), und nach CARRINGTON (2001) ist ein derart behandelter Klärschlamm Pathogen-frei. Die DANISH NOTIFICATION NO. 823 (1996) bezeichnet sogar eine minimale garantierte Verweildauer von 6 h bei 55°C in einem (thermophilen) Fermenter als äquivalent einer einstündigen Behandlung bei 70°C (O'REILLY and COLLERAN, 2004).



Wenn möglichst optimale Hygienisierungsergebnisse erzielt werden sollen, auch im Hinblick auf eine mögliche Auswaschung von nicht abgetöteten Mikroorganismen in das Grundwasser, müssen an Technik und Umgang mit dem Düngegut zusätzliche Ansprüche gestellt werden. Die Temperatur sollte on-line im Substrat des thermophilen Fermenters dokumentiert werden. Das Prinzip der Schwarz-Weiß-Trennung ist unbedingt zu beachten, nach Durchgang durch den thermophilen Fermenter sollte keine Kontaminationsmöglichkeit des Gärrests von außen bestehen. Hier wird auch angeraten, nachgeschaltete Lager/Fermenter/Ausbringbehälter zur Dokumentation regelmäßig auf einwandfreien hygienischen Zustand (z.B. auf Coliforme/Fäkalcoliforme) zu überprüfen und ggf. zu reinigen.

### 4.3 Effekte der Gärrest-Ausbringung im Boden

Im Rahmen des Gemeinschaftsprojekts wurde über dem Boden mit Gärrest ein gegenüber Gülle nur leicht höherer  $\text{NH}_3$ -Partialdruck festgestellt, der nicht als Geruchsbelästigung empfunden wurde (HENKELMANN, 2006). Anderen Ergebnissen zufolge ist die  $\text{NH}_3$ -Ausgasung aus Gärrest oft nicht stärker als aus Gülle (EFFENBERGER et al., 2006). Die C-Bilanz ist bei Gärrest- im Vergleich zu Gülledüngung günstig, da die direkte Emission des klimarelevanten  $\text{CO}_2$  (zunächst) um den Betrag des Methans reduziert ist, und der Gärrest wohl daher ein zur Düngung etwas günstigeres, engeres C/N-Verhältnis aufwies (Gülle: 17, Gärrest: 14, EFFENBERGER et al., 2006). Im Boden unter Gülle und Gärrest wanderten Bakterien und  $\text{Li}^+$ -Tracer gleichschnell (HENKELMANN, 2006), dabei dringt der Gärrest infolge geringerer Viskosität (höherer Wasseranteil) schneller als Gülle in den Boden ein und ist auch schneller pflanzenverfügbar. Bei sachgemäßer Düngung des Gärrests wurden durch Herrn Schweiger eher Vorteile beim Pflanzenwuchs festgestellt, allerdings kann unsachgemäße Düngung zu Pflanzenschäden führen (s. 2.1.2.1). Bezüglich Nährstoffausbringung und Düngemittel empfiehlt PERETZKI (2006, in EFFENBERGER et al., 2006) Gärrest und Gülle gleich zu behandeln. In den Bereichen Pflanzenversorgung und Emissionen bieten sich demnach bei Gärrestdüngung (außer der etwas höheren  $\text{NH}_3$ -Ausgasung) eher Vorteile, insbesondere wenn die mit der Produktion regenerativer Energieträger (i.e. Biogas) verbundene Einsparung fossiler Energieträger bei der Vergärung und die bessere hygienische Situation (s.u.) betrachtet wird.

Um Effekte einer Gärrest-Ausbringung im Boden zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich bakterielle Parameter geprüft (Viren und Parasiten werden im Boden nicht wiederverkeimen). Nicht geprüft wurden Effekte der veränderten Nährstoffzusammensetzung (relativ hoher  $\text{NH}_4^+$ -Anteil im Gärrest) auf die  $\text{NO}_3^-$ -Fracht und eine mögliche Gefährdung des Grundwassers durch eventuell mitausgebrachte Xenobiotika wie Arzneimittelrückstände und Antibiotika. Bei der Frage einer eventuell erhöhten Nitratbelastung des Grundwassers über Nitrifizierung nach Gärrest-Düngung ist zu bedenken, dass der Gärrest empfehlenerweise stärker verdünnt als Gülle (und mit Schleppschlauch/-schuh) ausgebracht werden sollte, um Verätzungen der Pflanzen zu vermeiden. Pflanzen nehmen auch vorzugsweise  $\text{NH}_4^+$  auf. Wegen des relativ großen  $\text{NH}_4^+$ -Anteils (um 21,6 % mehr  $\text{NH}_4$ -N als in Gülle, EFFENBERGER et al., 2006; Nitrat sollte in Gärrest primär nicht enthalten sein) sollte dennoch über Tiefenbohrungen überprüft werden, ob sich infolge Gärrest-Düngung eine relevante  $\text{NO}_3^-$ -Anreicherung im Grundwasserstrom ergibt. Es muss auch angenommen werden, dass Arzneimittelrückstände und Antibiotika während der thermophilen Behandlung abgebaut werden, allerdings ist die tatsächliche Belastung des Bodens und Grundwassers durch Gärrestaushbringung unbekannt. Hier wird eine wissenschaftliche Untersuchung stark angeraten.

