

RIPAC-LABOR GmbH

- 2003 – 2018
- Potsdam, Wissenschaftspark Golm

- Diagnostik
- bestandsspezifische Impfstoffe
- Forschung und Entwicklung

ripac labor

Mikrobiologische Untersuchungen und Hygienekontrollen in Biogasanlagen

Dr. med. vet. habil. Bernd Köhler

ripac labor

Mikrobiologische Untersuchungen und Hygienekontrollen in Biogasanlagen

Dr. med. vet. habil. Bernd Köhler

8.11.2018, TiHo Hannover

1. Gesamtkeimzahl aerob/mikroaerophil – Kochsches Plattenverdünnungsverfahren
2. Gesamtkeimzahl anaerob- Kochsches Plattenverdünnungsverfahren auf:
 - Columbia- Blutagar
 - Gentamycin- Blutagar
 - Neomycin- Blutagar
3. Identifizierung der Kulturen mittels MALDI-TOF- Verfahren
4. Anreicherung in 10ner Potenzen (18-24h bei 37°C) mit nachfolgender:
 - Subkultivierung auf den o.g. Platten
 - Beimpfung von Eisensulfitagar nach Angelotti
5. **Direkter Toxinnachweis von *Clostridium botulinum*- Toxin**
6. **Anreicherung Neurotoxin bildender *Clostridium botulinum*- Stämme**
7. Gesamtkeimzahl von Clostridien in Eisensulfithochschichtagar

Die Beurteilung der Proben und die Durchführung der Toxinversuche erfolgte entsprechend §64 Abs. 1 LFGB mittels Mäuseletalitäts- und Neutralisationstest mit typenspezifischen Antitoxinen



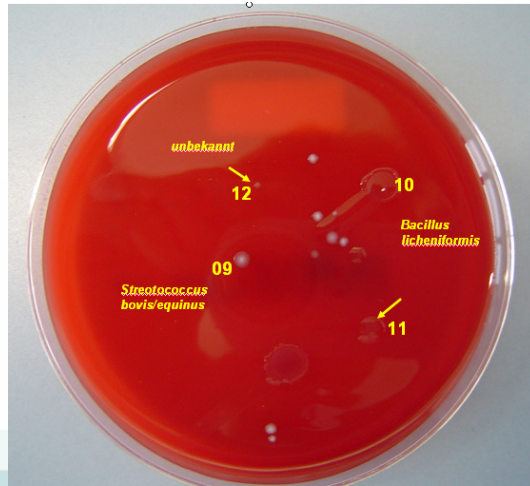
Feststellung der Gesamtkeimzahl der Clostridien

