

Untersuchungen zum mikrobiologischen Risikopotenzial von Gärsubstraten und Gärresten aus niedersächsischen Biogasanlagen

Gerhard Breves, Physiologisches Institut

Gliederung

- 1. Einleitung**
- 2. Studiendesign**
- 3. Gesamtkeimzahlen in Gärsubstraten und Gärresten; Spektrum der Mikroflora**
- 4. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagentypen**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

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

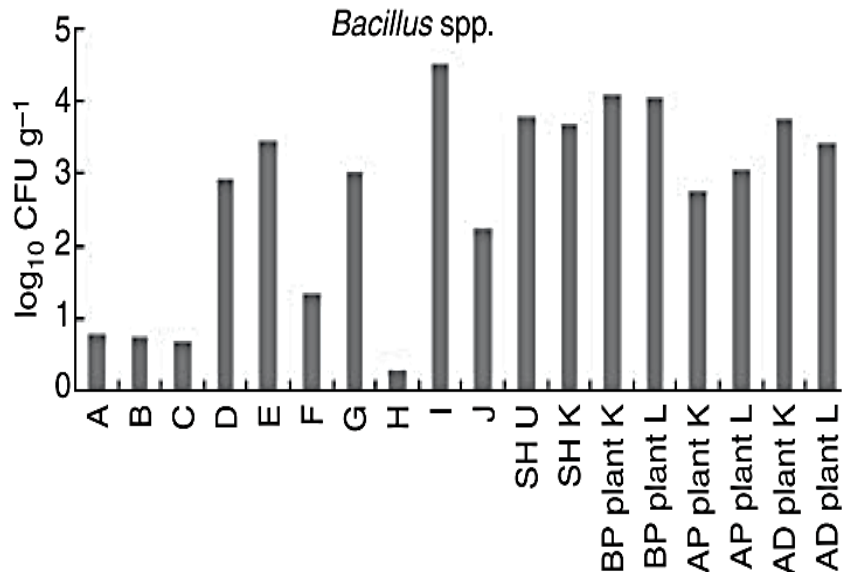


Figure 2 Mean values of the quantities of bacteria representing *Bacillus* spp. *Lysinobacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. in the different sampling materials. SH, slaughterhouse waste from slaughterhouses U and K; BG, biogas plants K and L; BP, before pasteurization; AP, after pasteurization; AD,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