Bei der Diskussion einer eventuellen Düngungs-bedingten Anreicherung mit Bakterien im Boden ist die Kürze der Untersuchungsdauer und die ausgeprägte zeit-/räumliche Heterogenität des Bodens und die entsprechende Variabilität der Ergebnisse zu bedenken.



Hier ist keine abschließende Bewertung möglich, wohl aber zeichneten sich teilweise Tendenzen ab, die in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden müssen.

Eine nennenswerte Anreicherung Fäkalcoliformer konnte, wahrscheinlich wegen schnellem Abbaus im Boden, weder nach Gärrest- noch nach Gülledüngung festgestellt werden. Den Befunden für die WZ I zufolge scheinen auch temperate Böden natürlicherweise mit etwa 2 Fäkalcoliformen / g TB belastet sein zu können. Eine Belastung mit Coliformen, die natürlicherweise mit etwa 5 – 10 MPN / g TB auftraten, konnte ebenfalls nicht eindeutig festgestellt werden, allenfalls ein leichter Aufschlag im Gülleplot. Kein Aufschlag konnte ebenfalls für die sporenbildenden Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (*BcG*) und für *C. perfringens* festgestellt werden, hier schienen die geringeren Gehalte im Lysimeterboden eher auf den dort fehlenden Besatz mit Bodentieren und/oder Nährstoffarmut zurückzugehen. Die Populationen beider Parameter schienen aber im Boden eher stabil und nur in Ausnahmesituationen (Tierkadaver, Ablagerung von Faeces) deutlich erhöht zu sein. Für den Gülleplot wurden im Mittel deutlich und für den Gärrestplot geringfügig höhere Gehalte an intestinalen Enterokokken gegenüber der WZ I-Kontrolle erhalten, allerdings war auch hier kein klarer Trend erkennbar. Die Differenzen waren wahrscheinlich überlagert durch Effekte heterogener Verteilung von Bodentierkot im Boden und starker Adsorption der intestinalen Enterokokken an die Bodenmatrix, die hohe Variabilität der Ergebnisse bewirkten.

Während die Fäkalcoliformen und Coliformen als unkritisch angesehen werden, sollte eine eventuelle Anreicherung intestinaler Enterokokken und der Sporenbildner im Boden über Fortsetzung der Studien weiterverfolgt werden, um ggf. rechtzeitig eingreifen zu können. In diesem Zusammenhang sind auch die Ursachen der für alle Parameter beobachteten relativ hohen Gehalte noch in 1 m Bodentiefe abzuklären. Sollten hier Kurzschlüsse zum Grundwasser über die Wühlmausgänge und weiter über eventuelle Schwundrissbildung bei Trockenheit entstehen, könnten bei Starkregen mit dem Spülstoß unerwünschte Keime in den Grundwasserstrom gelangen. Im Falle von Gärrestdüngung sollte eine eventuelle Belastung des Grundwasserstroms mit den Sporenbildnern untersucht werden, da diese während des Biogasprozesses nicht reduziert wurden. Es ist anzuraten, entsprechende Untersuchungen mit Hilfe von Tiefenbohrungen vorzunehmen. Um einer Unfallsituation vorzubeugen, wird angeraten, im Falle einer vorgesehenen Ausbringung von Gärrest in sensiblen Gebieten (s. 1.1, 4) und gleichzeitigem Verdacht einer Kontamination des Gärguts (z.B. mit Kot von Fleischfressern) (s. 3.1.7) auch *C. perfringens* regelmäßig im Gärrest (bzw. Gärgut) zu untersuchen (aerobe *BcG*-Vertreter sollten während des anaeroben Biogasprozesses nicht zunehmen). Dabei sollte *C. perfringens* ein Niveau von  $3 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  KBE / mL (gegenwärtiger Kenntnisstand) nicht überschreiten.

## 4.4 Fazit

Sauberes Trinkwasser ist sicher eines unserer wertvollsten Güter - und das muss auch so bleiben. Mit der Ausweitung der Wasserschutzgebiete sind allerdings für die betroffenen Landwirte (besonders mit Viehhaltung Entsorgungs-) Probleme verbunden, die über intelligente und umweltfreundliche Technologien wie der Biogasproduktion gelöst werden könnten. Der Einsatz der Biogastechnologie kann auch eine Belastungsverminderung von Badegewässern durch diffuse landwirtschaftliche Einträge bewirken. Ist vorgesehen, Gärrest aus der Vergärung von Gülle in sensiblen Bereichen, in denen der Eintrag von Krankheitserregern in das Grundwasser oder in andere Gewässer verhindert werden muss, als Dünger auszubringen, muss die effiziente Hygienisierung des Substrats über Prozess- und Produktkontrollen als zentraler Punkt dokumentiert werden, um den Grundwasserstrom nicht mit potentiell pathogenen Keimen zu infizieren und den Bodenfilter nicht über das natürliche Hintergrund-Niveau hinaus zu belasten.