Eisensulfit-Agarröhrchen

nach ANGELOTTI



Abb. 3



MALDI-TOF MS Analyse

Abb. 4

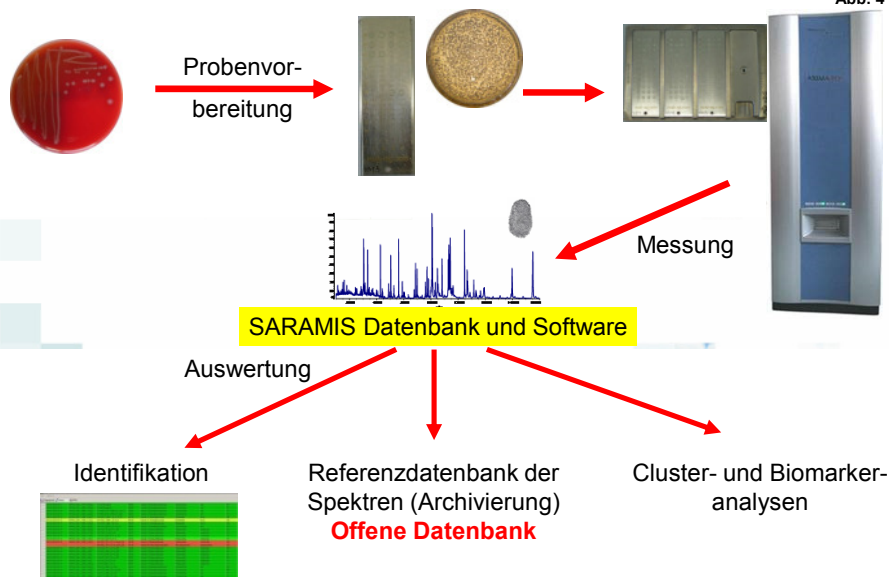
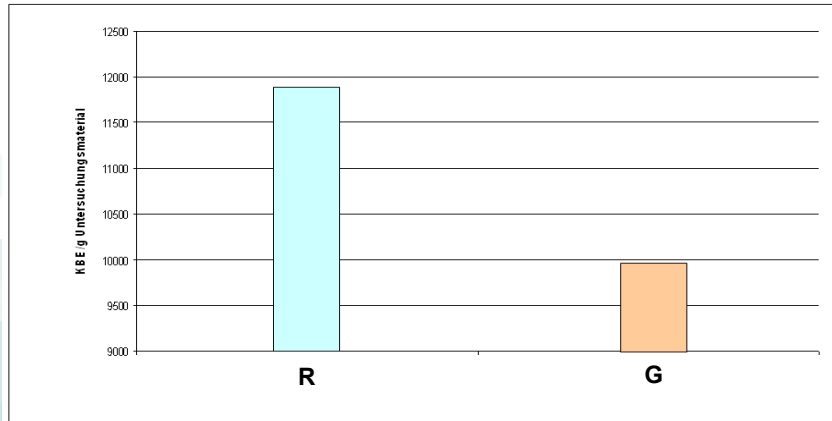


