

Umweltforschungsplan

des Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und Reaktorsicherheit

Aufgabenschwerpunkt Umwelt und Gesundheit

Forschungskennzahl 371171240

Risikoanalyse der bodenbezogenen Verwertung kommunaler Klärschlämme unter Hygieneaspekten

von

Magdalene Pietsch

Yvonne Schleusner

René Eling

Petra Müller

Werner Philipp

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig

Universität Hohenheim, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik (460), Fachgebiet Umwelt und Tierhygiene (406b), Garbenstr. 30, 70593 Stuttgart

IM AUFTRAG
DES UMWELTBUNDESAMTES

April 2014

Berichtskennblatt

Berichtsnummer	
Titel des Berichts	Risikoanalyse der bodenbezogenen Verwertung kommunaler Klärschlämme unter Hygieneaspekten
Autor(en) (Name, Vorname)	Pietsch, Magdalene ¹ ; Schleusner, Yvonne ² ; Eling, René ³ ; Müller, Petra ² ; Philipp, Werner ³ ; Ludwig E. Hoelzle ³
Durchführende Institution (Name, Anschrift)	<p>(1) Julius Kühn – Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit Messeweg 11/12 38104 Braunschweig</p> <p>(2) Julius Kühn – Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit Stahnsdorfer Damm 81 D-14532 Kleinmachnow</p> <p>(3) Universität Hohenheim Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik (460) Fachgebiet Umwelt und Tierhygiene (406b) Garbenstr. 30 70593 Stuttgart</p>
Fördernde Institution	Umweltbundesamt Postfach 14 06 06813 Dessau-Roßlau
Abschlussjahr	2014
Forschungskennzahl (FKZ)	371171240
Seitenzahl des Berichts	153
Schlagwörter	Klärschlamm, Hygienisierung, weitergehende Klärschlammbehandlung, Seuchenerreger, Krankheitserreger, Pflanzenkrankheitserreger, Unkräuter, <i>Synchytrium endobioticum</i> , landwirtschaftliche Verwertung

Report Cover Sheet

Report No.	
Report Title	Risk analysis of using communal sludge on soils in terms of hygiene
Author(s) (Family Name, First Name)	Pietsch, Magdalene ¹ ; Schleusner, Yvonne ² ; Eling, René ³ ; Müller, Petra ² ; Philipp, Werner ³ ; Ludwig E. Hoelzle ³
Performing Organisation (Name, Address)	<p>(1) Julius Kühn – Institut (JKI) Federal Research Centre for Cultivated Plants Institute for national and international Plant Health Messeweg 11/12 38104 Braunschweig</p> <p>(2) Julius Kühn – Institut (JKI) Federal Research Centre for Cultivated Plants Institute for national and international Plant Health Stahnsdorfer Damm 81 D-14532 Kleinmachnow</p> <p>(3) University of Hohenheim Institute of Environmental and Animal Hygiene and Veterinary Medicine (with Animal Clinic) (460) Environmental and Animal Health Garbenstr. 30 D-70593 Stuttgart</p>
Funding Agency	Umweltbundesamt Postfach 14 06 06813 Dessau-Roßlau
Report Date (Year)	2014
Project No. (FKZ)	371171240
No. of Pages	153
Keywords	Sewage sludge, sanitization, pathogens, plant pathogens, weeds, <i>Synchytrium endobioticum</i> , agricultural utilization