Die vorliegende Studie bestätigte, dass die Berblinger Biogasanlage bei optimaler Prozessführung (gesicherte 55°C im thermophilen Fermenter bei minimaler gesicherter Verweilzeit von 8 - 9 h) in der Lage war, potentiell pathogene Keime (Bakterien, Parasiten, Viren) in Rindergülle in einem Maß abzutöten, dass der Gärrest als in hygienischer Qualität sehr stark verbessert einzustufen war. Nicht reduziert wurden allerdings bakterielle Sporenbildner (*Bacillus cereus*-Gruppe, *Clostridium perfringens* - sowie vsl. ähnlich potentiell pathogene Sporenbildner mit ähnlicher Tenazität wie z.B. *C. botulinum*, *C. tetani*). Es wurde zwar innerhalb des kurzen Beobachtungszeitraums kein Anhalt für deren Anreicherung im Boden der Berblinger Standorte gefunden, es wird allerdings angeraten, dies in einer längerfristigen Studie zu bestätigen, sowie die Möglichkeit eines Kurzschlusses in den Grundwasserstrom, eine Anreicherung mit Xenobiotika (v.a. Arzneimittelrückstände, Antibiotika, Schwermetalle) und die Nitrifizierung im Boden nach Gärrest-Ausbringung mit Verlagerung von  $\text{NO}_3^-$  in den Grundwasserstrom zu untersuchen. In diese Studie sollten auch intestinale Enterokokken einbezogen werden.

Wo dies in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten (noch) zulässig ist, z.B. in der weiteren Schutzzone im Karst und im Einzugsgebiet von Badegewässern, ist daher eine Ausbringung von Gärresten statt unbehandelter Wirtschaftsdünger sehr zu begrüßen. Für möglichst optimale Hygienisierungsergebnisse, auch im Hinblick auf eine mögliche Auswaschung von nicht abgetöteten Mikroorganismen in das Grundwasser, sollen insbesondere folgende Prüfkriterien beachtet werden:

#### A: Standortprüfung

- Die hydrogeologische Situation sollte einen direkten Kurzschluss zum Grundwasserstrom ausschließen:
  - keine Gärrestausbringung z.B. über Karst, Kies oder Grobsand mit direktem Grundwasseranschluss,
  - bei Böden mit typischerweise ausreichender Überdeckung und Filtereigenschaft sollten bodenart- und witterungsbedingte Ausschlussfälle im Rahmen von standortbezogenen Hinweisen zur Gärrestapplikation für Beratung und Praxis differenziert definiert werden. Gärrest sollte z.B. nicht auf einem tonreichen Boden nach längerer Trockenheit (Schwundrissbildung) ausgebracht werden.

#### B: Baumusterprüfung

- Das Verfahren sollte bei thermophil anaerober Vergärung eine minimale gesicherte Verweilzeit (MGRT) von  $> 4$  h bei gesicherten  $\geq 55^\circ\text{C}$  im thermophilen Fermenter beinhalten (um einen Toleranzspielraum freizuhalten wären 8 - 9 h MGRT oder eine höhere Temperatur wünschenswert), alternativ eine Pasteurisierung oder einen adäquaten Schritt. Vorgeschlagene Technologien sollten im Rahmen einer Baumusterprüfung die geforderte MGRT nachweisen. Kurzschlüsse während des Prozesses sind auszuschließen (in Rührkessel-Fermentern bestimmt das Beschickungs-Intervall die MGRT), nach der thermophilen (oder adäquaten) Hygienisierungs-Stufe muss Schwarz-Weiß-Trennung gegeben sein.

#### C: Prozesskontrolle

- Die Prozesstemperatur von  $\geq 55^\circ\text{C}$  sollte im Betrieb on-line verfolgt und dokumentiert werden (indirekte Prozesskontrolle)
- Eine zumindest einmalig nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) exemplarisch vorgenommene direkte Prozesskontrolle sollte die Reduktion intestinaler Enterokokken um  $> 4 \log_{10}$ -Stufen demonstrieren. Die Reduktion kann ggf. mit Hilfe in den Fermenterinhalt eingebrachter Keimträger mit  $10^6 - 10^7$  KBE *Enterococcus faecium* / mL



nachgewiesen werden, wobei die für den Betrieb vorgesehene MGRT ( $> 4$  h) als Verweilzeit dient.