Abb. 5

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

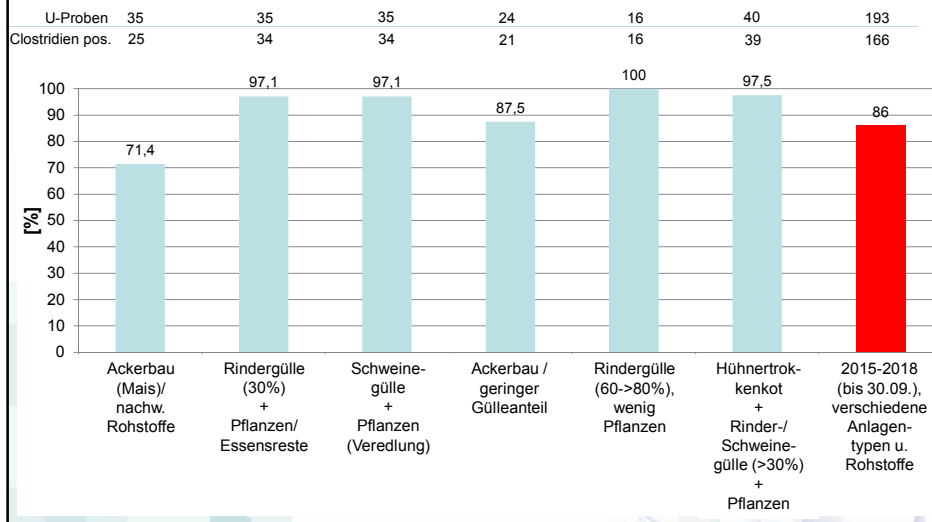


R= Rohstoffe

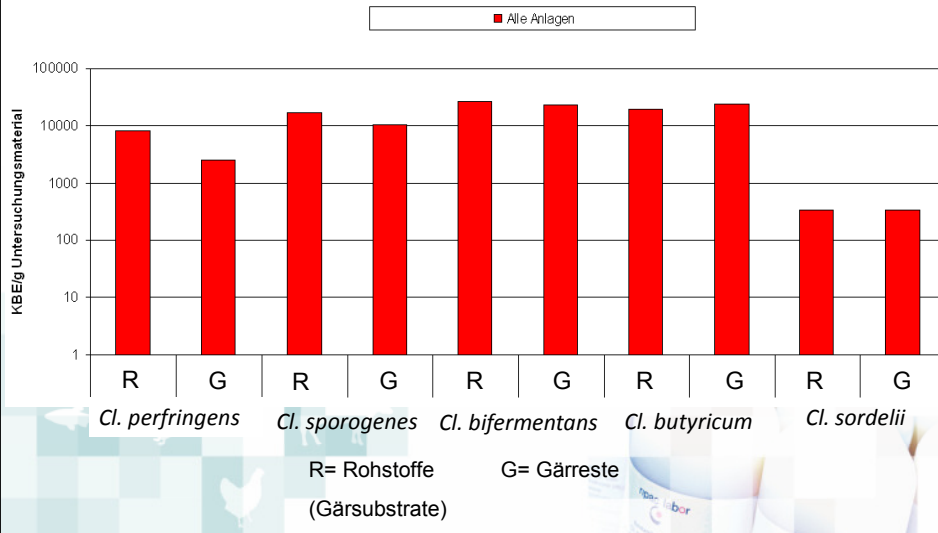
G= Gärreste

Abb. 6

Vergleich der Nachweisrate von Clostridien in Gärsubstraten von Biogasanlagen nach Anlagentyp mit den Befunden 2015-2018 (bis 30.09.)



Vergleich der Gesamtkeimzahlen für Clostridia spezie



Übersicht des in 188 Gärrestproben aus 128 Biogasanlagen von 2015 bis 2018 festgestellten Clostridienspektrum

Parameter	Anzahl	%
U-Anlagen	128	100
Proben	193	100¹⁾
Clostridien positiv	166	86%
<i>Clostridium perfringens</i>	119	61,7
<i>Clostridium tetani</i>	64	33,2
<i>Clostridium sporogenes</i>	57	29,5
<i>Clostridium limosum</i>	21	10,9
<i>Clostridium bifermentans</i>	12	6,2
<i>Clostridium butyricum</i>	10	5,2
<i>Clostridium sordellii</i>	7	3,6
<i>Clostridium glycolicum</i>	6	3,1
<i>Clostridium cochlearium</i>	6	3,1
<i>Clostridium baratii</i>	2	1,0
<i>Clostridium cadaveris</i>	2	1,0
<i>Clostridium tepidum</i> (<i>Clostridium</i> spp. D11-0088-1-1-16)	8	4,1
<i>Clostridium</i> D12-1413-1-1-3	9	4,7
<i>Clostridium neonatale</i> (<i>Clostridium</i> spp. D13-0312-1-1-9)	2	1,0
<i>Clostridium</i> spp. D12-1085-18-1-1	5	2,6
unbekannte Clostridia spp.	3	1,5
Summe Stämme	333	

Vergleich des Clostridienspektrums in Gärrestproben der TiHo/RIPAC-Studie mit den Befunden der Routinediagnostik des RIPAC-Labores 2014-2018 (30.9.18) 128 Anlagen

Clostridienspezies	TiHo Hannover/ RIPAC-Labor- Studie		RIPAC-Labor	
	n	%	n	%
<i>Clostridium perfringens</i>	87	47,0	119	93
<i>Clostridium tetani</i>	1	0,5	64	50,0
<i>Clostridium sporogenes</i>	15	8,1	57	21,1
<i>Clostridium limosum</i>	3	1,6	21	16,4
<i>Clostridium bifementans</i>	26	14,1	12	9,4
<i>Clostridium butyricum</i>	20	10,8	10	7,8
<i>Clostridium sordellii</i>	10	5,4	7	5,5
<i>Clostridium glycolicum</i>	2	1,1	6	4,7
<i>Clostridium cochlearium</i>			6	4,7
<i>Clostridium baratii</i>	2	1,1	2	1,6
<i>Clostridium cadaveris</i>			2	1,6
<i>Clostridium tepidum</i> (<i>Clostridium</i> spp. D11-0088-1-1-16)	6	3,2	8	6,2
<i>Clostridium sartogoforme</i>	1	0,5		
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	6	3,2		
<i>Clostridium tertium</i>	1	0,5		
<i>Clostridium</i> D12-1413-1-1-3	11	5,9	9	7,0
<i>Clostridium neonatale</i> (<i>Clostridium</i> spp. D13-0312-1-1-9)	5	2,7	2	1,6
<i>Clostridium</i> spp. D12-1085-18-1-1			5	3,9
unbekannte <i>Clostridia</i> spp.	1	0,5	3	2,3
Σ Stämme	197		333	
Geprüfte Anlagen/Proben	n	185	100	128
	%	100		100