Kurzbeschreibung

Die in Deutschland derzeit gültige Fassung der Klärschlammverordnung von 1992 (AbfKlärV, 1992) soll novelliert und dabei hygienischen Belangen mehr Rechnung getragen werden. Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, verschiedene Risikominderungsmaßnahmen im Hinblick auf ihre Eignung zur Verbesserung der Klärschlammhygiene zu prüfen und daraus Empfehlungen für die Ausgestaltung der AbfKlärV abzuleiten. Besonders persistente Schadorganismen und Krankheitserreger wurden in gezielten Untersuchungen auf deren Überlebensfähigkeit während einer thermischen Behandlung bzw. einer Langzeitlagerung von Klärschlamm und/oder anderen Wirtschaftsdüngern untersucht. Des Weiteren wurde das Verfahren der Hochdrucktemperatur-Pelletierung (HTP) geprüft. Untersucht wurde die Tenazität von *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4, thermoresistenter Parvoviren (Bovines Parvovirus, BPV) und von Sporen aerober und anaerober Sporenbildner (*Bacillus globigii*, *Clostridium sporogenes*) als Vertreter der Seuchenhygiene und *Synchytrium endobioticum* als Vertreter der Phytohygiene. Das Ergebnis einer Literaturrecherche ergab, dass der überwiegende Teil der vorrangig in Klärschlamm vorkommenden Schadorganismen der Seuchen- und Phytohygiene durch die in den Entwürfen zur Novellierung der AbfKlärV in Anhang 2 aufgeführten Behandlungsverfahren inaktiviert werden kann. Ausnahmen bilden vor allem Quarantäneschadorganismen der Kartoffel bzw. Schadorganismen, die persistente Überdauerungsorgane bilden oder thermoresistent sind. Dies wurde durch eigene Untersuchungen bestätigt. So verringerte sich die Zeitspanne für eine vollständige Inaktivierung des Erregers EAHEC O104:H4 Serovar von 18 Stunden bei einer thermischen Behandlung von +53 °C auf 2 Stunden bei +60 °C und 1 Stunde bei +70 °C. Das bovine Parvovirus konnte, bei einer einstündigen Erhitzung von Klärschlamm bzw. Gülle auf max. +80 °C, um 1-2 log₁₀-Stufen bzw. 2,4 - 3,4 log₁₀-Stufen verringert werden. Demgegenüber war eine Inaktivierung der untersuchten Sporenbildner erst bei einer Behandlung von +110 °C für dreißig Minuten bzw. +133 °C für zwanzig Minuten möglich. Die persistenten Dauersori des Kartoffelkrebserregers *Synchytrium endobioticum* konnten selbst bei 140° C über 2 Stunden nicht ausreichend inaktiviert werden, eine Langzeitlagerung im Klärschlamm führte jedoch zu einer deutlichen Reduktion vitaler Dauersori. Aus seuchen- und phytohygienischer Sicht wird eine Pflicht zur weitergehenden Behandlung von Klärschlämmen empfohlen. Zum Schutz vor einer Verbreitung von Quarantäneschadorganismen der Kartoffel, sollte Klärschlamm nur dann zur landwirtschaftlichen Verwertung zugelassen werden, wenn keine risikoreichen Abwässer aus Industrie und Gewerbe in die Kläranlage eingeleitet worden sind.

Abstract

Actually the Sewage Sludge Ordinance of 1992 is in force in Germany. This ordinance has to be amended and in the new version sanitation aspects will be incorporated to a greater extent than before. The aim of this research work was to check different risk minimizing measures in respect to their suitability for the improvement of the sewage sludge hygiene and deduce recommendations for the preparation of the Sewage Sludge Ordinance. Extremely persistent pests and pathogens were tested on their survival ability during heat treatment resp. a long-term storage in sewage sludge and/or in other organic fertilizers. Furthermore the procedure of the high pressure temperature pelleting (HTP) was checked. The tenacity of *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4, thermo-resistant parvoviruses (Bovines Parvovirus, BPV) and of spores of aerobe and anaerobe spore builders (*Bacillus globigii*, *Clostridium sporogenes*) as representatives of the epidemics of human and animals and *Synchytrium endobioticum* as a representative of phytopathogens was investigated. The result of a literature research revealed that most pathogens of human, animals and plants as well as weeds which may occur in sewage sludge can be inactivated by the treatment procedures that are listed in Annex II in the draft amendment of the Sewage Sludge Ordinance. Exemptions are mainly quarantine pests of the potato resp. pathogens that build persistent survival organs or are heat-resistant. This was confirmed by own investigations. Thus the duration for a complete inactivation of the pathogen EAHEC O104:H4 Serovar was reduced from 18 hours in the course of a heat treatment at 53 °C to 2 hours at 60 °C and 1 hour at 70 °C. The bovine parvovirus was reduced in the course of