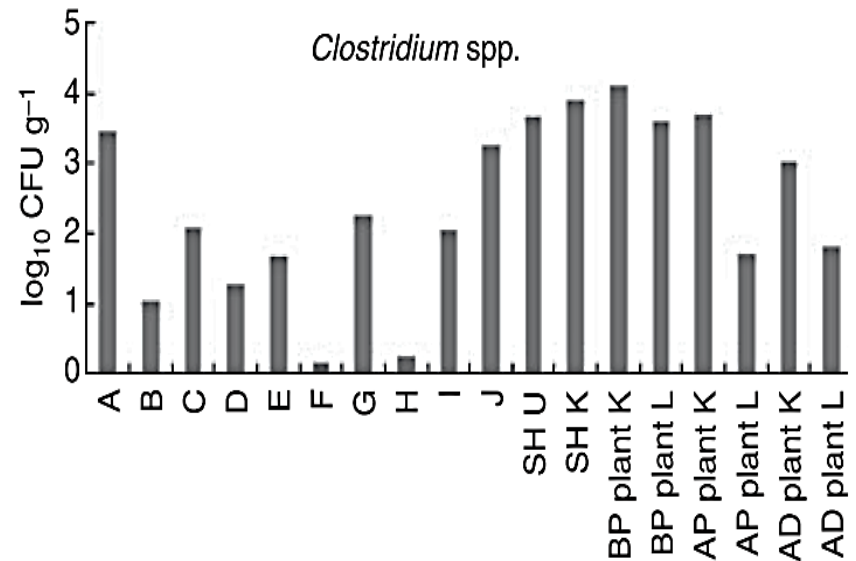
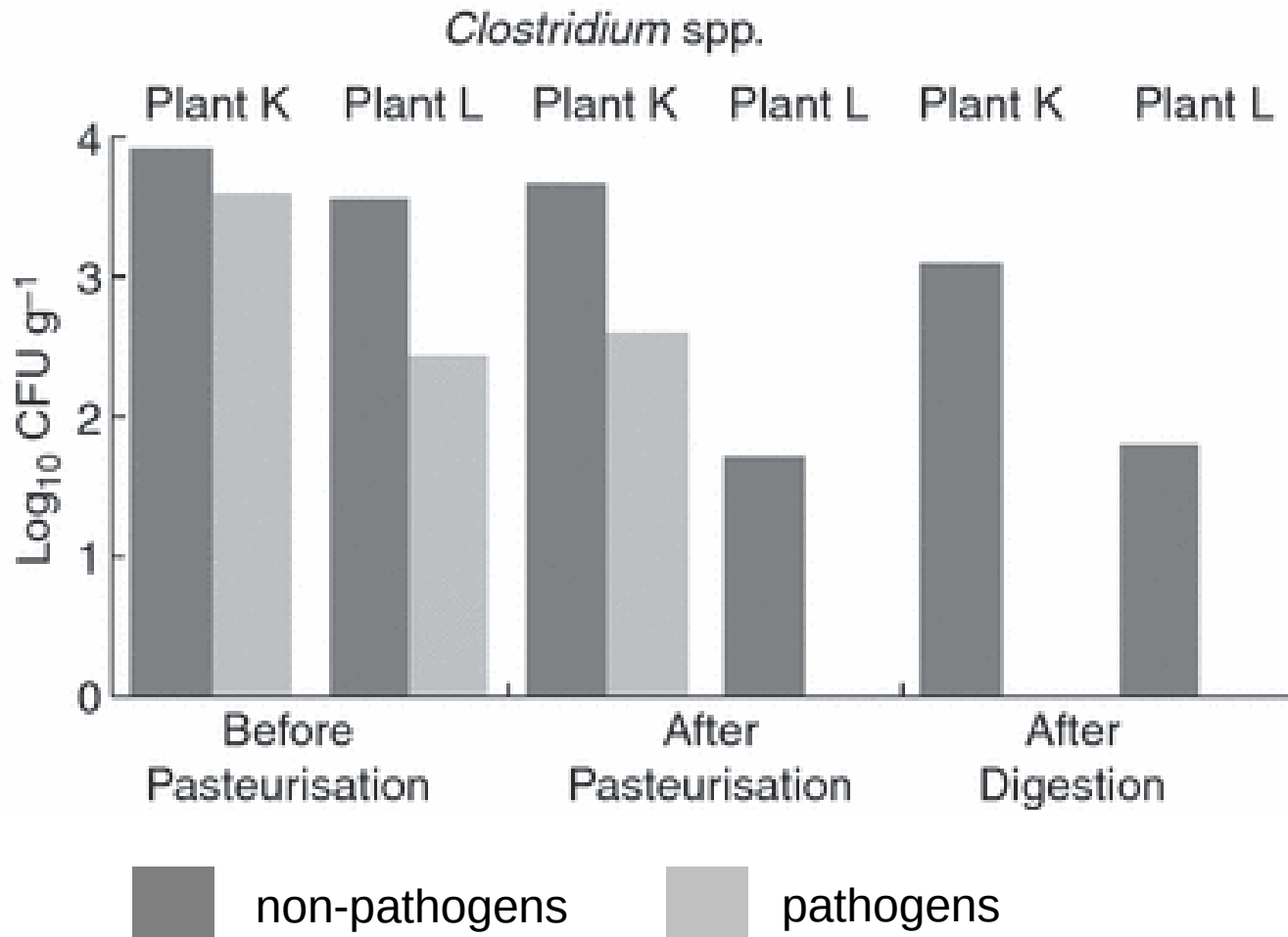


Figure 3 Mean values of the quantities of bacteria representing *Clostridium* spp. in different sampling materials. SH, slaughterhouse waste from slaughterhouses U and K; BG, biogas plants K and L; BP, before pasteurization; AP, after pasteurization; AD, after digestion.

(Bagge et al. 2010)

Clostridiendichte zu unterschiedlichen Phasen des Biogasprozesses



(Bagge et al. 2010)

Gliederung

- 1. Einleitung**
- 2. Studiendesign**
- 3. Gesamtkeimzahlen in Gärsubstraten und Gärresten; Spektrum der Mikroflora**
- 4. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

Studie zum mikrobiologischen Risikopotenzial von Biogasanlagen



Projektnehmer:

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

Förderung:

- Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung

Studiendesign:

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

Mikrobiologische Analytik in Gärsubstraten und Gärresten:

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

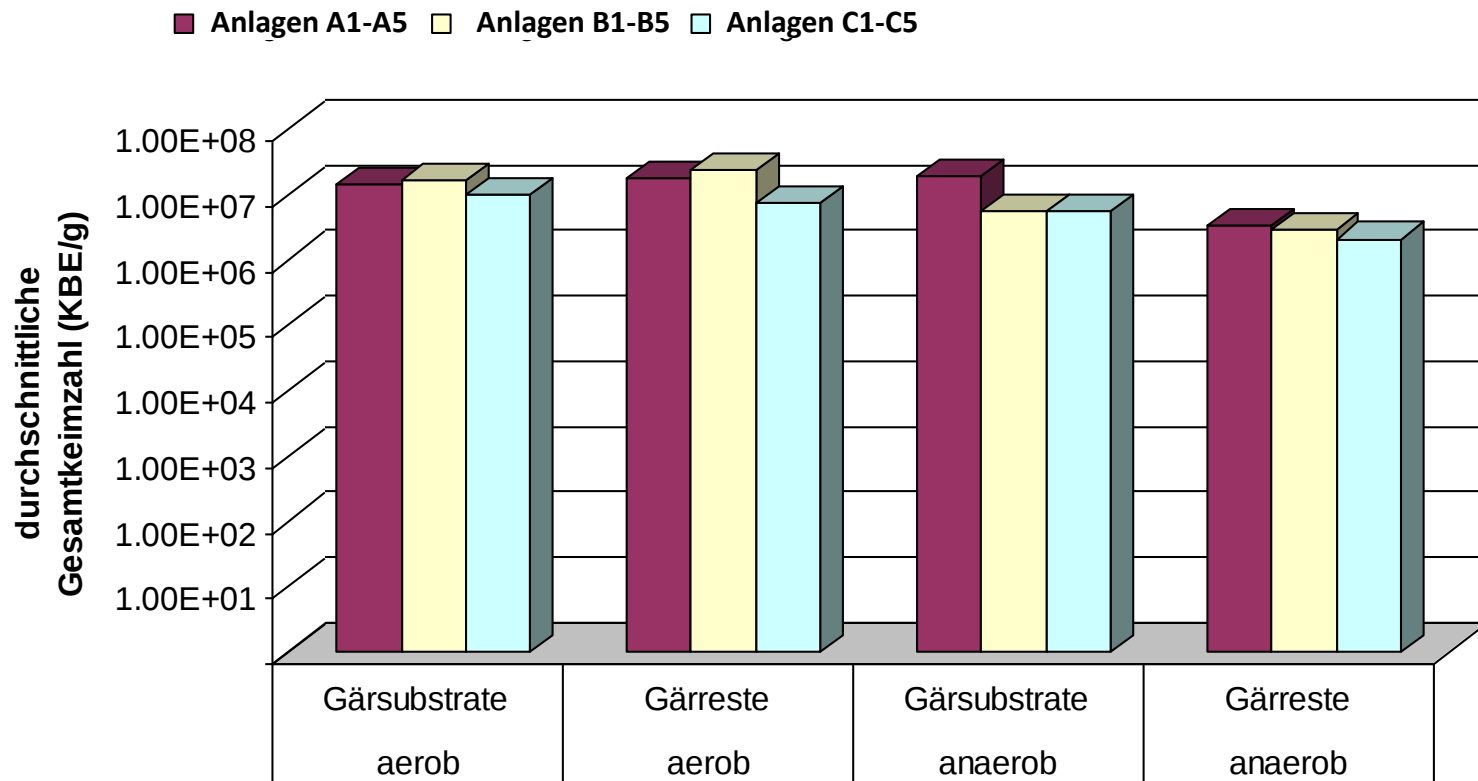
Übersicht Anlagentyp und Gärsubstrate

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

Gliederung

- 1. Einleitung**
- 2. Studiendesign**
- 3. Gesamtkeimzahlen in Gärsubstraten und Gärresten; Spektrum der Mikroflora**
- 4. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

Gesamtkeimzahlen (aerob/anaerob) in Gärsubstraten und Gärresten



Spektrum der Mikroflora; Anlagen A1-A5

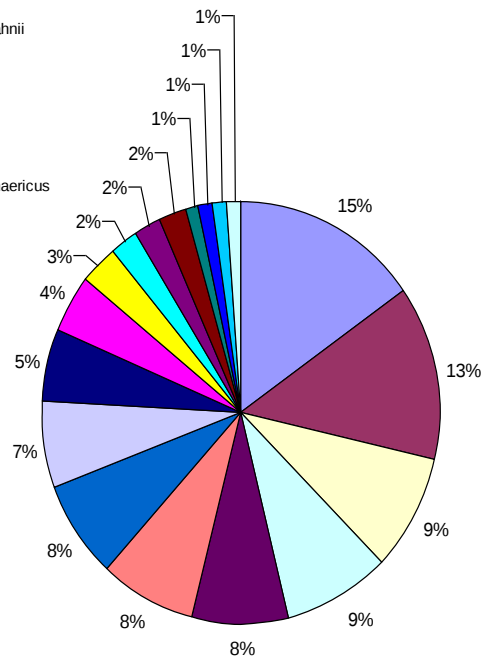
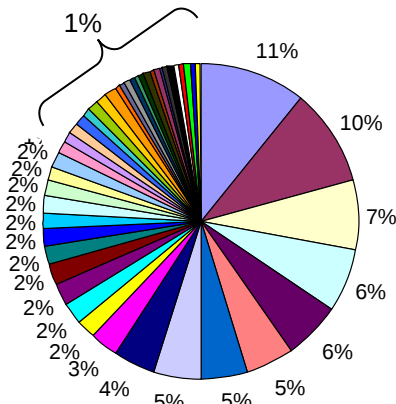
Gärsubstrate

Gärreste

■ **Bacillus spp.**
 ■ **Micrococcus spp.**
 ■ **Clostridium perfringens**
 ■ *Alcaligenes faecalis*
 ■ *Clostridium bifermentans*
 ■ *Clostridium butyricum*
 ■ Hefen
 ■ *Bifidobacterium spp.*
 ■ *Enterococcus spp.*
 ■ *Scopulariopsis brevicaulis*
 ■ *Aneurinibacillus spp.*
 ■ *Bacillus pumilus*
 ■ *Enterobacter asburiae*
 ■ *Escherichia coli*
 ■ *Paenibacillus spp.*
 ■ *Streptococcus infantarius/lutetiensis*