**Kein Nachweis von *Clostridium perfringens* Typ C/
Nekrotisierende Enteritis von Schwein und Mensch**







**Kein Nachweis von *Clostridium chauvoei* Rauschbrand
Wiederkäuer**

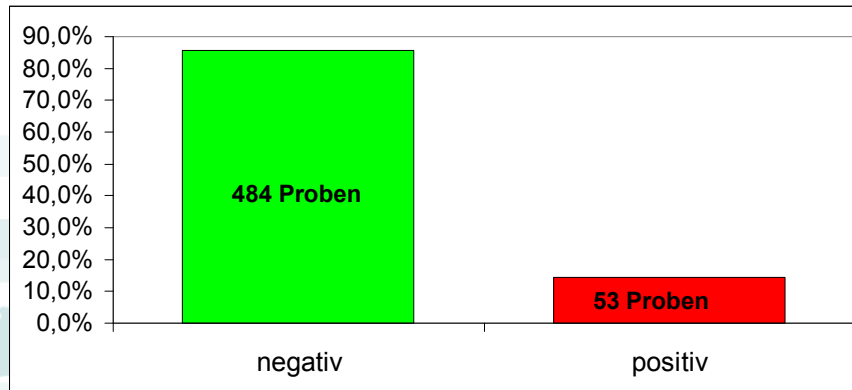
Toxinbildungsvermögen von 36 ausgewählten *Clostridium perfringens*-Stämmen aus Gärresten aus 36 Biogasanlagen

α-Toxin		β1-Toxin	β2-Toxin	ε-Toxin	NetB-Toxin	(-) Toxin
≤4 NE	11		2			9
8-16 NE	16				1	16
≥32 NE	9			1		9
Summe	36		2	1	1	2
Toxintyp	35x Typ A			1x Typ D		

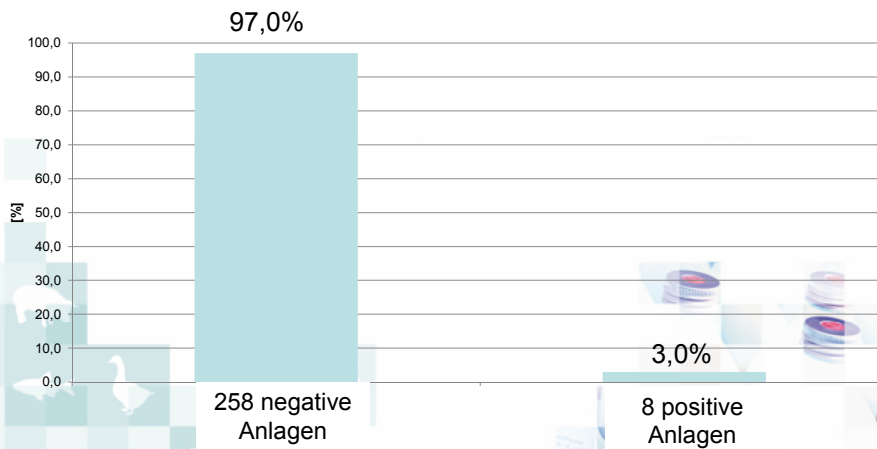
Spezifische Erreger von Gasbrand	25
Enteritis bei neugeborenen Saugferkeln	2
<i>Clostridium perfringens</i> Typ D- Enterotoxämie bei Wiederkäuern	2

-  Hohe Diversität der mikrobiellen Population in Gärresten
-  Kein systematisches Auftreten von tier- bzw. humanpathogenen Keimen
-  Vereinzelt positive Befunde bei *Taylorella equigenitalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus gallolyticus*, *Enterococcus cecorum* und Salmonellen.
-  Negative Befunde bei EHEC, Campylobacter, Riemerellen, Rotlauf und vielen anderen Erregern von Tierseuchen und A Anthropozoonosen.