#### D: Substrat- und Endproduktkontrolle

- Substrat ist Rindergülle von gesundem Milchvieh, ggf. unbefallene nachwachsende pflanzliche Rohstoffe (in Mischung mit solcher Rindergülle). Andere Substrate oder Mischungen mit diesen sind vorher auf Eignung und Hygienisierung zu evaluieren.
- Nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) sollte eine etwa 2 Wochen vor Ausbringung vorgenommene Produktprüfung (Endlagerprobe) dem Gärrest folgende Qualitäten bestätigen:
  - $< 150$  intestinale Enterokokken / mL (Membranfilter, Kultivierung auf Äsculin-Galle-Agar nach Slanetz-Bartley-Agar, s. 2.3.2.2),
  - $< 5$  Fäkalcoliforme / mL und/oder  $< 100$  Coliforme / mL (Fluorocult®-System, s. 2.3.2.1),
  - optional, bei unklarer Herkunft des Gärguts, v.a. bei nicht ausgeschlossener Kontamination mit Kot von Fleischfressern:  $< 3000$  *Clostridium perfringens* / mL (TSCF-Plattenguss, s. 3.1.7).
- Diese Endproduktprüfung sollte bei gleichbleibender Prozessführung in der Anlage 1x jährlich wiederholt werden, insbesondere nach der Winterpause vor der ersten Frühjahrsdüngung, da besonders nach längerer Lagerung Wiederverkeimung nicht auszuschließen ist und überprüft werden sollte.

#### E: Betriebsänderungen

- Im Falle von Änderungen des Anlagenbetriebs sollte der unter den neuen Bedingungen produzierte Gärrest erst dann ausgebracht werden, wenn Prozess- und Endproduktkontrollen seinen hygienisch einwandfreien Zustand bestätigt haben.

Bei Einhaltung dieser Maßgaben kann auf Basis der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnislage davon ausgegangen werden, dass von Gärrest-Ausbringung nach den oben definierten Kriterien in landwirtschaftlich üblicher Dosierung keine hygienisch relevante Gefährdung des Grundwasserstroms und von Oberflächengewässern ausgeht. Das Verfahren eignet sich nach jetzigem Kenntnisstand besonders, die diffusen landwirtschaftlichen hygienischen Belastungen von Trinkwassereinzugsgebieten, Badegewässern und Vorflutern zu vermindern. Wenn aktuellere Informationen insbesondere zu der Frage der Anreicherung von Sporenbildnern im Boden, Drän-, Sicker- Grund- und Trinkwasser vorliegen, könnte die vorgeschlagene Konzeption zu überdenken sein.

## Referenzen

- ALONSO, J.L., SORIANO, A., CARBAJO, O., AMOROS, I. and GARELICK, H. (1999): Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3746-3749.
- ANONYMUS (1994): Arbeitshilfe – Musterverordnung für Wasserschutzgebiet vom 01.07.1994. Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen.
- ARAUJO, M., SUEIRO, R.A., GÓMEZ, M.J. and GARRIDO, M.J. (2001): Evaluation of fluorogenic TSC agar for recovering *Clostridium perfringens* in groundwater samples. *Water Sci. Technol.* 43, 201–204.
- ARAUJO, M., SUEIRO, R.A., GÓMEZ, M.J. and GARRIDO, M.J. (2004): Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. *J. Microbiol. Methods* 57, 175-180.
- ASHBOLT, N.J., GRABOW, W.O.K. and SNOZZI, M. (2001): Indicators of microbial water quality. In: *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*, L. Fewtrell and J. Bartram (Eds.). IWA Publishing, London, UK, pp. 289–315.
- BASTOS, R.K.X., HELLER, L., VIEIRA, M.B.M., BRITO, L.A., BEVILACQUA, P.D., and NASCIMENTO, L.E. (2004): *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts dynamics in southeast Brazil: occurrence in surface water and removal in water treatment processes. *Water Sci. Tech.: Water Supply* 4, 15-22.
- BENDIXEN, H.J. (1999): Hygienic safety: results of scientific investigations in Denmark (sanitation requirements in Danis Biogas Plants). In: *Proceedings of the IEA workshop: "Hygienic and environmental aspects of anaerobic digestion: legislation and experiences in Europe."* pp. 27-47. Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- BETANCOURT, W.Q. and ROSE, J.B. (2004): Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* 126, 219-34.
- BROWN, K.L. (2000): Control of bacterial spores. *Brit. Med. Bull.* 56, 158-171.
- BUKHARI, Z., MARSHALL, M.M., KORICH, D.G., FRICKER, C.R., SMITH, H.V., ROSEN, J. and CLANCY, J.L. (2000): Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2972-2980.
- BUSTIN, S.A. and NOLAN, T. (2004): Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15, 155-166.
- CARRINGTON, E.G. (2001): Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction – final report. WRc Ref: CO 5026/1 / 12787-0, European Commission Directorate – General Environment, pp. 1-45.
- CHRIST, O., WILDERER, P.A. AND FAULSTICH, M. (1997): The TherMes-Process: Two stage thermophilic/mesophilic anaerobic treatment of suspended organic waste. In: 1st International BayFORREST conference on Treatment of Solid Waste and Wastewater, P.A. Wilderer, J.-P. Delgenes, D. C. Tartler and S. Graja, eds, BayFORREST, München.
- CHRIST, O. (1999) Leistungscharakteristik der ein- und zweistufigen thermophilen und mesophilen Vergärung von Bioabfällen. *Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft* Nr. 148, ISSN 0942-914X.