■ unbekannter Erreger
 ■ **Streptococcus spp.**
 ■ **Enterococcus spp.**
 ■ *Bacillus cereus* group
 ■ *Clostridium tertium*
 ■ *Enterococcus cecorum*
 ■ *Pichia fermentans*
 ■ *Clostridium sporogenes*
 ■ *Escherichia coli*
 ■ *Staphylococcus spp.*
 ■ *Bacillus spp.*
 ■ *Clostridium D11-0088-1-1-16*
 ■ *Enterobacter spp.*
 ■ *Lactobacillus curvatus*
 ■ *Proteus mirabilis*

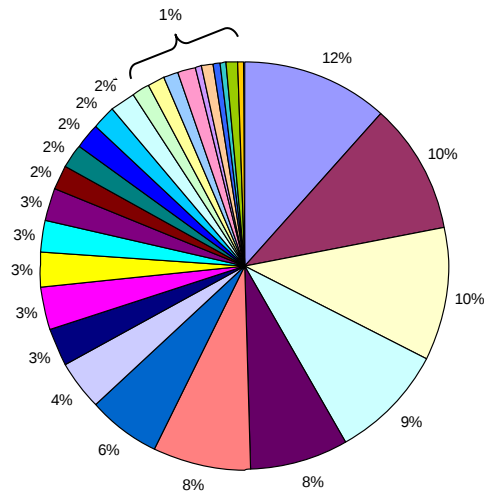
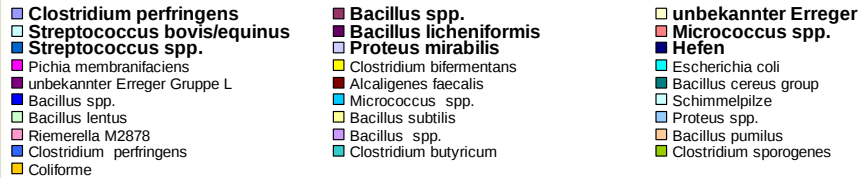
■ **Streptococcus bovis/equinus**
 ■ **Bacillus licheniformis**
 ■ **Schimmelpilze**
 ■ *Clostridium baratii*
 ■ *Staphylococcus spp.*
 ■ *Geotrichum candidum/klebahnii*
 ■ *Pseudomonas spp.*
 ■ *Clostridium spp.*
 ■ *Proteus vulgaris*
 ■ *Absidia corymbifera*
 ■ *Bacillus lentus*
 ■ *Clostridium tyrobutyricum*
 ■ *Enterococcus faecium*
 ■ *Lysinibacillus fusiformis/sphaericus*
 ■ *Raoultella ornithinolytica*



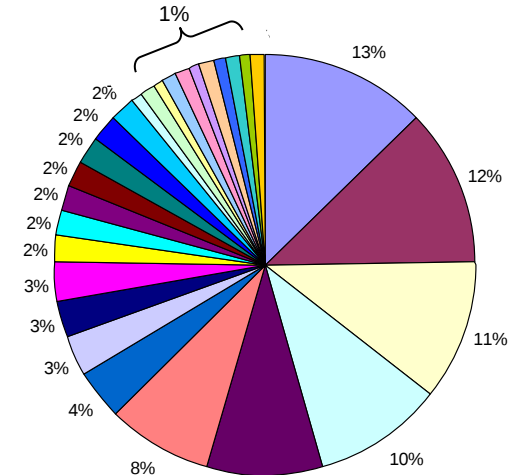
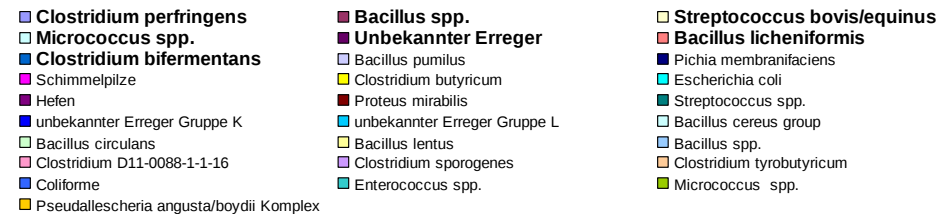
■ **Bacillus spp.**
 ■ unbekannter Erreger
 ■ **Enterococcus spp.**
 ■ **Streptococcus spp.**
 ■ **Micrococcus spp.**
 ■ **Schimmelpilze**
 ■ **Streptococcus bovis/equinus**
 ■ **Clostridium perfringens**
 ■ *Bacillus cereus* group
 ■ *Clostridium bifermentans*
 ■ *Clostridium sporogenes*
 ■ *Alcaligenes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