Neurotoxinbildner in Gärrestproben 2014-2018 (30.9.18)



Nachweis von *Clostridium botulinum*-Neurotoxin bildenden Stämmen in 266 Biogasanlagen im Rahmen der Routinediagnostik



Herkunft der 188 Gärrestproben aus 128 Biogasanlagen 2015-2018 (30.09.18)

Herkunft		Anlagen	Proben
Deutschland	Niedersachsen	79	92
	Nordrhein-Westfalen	8	17
	Hessen	17	46
	Sachsen-Anhalt	5	11
	Thüringen	2	6
	Brandenburg	4	8
	Mecklenburg-Vorpommern	4	4
	Sachsen	4	4
Belgien	5	5	
Summe		128	193

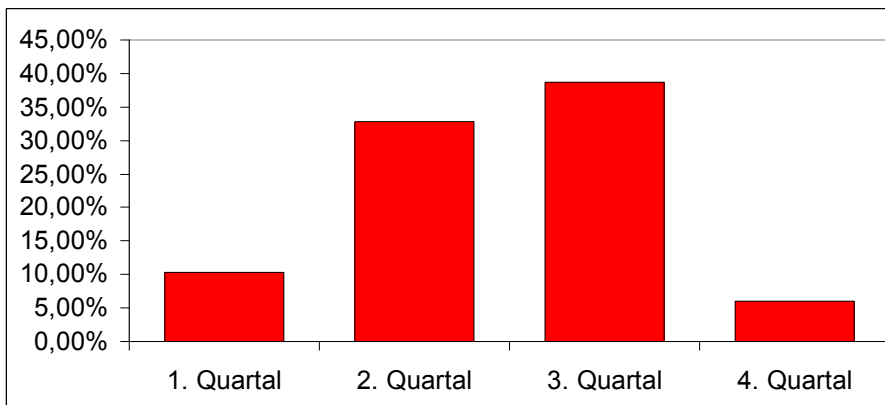
Vorkommen Neurotoxin von *Clostridium botulinum* bildender Stämme in 128 getesteten Biogasanlagen von 2016-2018 (30.09., Routinediagnostik)

Parameter	Anzahl	%
Getestete Anlagen	128	100
Positive Anlagen	2	1,6
Toxintypen	1 1	D A, C, D, E

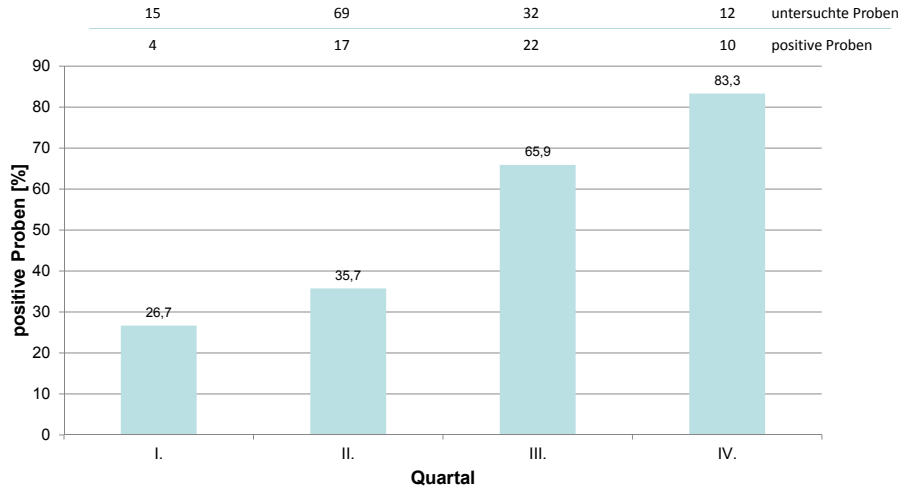
**Ursachen des Nachweises von Neurotoxin bildenden
Clostridium botulinum in Gärrückständen von Biogasanlagen**