- CONBOY, M.J. and GOSS, M.J. (2001): Identification of an assemblage of indicator organisms to assess timing and source of bacterial contamination in groundwater. *Water Air Soil Poll.* 129, 101-118.
- CRAIG, D.L., FALLOWFIELD, H.J. and CROMAR, N.J. (2002): Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. *J. Appl. Microbiol.* 93, 557-565.
- DANISH NOTIFICATION NO. 823 (1996): Statutory order from the Ministry of Environment and Energy No. 823 of Sept. 16, 1996, on application of waste products for agricultural purposes. Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency.  
<http://www.mst.dk/rules/Ministerial%20Orders%20no%20longer%20in%20force/Agriculture%20not%20in%20force/05010500.doc>
- DE MAN, J.C. (1983): MPN tables, corrected. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 301-305.
- DENT, B.B., FORBES, S.L. and STUART, B.H. (2004): Review of human decomposition processes in soil. *Environ. Geol.* 45, 576-585.
- DESMARAIS, T.R., SOLO-GABRIELE, H.M. and PALMER, C.J. (2002): Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1165-1172.
- DEUTRICH, V. und PIOCH, G. (1991): Infektionsrisiko für Mensch und Tier durch langjährig gelagerte Rindergülle. *Mh. Vet.-Med.* 46, 651-655.
- DOLL, L., MEYER, H., OECHSNER, H. und PHILIPP, W. (1999): Verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen zur Abtötung von Kryptosporidien in Flüssigmist mittels der Verfahren der aerob-thermophilen Stabilisierung und der thermophilen Anaerobbehandlung. Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen und Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Abschlussbericht an das Ministerium für Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Projekt Nr. 0056.
- DOULTREE, J.C., DRUCE, J.D., BIRCH, C.J., BOWDEN, D.S., and MARSHALL, J.A. (1999): Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41, 51-57.
- EFFENBERGER, M., BACHMAIER, J., GARCÉS, G., GRONAUER, A., WILDERER, P. A. and LEBUHN, M. (2005a): Mesophilic-thermophilic-mesophilic anaerobic digestion of liquid dairy cattle manure. *Water Sci. Tech.*, submitted.
- EFFENBERGER, M., BACHMAIER, J. und GRONAUER, A. (2006): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten. Abschlussbericht der Arbeitsgruppe Reststoffmanagement, Arbeitsbereich Umwelttechnik in der Landnutzung, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik (ILT) der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL).
- ERREBO LARSEN H.E. and MUNCH B. (1990): Reduction of pathogenic and indicator organisms in biological waste - especially slurry - subjected to various treatments. In: D. Strauch (ed.): Aktuelle Probleme der Desinfektion von Nutztierställen sowie von Fest- und Flüssigmist, 3. Hohenheimer Seminar, Institute for Environmental and Animal Hygiene and Veterinary Medicine, University Hohenheim, 18-19 September 1990. *Dt. Veterinärmed. Ges. e.V. (DVG), Giessen*, pp. 169-177.
- FAO (1997): Quality control of wastewater for irrigated crop production. (Water reports - 10). Food and Agriculture Organization of the United nations, Rome, 1997, ISSN 1020-1203.