Spektrum der Mikroflora; Anlagen B1-B5

Gärsubstrate

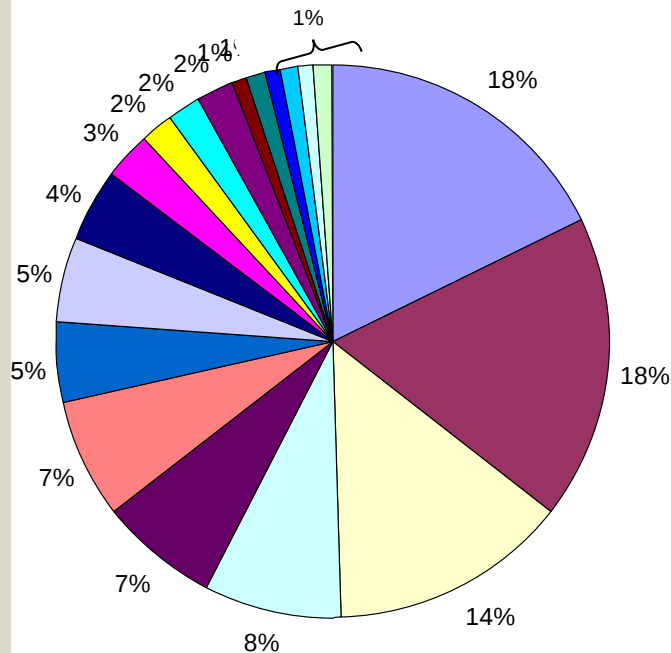


Gärreste



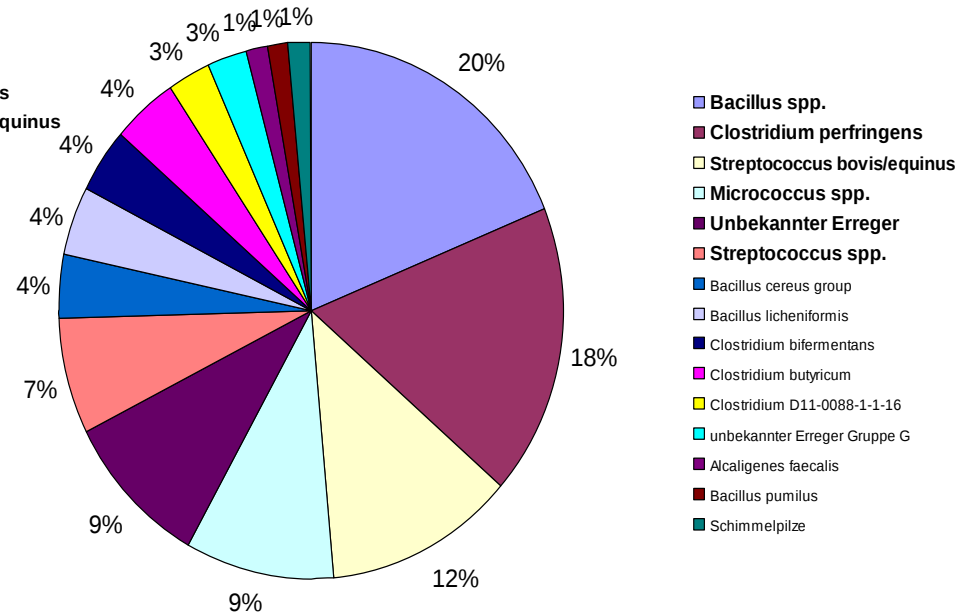
Spektrum der Mikroflora; Anlagen C1-C5

Gärsubstrate



- Bacillus spp.
- Clostridium perfringens
- Streptococcus bovis/equinus
- Bacillus cereus group
- Bacillus licheniformis
- Unbekannter Erreger
- Micrococcus spp.
- Schimmelpilze
- Aspergillus fumigatus
- Clostridium bifermentans
- Enterococcus cecorum
- Proteus mirabilis
- Streptococcus spp.
- Clostridium perfringens
- Clostridium baratii
- Clostridium butyricum
- Clostridium D11-0088-1-1-16
- Clostridium spp.
- Proteus vulgaris

Gärreste



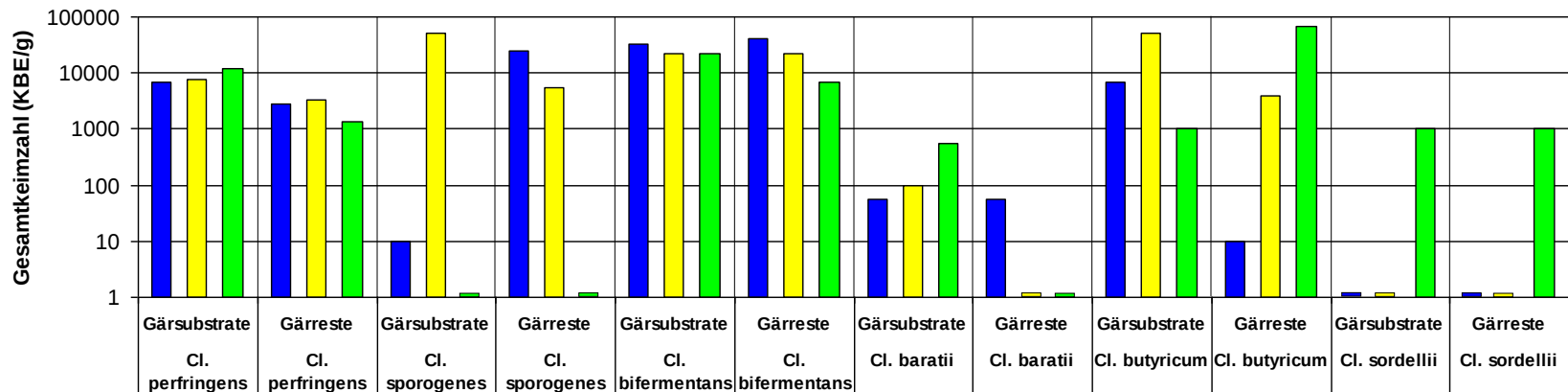
- Bacillus spp.
- Clostridium perfringens
- Streptococcus bovis/equinus
- Micrococcus spp.
- Unbekannter Erreger
- Streptococcus spp.
- Bacillus cereus group
- Bacillus licheniformis
- Clostridium bifermentans
- Clostridium butyricum
- Clostridium D11-0088-1-1-16
- unbekannter Erreger Gruppe G
- Alcaligenes faecalis
- Bacillus pumilus
- Schimmelpilze