Anlagen	Toxintyp	Ursachen / begünstigende Faktoren / Bemerkungen
1	A	Großes Einzugsgebiet mit vielfältigen Rohstoffen (verdorbene Lebensmittel, verdorbene Futtermittel, Silagen, Inhalt aus Biotonnen, Mais und andere Pflanzen)
2	C/D	Einsatz verdorbener Silagen aus Rinderbetrieb mit Ausbruch von Botulismus bei Rindern
3	C/D	Verdorbene Silagen aus Rinderbetrieb mit Ausbruch von Botulismus bei Rindern
4	B	Vielfältige Rohstoffe einschließlich Gülle aus Schweinebetrieben
5	A	Großes Einzugsgebiet mit vielfältigen Rohstoffen (verdorbene Lebensmittel, verdorbene Futtermittel, Silagen, Inhalt aus Biotonnen, Mais und andere Pflanzen)
6	C, D	Lebensmittel, Treber, Gülle (Schwein und Rind)
7	A, B, C, D	Biotonne, gewerbliche Bioabfälle, Laub aus Parkanlagen mit Wasservögeln mit Botulismugeschehen
8	D	Rindergülle

Jahreszeitliche Abhängigkeit der Nachweisrate von BoNT bzw. BoNT-Bildungsvermögen in 266 Einzelproben aus Biogasanlagen

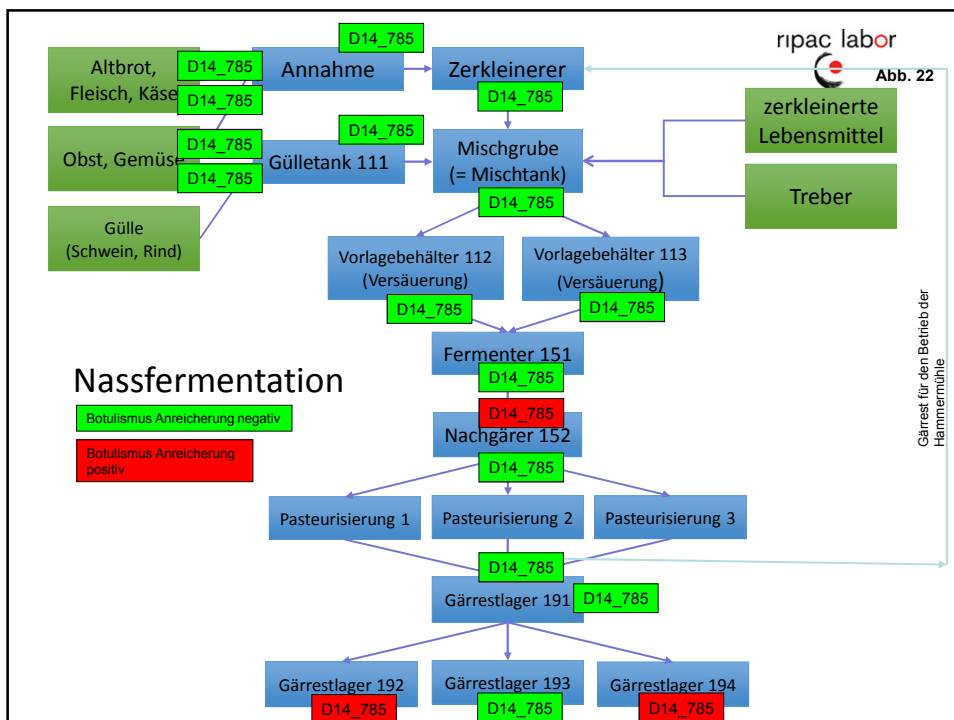
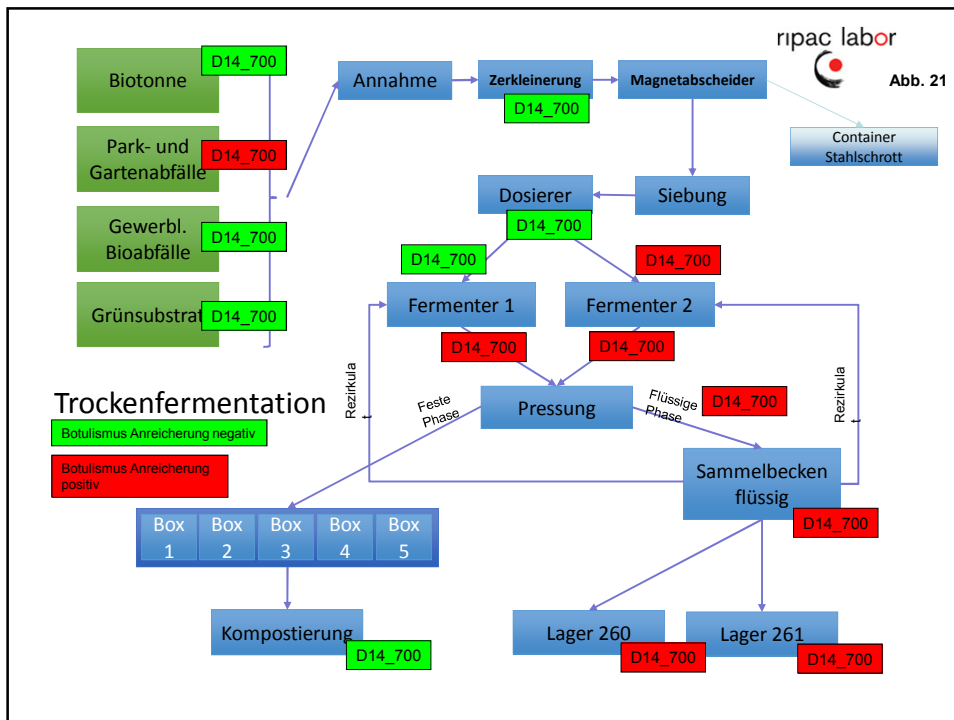