- FAYER, R., TROUT, J.M. and JENKINS, M.C. (1998): Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. J. Parasitol. 84, 1165-1169.
- FAYER, R., MORGAN, U. and UPTON, S.J. (2000): Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30, 1305-1322.
- FINK, A. WEBER, A., WINTER, D., MARTENS, W. und PHILIPP, W. (1997): Veterinär- und seuchenhygienische Untersuchungen zur Überprüfung von Gülleaufbereitungsverfahren und der erzeugten Gülleaufbereitungsprodukte“. In: „Umweltverträgliche Gülleaufbereitung und -verwertung“ KTBL-Arbeitspapier 242, S. 87-96.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J. and VRANA, K.E. (1999): Quantitative RT-PCR: potential and pitfalls. BioTechniques, 26, 112–125.
- GARCÉS-SANCHEZ, G., IHLE, S. and LEBUHN, M. (2004a): Quantification of *Enterovirus* in environmental samples by Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR (RTqPCR) - optimization of RNA extraction and RTqPCR protocols. BIOSpektrum, Sonderausgabe 2004, p. 153.
- GARCÉS-SANCHEZ, G., EFFENBERGER, M., NAJDROWSKI, M., GRONAUER A., WILDERER, P.A. and LEBUHN, M. (2004b): Optimizing quantification of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cattle manure and effluents from anaerobic digesters by quantitative real-time PCR (qPCR). Proc. 10th World Congress on Anaerobic Digestion. Aug. 29 - Sep. 2, 2004, Montreal, Canada, ed. S. Guiot, pp. 1749-1752.
- GARCÉS, G., EFFENBERGER, M., NAJDROWSKI, M., WACKWITZ, C., GRONAUER, A., WILDERER, P.A. and LEBUHN, M. (2005): Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. Water Sci. Tech., submitted.
- GELDREICH, E.E. (1978): Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In: Berg, G. (ed.), Indicators of viruses in water and food. Ann. Arbor Science, Ann. Arbor, Mich., 51-97.
- GODFREE, A. and FARRELL, J. (2005): Processes for Managing Pathogens. J. Environ. Qual. 34, 105–113.
- HÄNNINEN, M.-L. and KÄRENLÄMPI, R. (2004): *Campylobacter* in waterborne epidemics in Finland. Water Sci. Technol.: Water Supply 4/2, 39-45.
- HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J. and WILLIAMS, P.M. (1996): Real time quantitative PCR. Genome Res., 6, 986–994.
- HEILMANN, B., LEBUHN, M. und BEESE, F. (1993): Wirkungen chemischer Belastungen auf Struktur und metabolische Aktivität der Mikroflora eines Ackerbodens (Mikrokosmenversuch). Mitteilungen Dt. Bodenkundl. Gesellsch. 72, 539-542.
- HEILMANN, B., LEBUHN, M. und BEESE, F. (1995): Methods for the investigation of metabolic activities and shifts in the microbial community in a soil treated with a fungicide. Biol. Fertil. Soils 19, 186-192.
- HENKELMANN, G. (2006): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten, Abschlussbericht des StMUGV-Teilprojekts: Wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchungen – Lysimeter-, Labor- und Praxisversuche, pp. 1-31.
- HILL, R.T., STRAUBE, W.L., PALMISANO, A.C., GIBSON, S.L. and COLWELL, R.R. (1996): Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1741-1746.



- HOFERER, M. (2001): Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. Inaugural Dissertation beim Fachbereich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, Journal-Nr. 2528, S. 1-211.
- HOU, L., LI, X., DUNBAR, L., MOELLER, R., PALERMO, B., and ATWILL, E.R. (2004): Neonatal-mouse infectivity of intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after optimized in vitro excystation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 642–646.
- HUBER, S. (2002): Entwicklung einer auf 5'-Nukleaseaktivität und Polymerase-Kettenreaktion basierenden Methode zum quantitativen Nachweis von *Escherichia coli* in Rindergülle. Studienarbeit im Rahmen des Aufbaustudiums Umweltschutztechnik, Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft, Technische Universität München, 41 S.
- HÖHNE, M. and SCHREIER, E. (2004): Detection and characterization of Norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J. Med. Virol.* 72, 312-319.
- IHLE, S., PUSCH, D., LEBUHN, M., GRÄBER, I. and LOPEZ-PILA, J.M. (2003): Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge: a comparison between cell culture detection and real-time PCR of the enteroviral RNA. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 8 (4), 222.
- JONES, P. and MARTIN, M. (2003): A review of the literature on the occurrence and survival of pathogens of animals and humans in green compost. Institute for Animal Health, Compton, Newbury, Berkshire, RG20 7NN, UK, The Waste and Resources Action Programme, [www.wrap.org.uk](http://www.wrap.org.uk), ISBN: 1-84405-063-7, pp. 1-34.
- KAGAWA, H. (1971): Adsorption of bacteria by soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 17, 150-153.
- KNIE, A., MARTENS, W., PHILIPP, W. und BÖHM, R. (2000): Ergebnisbericht zu den begleitenden seuchenhygienisch-mikrobiologischen Untersuchungen bei der Verwertung von Inkontinenzwindeln aus Altenheimen zusammen mit Bio- und Gewerbeabfällen in der Anaerobanlage Erkheim. Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim (Prof. Dr. R. Böhm), Dezember 2000.
- KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L.G., OLSSON-LILJEQUIST, B., FRANKLIN, A., FINN, M., AARESTRUP, F., SEYFARTH, A.M., BLANCH, A.R., VILANOVA, X., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M.A., DOMINGUEZ, L., HERRERO, I.A. and MÖLLBY, R. (2003): Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 133-145.
- LAKE, R., HUDSON, A. and CRESSEY, P. (2004): Risk profile: *Yersinia enterocolitica* in pork. Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre, New Zealand, Client Report FW0328.
- LARSEN, H.E., MUNCH, B. and SCHLUNDT, J. (1994): Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in biogas plants. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 195, 544-555.
- LEBUHN, M. (2002): Erster Zwischenbericht des StMLU-Projekts: Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen, Technische Universität München, Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft, 12 S.
- LEBUHN, M. (2003): Zweiter Zwischenbericht des StMLU-Projekts: Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in



Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen, Technische Universität München, Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft, 24 S.

- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GRONAUER, A., WILDERER, P.A. and WÜRTZ, S. (2003): Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Sci. Tech.* 48, 97-103.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCÉS, G., NAJDROWSKI, M., GRONAUER, A. and WILDERER, P.A. (2004a): Quantification of *Cryptosporidium parvum* in cattle manure by Real-Time PCR - development of a suitable DNA extraction routine. *BIOspektrum*, Sonderausgabe 2004, p. 57.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCÉS, G., GRONAUER, A. and WILDERER, P.A. (2004b): Evaluating Real-Time PCR for the Quantification of Distinct Pathogens and Indicator Organisms in Environmental Samples. *Water Sci. Tech.* 50, 263-270.
- LEBUHN, M. and MAJEWSKI, K. (2005): Reliable quantification of nucleic acid containing organisms in environmental samples using a standard spiking approach, Real-Time quantitative PCR, and data analysis by programme CeTe. In Vorbereitung.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCÉS, G., GRONAUER, A. and WILDERER, P.A. (2005): Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Sci. Tech.* 52/1-2, 93-99.
- LENHART, B. (2001): Bedeutung und Verminderung diffuser Belastungen im Einzugsbereich der Oberen Isar. In: *Stoffbewertung und Gewässerökologie - Hygienische Aspekte von Oberflächengewässern aus wasserwirtschaftlicher Sicht*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft: 55. Fachtagung - Kurzfassung der Vorträge.
- LEPEUPLE, A.S., GAVAL, G., JOVIC, M. and DE ROUBIN, M.R. (2004): Literature review on levels of pathogens and their abatement in sludges, soil and treated biowaste. *Anjou Recherche*. Horizontal Project 6, WP3: Hygienic parameters, pp. 1-53. [ftp://ftp.ecn.nl/pub/www/society/horizontal/hor6\\_pathogens.pdf](ftp://ftp.ecn.nl/pub/www/society/horizontal/hor6_pathogens.pdf).
- LIE, Y.S. and PETROPOULOS, C.J. (1998): Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *ViroLogic*, Inc, South San Francisco, California, USA. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 43-48.
- LLEÒ, M.M., BONATO, B., TAFI, M.C., SIGNORETTA, C., BOARETTI, M. and CANEPARI, P. (2001): Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J. Appl. Microbiol.* 91, 1095-1102.
- MATCHES, J.R., LISTON, J. and CURRAN, D. (1974): *Clostridium perfringens* in the environment. *Appl. Microbiol.* 28, 655-660.
- MEYER, J., PHILIPP, W. und BÖHM, R. (1999): Verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen zur Abtötung von Kryptosporidien in Flüssigmist mittels der Verfahren der aerob thermophilen Stabilisierung und der thermophilen Anaerobbehandlung. Mikrobiologischer Teil des Abschlußberichts Az.: 28-8223.12, Projekt Nr. 0056. Inst. f. Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, S. 1-78.
- MUNDY, L.M., SAHM, D.F. and GILMORE, M. (2000): Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, 513-522.
- NAJDROWSKI, M., WACKWITZ, C., JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A., und MACKENSTEDT, U. (2004): Development of a viability assay for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Int. J. Med. Microbiol.* 293 (Suppl. 38), 64.



- NAZARENKO, I., LOWE, B., DARFLER, M., IKONOMI, P., SCHUSTER, D. and RASHTCHIAN, A. (2002): Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 30(9), e37.
- NEUMANN, N.F., GYÜREK, L.L., FINCH, G.R. and BELOSEVIC, M. (2000): Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 331-336.
- OECHSNER, H. and DOLL, L. (2000): Inactivation of pathogens using the aerobic-thermophilic stabilization process. In: J.A. Moore (ed.) *Animal, Agricultural and Food Processing Waste, Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium, 09.-11.10.2000, Des Moines, Iowa, USA.* American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, Michigan, USA, pp. 522-528.
- O'REILLY, C. and COLLERAN, E. (2004): The importance of hygienisation during anaerobic digestion. "Biogas without limits" AD-NETT Workshop, Leipzig, Germany, 28-30<sup>th</sup> January 2004.
- PALUSZAK, Z., OLSZEWSKA, H. and BREZA-BORUTA, B. (2003): Experimental study on fecal bacteria movement in soil amended with slurry. *Electron. J. Polish Agric. Univ.* 6/2, <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue2/environment/art-09.pdf>.
- PEETERS, J.E. and VILLACORTA, I. (1995). *Cryptosporidium*. In: *Biotechnology - Guidelines on techniques in coccidiosis research* (ed. Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P.), Office for official Publications of the European Communities, Luxemburg, pp. 202-240.
- PERETZKI (2006): Stoffstromanalyse und Gärrestverwertung. In: EFFENBERGER et al. (2006).
- PETIT, L., GIBERT, M. and POPOFF, M.R. (1999): *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7, 104-110.
- PETRY, F., SHIRLEY, M.W., MILES, M.A. and McDONALD, V. (1998): Characterisation of a *Cryptosporidium parvum*-specific cDNA clone and detection of parasite DNA in mucosal scrapings of infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95, 21-31.
- PHILIPP, W. (2002): Verfütterungsverbot von Speiseresten - Zukünftige Verwertung in Biogasanlagen? Tagungsband der 11. IBBK Jahrestagung "Biogas und Bioenergie in der Landwirtschaft", 5.-6.12.2002, Rot/See, S. 93-109.
- PIANETTI, A., BRUSCOLINI, F., SABATINI, L. and COLANTONI, P. (2004): Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 97, 682-689.
- PICKUP, R.W., RHODES, G. and HERMON-TAYLOR, J. (2003): Monitoring bacterial pathogens in the environment: advantages of a multilayered approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 319-325.
- PUSCH, D., IHLE, S., LEBUHN, M., GRAEBER I. and LOPEZ-PILA, J.M. (2005): Concentration of enteroviruses in activated sludge by cell culture and by quantitative PCR. *J. Water Health*, 3/3, 313-324.
- RAPP, A. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Biogemeinschaftsanlagen. Dissertation, Universität Hohenheim.
- ROBBEN, P.M. and SIBLEY, L.D. (2004): Food- and waterborne pathogens: you are (infected by) what you eat! *Microbes Infect.* 6, 406-413.