Gliederung

- 1. Einleitung**
- 2. Studiendesign**
- 3. Gesamtkeimzahlen in Gärsubstraten und Gärresten; Spektrum der Mikroflora**
- 4. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

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

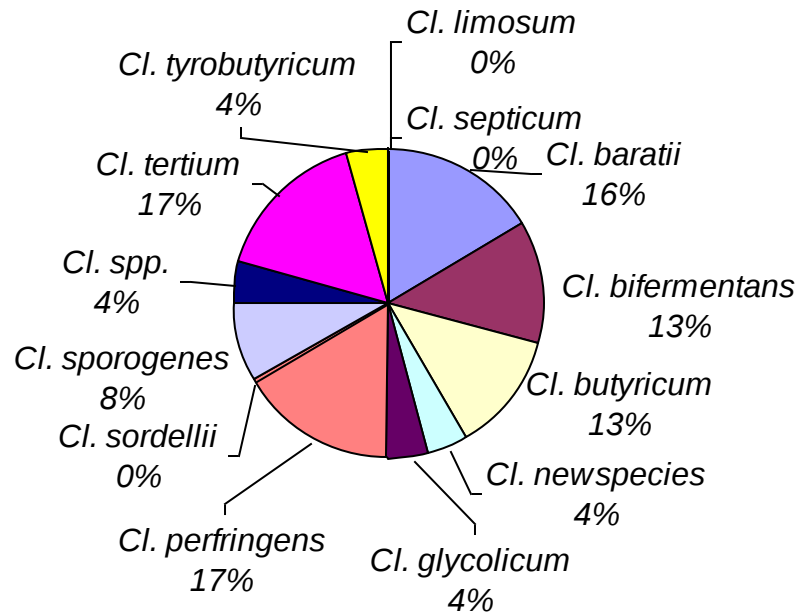
■ Anlagen A1-A5 ■ Anlagen B1-B5 ■ Anlagen C1-C5