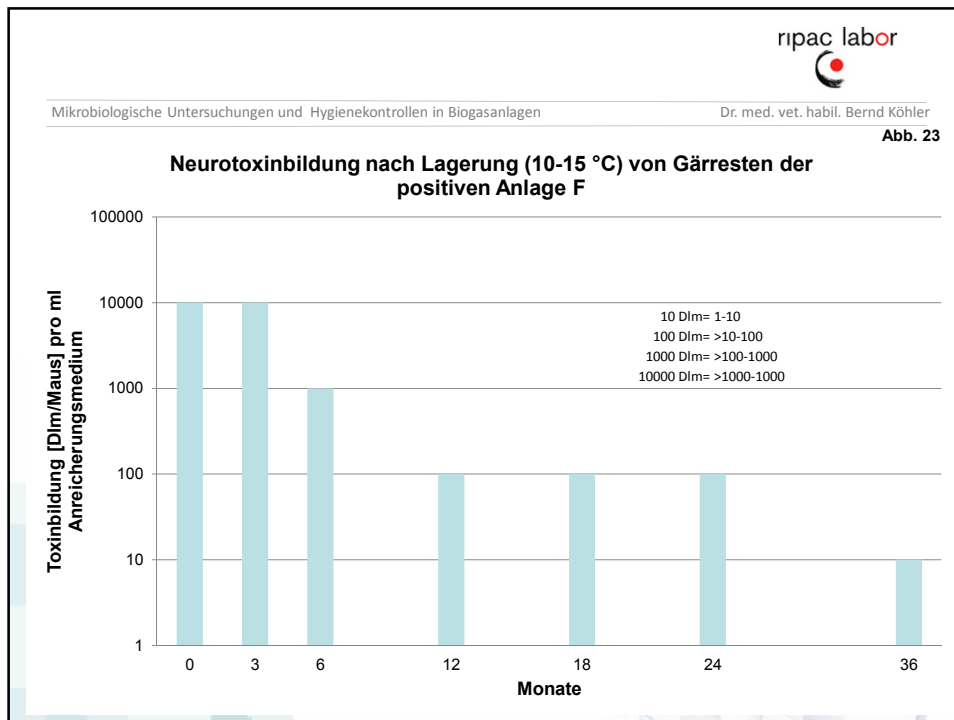
Quartalsmäßige Häufigkeit des Nachweises von Neurotoxin-bildenden Stämmen in Gärresten der Anlage F (2016-09/2018)



Ergebnisse der Studie von Neurotoxin bildenden Stämmen in der Anlage F (2014-2017)