- ROCHELLE, P.A. (2004) Applications of *in-vitro* cell culture for measuring infectivity and inactivation of *Cryptosporidium parvum*. *Water Sci. Technol.: Water Supply* 4/2, 87-92.
- ROSE, J.B., HUFFMAN, D.E., and GENNACCARO, A. (2002): Risk and control of waterborne cryptosporidiosis, *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 113–123.
- RÜCKERT, V. (1991): Mikrobiologische Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Flüssigmistbehandlung. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften.
- SANTAMARIA, J. and TORANZOS, G.A. (2003): Enteric pathogens and soil: a short review. *Int. Microbiol.* 6, 5-9.
- SCHINDLER, P.R.G. (1991): MUG-Laurylsulfat-Bouillon - ein optimales Nachweismedium für gesamtcoliforme und fäkalcoliforme Bakterien im Rahmen der hygienischen Überprüfung von Badegewässern gemäß der EG-Richtlinie 76/160 EWG. *Zbl. Hyg. Umweltmed.* 191, 438-444.
- SKANAVIS, C. and YANKO, W.A. (2001): *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 31-35.
- SPILLMANN, S.K., TRAUB, F., SCHWYZER, M. and WYLER, R. (1987): Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2077-2081.
- STLMU (1998): Bayern-Agenda 21, München.
- STRAUCH, D. (1987): Hygiene of Animal Waste Management. In: *Animal Production and Environmental Health*. Ausgb. *World Animal Science Bd. B6*. (Hrsg.: Strauch, D.) Elsevier Science Publishers B.V., 155-202.
- STRAUCH, D. (1996): Hygieneaspekte bei der Cofermentation. In: *Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion*. Ausgb. *Tagungsberichte Bd. 14*. (Hrsg.: Braun, R.) Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie, Tulln, 53-92.
- TEBBE C.C. and VAHJEN W. (1994): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657-2665.
- THOMAS C., HILL D. and MABEY M. (2002). Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *J. Appl. Microbiol.* 92, 433-442.
- UGWUANYI, J.O., HARVEY, L.M. and MCNEIL, B. (1999): Effect of process temperature, pH and suspended solids content upon pasteurization of a model agricultural waste during thermophilic aerobic digestion. *J. Appl. Microbiol.* 87, 387–395.
- USFDA (2000): Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Overarching principles: kinetics and pathogens of concern for all technologies. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, June 2, 2000.
- VERORDNUNG (EG) NR. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 273*, Brüssel, 3. Oktober 2002.
- WACKWITZ, C. (2005): Promotionsarbeit am Institut für Parasitologie, Leipzig, Prof. Daugschies. Vitalitätsbestimmung von *C. parvum* in einem Zellkultur-System mit Hilfe serologischer Assays. In Vorbereitung.



- WEIß, K. und POPP, W. (2004): Quantifizierung der diffusen Belastung von Gewässern mit Fäkalbakterien aus landwirtschaftlich genutzten Flächen. Schlussbericht, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Materialien Nr. 111, S. 1-74.
- WHO (2002): Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). In: Guidelines for drinking-water quality. 2<sup>nd</sup> ed. Addendum: Microbiological agents in drinking water. Geneva, World Health Organization, pp. 70-118.
- WHO (2004a): Microbial fact sheets. In: Guidelines for drinking-water quality. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, World Health Organization, pp. 221-295.
- WHO (2004b): Microbial aspects. In: Guidelines for drinking-water quality. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, World Health Organization, pp. 121-144.
- WILHELM, J. and PINGOUD, A. (2003): Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4, 1120-1128.
- ZETHNER, G., PFUNDTNER, E. und HUMER, J. (2002): Qualität von Abfällen aus Biogasanlagen. Umweltbundesamt GmbH / Federal Environment Agency - Austria, Monographien Band 160, Wien, ISBN 3-85457-657-9, S. 1-50.
- ZHOU, J., BRUNS, M.A. and TIEDJE, J.M. (1996): DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.