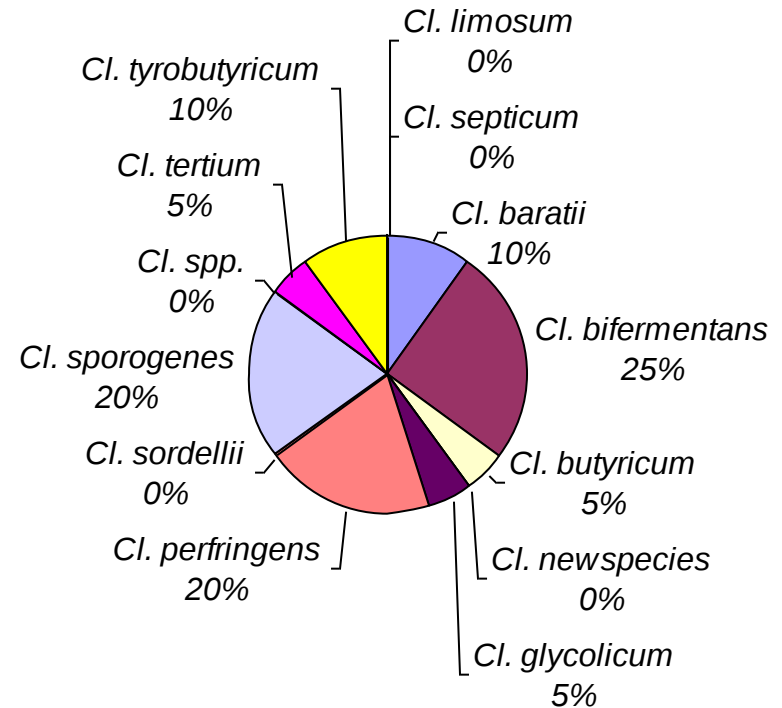
Clostridien Gärsubstrate und Gärreste

Anlagen A1-A5

Gärsubstrate



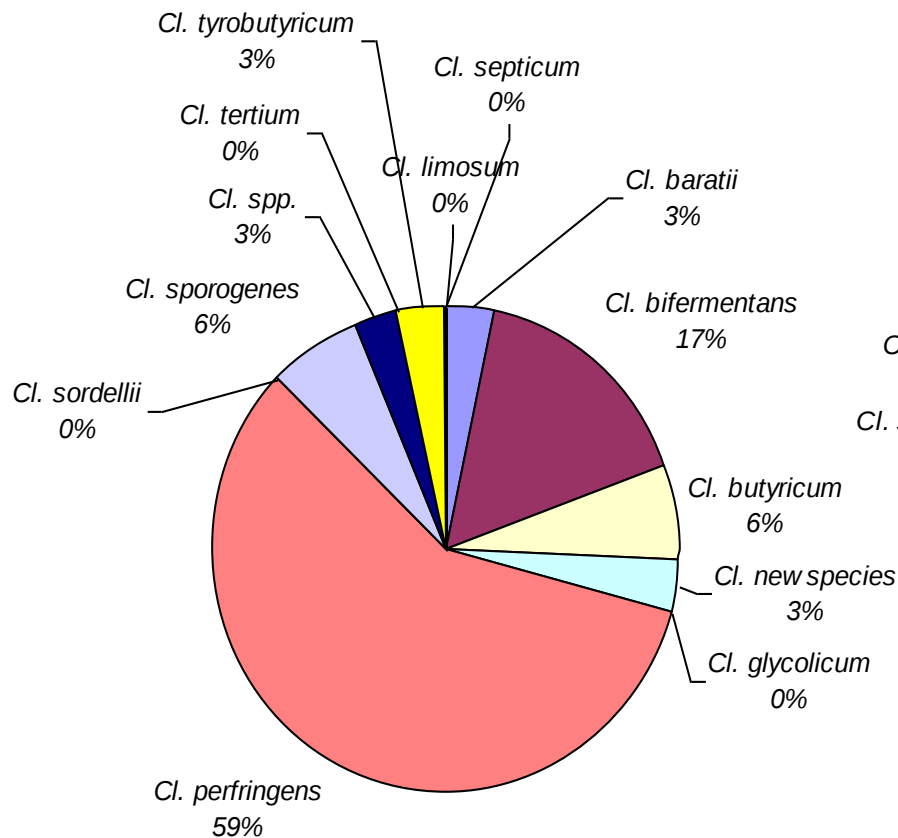
Gärreste



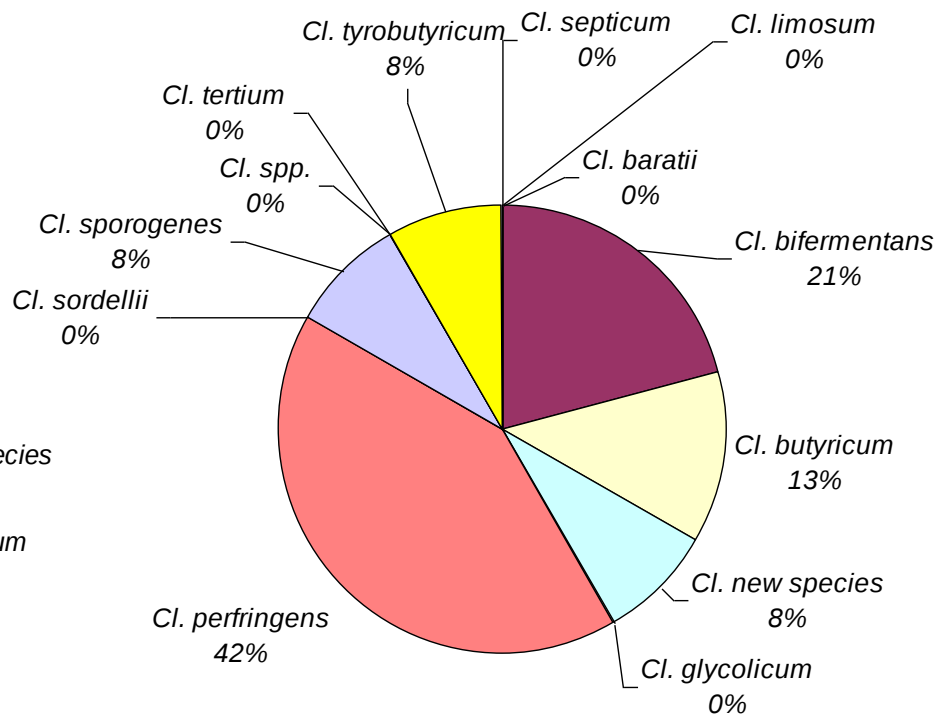
Clostridien Gärsubstrate und Gärreste

Anlagen B1-B5

Gärsubstrate



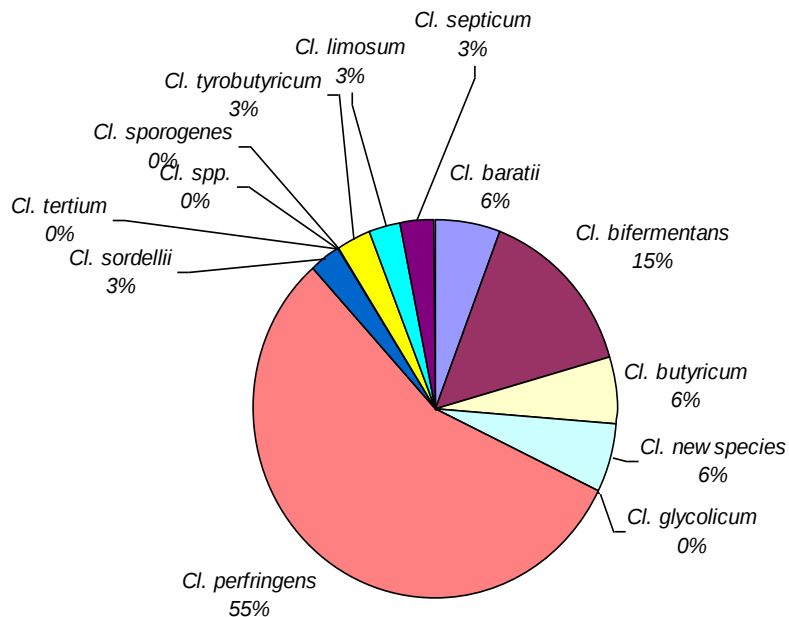
Gärreste



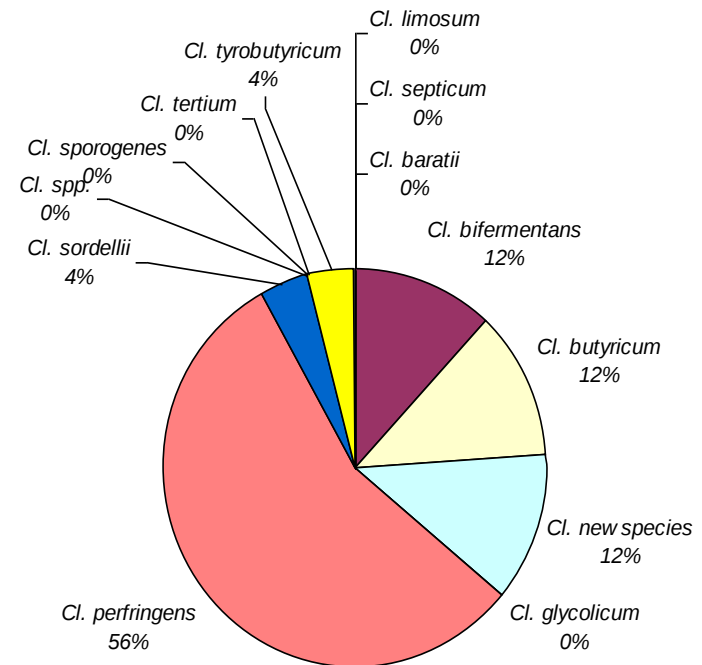
Clostridien Gärsubstrate und Gärreste

Anlagen C1-C5

Gärsubstrate



Gärreste



Gliederung

- 1. Einleitung**
- 2. Studiendesign**
- 3. Gesamtkeimzahlen in Gärsubstraten und Gärresten; Spektrum der Mikroflora**
- 4. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

Untersuchung auf Neurotoxin-bildende Stämme von *Clostridium botulinum*



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

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

Gliederung

- 1. Einleitung**
- 2. Studiendesign**
- 3. Gesamtkeimzahlen in Gärsubstraten und Gärresten; Spektrum der Mikroflora**
- 4. Clostridien-Verteilung in unterschiedlichen Anlagetypen**
- 5. *Clostridium botulinum* Neurotoxin bildende Stämme**
- 6. Vorkommen und Toxizität von *Clostridium perfringens***