Jahre		2014	2015	2016	2017	Insgesamt	
						n	%
Untersuchte Proben		64	41	23	3	131	100
<i>Clostridium botulinum</i> Neurotoxinbildner positiv	n	20	24	8	1	53	
	%	30,8	58,5	34,8	33		
Toxintypen	A	1				1	1,9
	B						
	C	5	2	1		8	15,1
	D	5	7	2		14	26,4
	E						
	Mix	4 C/D 2 A/E 1 A/B/E	11 C/D 2 A/C	3C/D		18 C/D 2 A/C 2 A/E 1 A/B/E	33,9 3,8 3,8 1,9
	nicht typisierbar	2	2	2	1	7	13,2
Summe		20	24	8	1	53	100





- ripac labor
- Mikrobiologische Untersuchungen und Hygienekontrollen in Biogasanlagen Dr. med. vet. habil. Bernd Köhler
- Abb. 24**
- ### Veterinärhygienische Richtlinien/ Anforderungen für den Betrieb von Biogasanlagen
- Regelmäßige Rohstoffkontrolle insbesondere von tierischen Rohstoffen
 - Kein Einsatz von tierischen und pflanzlichen Rohstoffen aus Beständen mit Botulismusausbrüchen
 - Mikrobiologische Untersuchung von Starterkulturen auf Neurotoxin bildende *Clostridium botulinum*-Stämme
 - Ausstattung aller Biogasanlagen mit 2 Rohstoffsilos, die wechselseitig (etwa 4 wöchiger Rhythmus) bzw. nach Reinigung und Desinfektion betrieben werden sollten
 - Ausstattung aller Biogasanlagen mit 2 Gärrückstandssilos, die abwechselnd in ca. 3 monatigem Abstand zu befüllen sind
 - Sicherung der Gärrückstände vor nachträglichen Kontaminationen (Schwarz-Weiß-Prinzip)
 - Aus veterinärhygienischer Sicht kann die Verbreitung Neurotoxin bildender *Cl. botulinum*- Stämme nicht toleriert werden
 - Jährliche Kontrolluntersuchung der Gärrückstände aller Biogasanlagen hinsichtlich des Vorkommens Neurotoxin bildender *Clostridium botulinum*- Stämme
 - Freiheit von *Cl. chauvoei*, *Cl. perfringens* Typ C und EHEC (Untersuchung bei speziellem Anlass/ Verdacht)

Vorkommen von *Cl. botulinum*- Neurotoxin bildenden Stämmen im Biokompost, in Gärrückständen, in Gülle aus landwirtschaftlichen Betrieben und in Klärschlämmen von Kläranlagen (2006-2017)

Untersuchungsmaterial	Anzahl der geprüften Betriebe	Anzahl der Proben	Nachweis Toxin-bildender <i>Cl. botulinum</i> -Stämme ¹⁾		Bemerkungen
			Anzahl	%	
Kompostproben	20	102	2 ²⁾	2	2 Proben schwach toxisch/ Ohne Zuordnung zu speziellem Toxintyp
Klärschlamm	14	56	0	0	
Gülle aus Rinder- Schwein- und Geflügelbetrieben (ca. 6-wöchige Vergärung)	31	94	0	0	
Proben aus Biotonne	11	22	0	0	
Biogasanlagen	266	537	53	9,9	
Summe	207	614	2²⁾	0,7	

1) Nachweis mittels Mausbioassay nach 7 tägiger Anreicherung in cooked meat-Medium bzw. Maltose Kalbfleischbouillon nach Nishida und Nakagawara (Grenzwert ≥ 10 Dlm/ml)
2) zweifelhafter Befund, Toxin nicht typisierbar

Weitere potentielle Träger von *Clostridium botulinum*- Toxingenen von Clostridienstämmen mit nachgewiesener Neurotoxinbildung außer *Clostridium botulinum*

Spezies	Isolate Biogasanlagen RIPAC-LABOR
<i>Clostridium butyricum</i>	30
<i>Clostridium limosum</i>	24
<i>Clostridium baratii</i>	4

ripac labor

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

RIPAC-LABOR GmbH
Am Mühlenberg 11
14476 Potsdam

Tel: +49(0)331 581840-0
Fax: +49(0)331 581840-10
www.ripac-labor.de

Email: info@ripac-labor.de