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

An-lagen	Pro-ben	N	<i>Cl. perfringens</i> positiv in %	Iso-late (N)	Multiplex PCR								α -Toxin Nagler-Einheiten (NE)		
					Majorletale Toxine						Minorletale Toxine		≤ 8 NE	16-32 NE	≥ 64 NE
					α -Toxin	$\beta 1$ -Toxin	$\beta 2$ -Toxin	NetB-Toxin	Epsilon-Toxin	Jota-Toxin	μ -Toxin Hyaluronidase	Theta-Toxin			
A	G.substrate	20	20,0	4	4	0	1	0	0	0	k. A.	4	4	-	-
	Gärreste	15	26,4	4	4	0	1	0	0	0	k. A.	4	4	-	-
B	G.substrate	20	90,0	18	18	0	0	0	0	0	k. A.	18	11	7	-
	Gärreste	15	66,6	10	10	0	0	0	0	0	k. A.	10	3	6	1
C	G.substrate	20	95,0	19	19	0	6	0	0	0	k. A.	19	15	1	3
	Gärreste	15	86,6	14	14	0	5	0	0	0	k. A.	14	12	1	1

Zusammenfassung



Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen:

- Kein Nachweis von Neurotoxin produzierendem *Cl. botulinum* in Gärsubstraten und Gärresten
- Kein Nachweis von Salmonellen und pathogenen *E. coli* in Gärsubstraten und Gärresten
- Kein Hinweis auf mikrobielle Anreicherungen während des Fermentationsprozesses



Danksagung

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