a one-hour heating of sewage sludge resp. liquid manure to max. 80 °C by 1-2, resp. 2.4 to 3.4 log₁₀-levels. In contrast, an inactivation of the tested spore builders was only possible during a treatment at 110 °C for thirty minutes resp. 133 °C for twenty minutes. The persistent resting sporangia of the causal agent of the potato wart disease, *Synchytrium endobioticum*, was not even inactivated sufficiently at a temperature of 140 °C for 2 hours. However, a long-term storage in sewage sludge led to a clear reduction of vital resting sporangia. From the view of human, animal and plant health the obligation for an efficient sanitizing treatment for sewage sludge is recommended. As a protection against the spread of quarantine pests of the potato, sewage sludge should only be approved for agricultural use in the case that no risky waste water from industry and trade were fed into the sewage purification plant.

Inhaltsverzeichnis

Umweltforschungsplan.....	1
1 Zusammenfassung.....	15
2 Summary.....	24
3 Einleitung.....	33
4 Untersuchungen zum Einfluss von Druck und Temperatur auf seuchen- und phytohygienisch relevante Schadorganismen in Klärschlamm	40
4.1 Seuchenhygiene	40
4.1.1 Einleitung.....	40
4.1.2 Material und Methoden	41
4.1.3 Ergebnisse	48
4.1.4 Diskussion.....	75
4.2 Phytohygiene.....	82
4.2.1 Einleitung.....	82
4.2.2 Methodvalidierung	83
4.2.3 Material und Methoden	92
4.2.4 Ergebnisse und Diskussion	96
5 Hygieneanforderungen hinsichtlich Umgang und Verwertung von Klärschlämmen.....	118
5.1 Literaturbasierte Bewertung von weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren hinsichtlich ihrer reduzierenden Wirkung auf Krankheitserreger und Schadorganismen.....	118
5.1.1 Thermische Verfahren.....	118
5.1.2 pH-Wirkung im alkalischen Bereich.....	120
5.1.3 Kompostierung.....	120
5.1.4 Langfristige Aufbewahrung	122
5.1.5 Hochtemperaturtrocknung	122
5.1.6 Diskussion.....	123
5.2 Hygieneaspekte bei der Qualitätssicherung von Klärschlammprodukten.....	131
5.2.1 Einleitung.....	131
5.2.2 Vorgesehene Maßnahmen der Qualitätssicherung in der Klärschlammverordnung	131
5.2.3 Bewertung hygienischer Risiken durch einen Träger der Qualitätssicherung	132
5.2.4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen.....	137
Literatur.....	140
Anhang I	151
Anhang II	152

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mittlere Reduktionswerte R (log ₁₀) für EAHEC O104:H4 in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen aus allen Versuchsdurchgängen.	53
Abbildung 2:	Mittlere Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen aus allen Versuchsdurchgängen	58
Abbildung 3:	Mittlere Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Salmonella</i> Serovar Typhimurium DT120 (monophasische) in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen aus allen Versuchsdurchgängen.	63
Abbildung 4:	Nachweis (Virustiter in log KID ₅₀ /ml) von BPV und Reduktionswerte R (als Negativwert log ₁₀) in den Kontrollproben sowie in Klärschlamm und Gülle nach Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) bzw. 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde.	65
Abbildung 5:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Bacillus globigii</i> und <i>Clostridium sporogenes</i> in der Sporensuspension, im Klärschlamm und Gülle nach Erhitzung bei 90 °C (+/-2 °C), 98 °C (+/-2 °C), 110 °C (+/-2 °C) und 133 °C (+/-2 °C).	68
Abbildung 6:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für EAHEC in der Bakteriensuspension (bei 6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).	70
Abbildung 7:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Salmonella</i> Typhimurium DT120 (monophasisch) in der Bakteriensuspension (6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).	72
Abbildung 8:	Reduktionswerte R (log ₁₀) <i>Escherichia coli</i> K12, <i>Salmonella</i> Typhimurium Zoosaloral und <i>Bacillus globigii</i> in den Pellets, dem Staub-Pellet-Gemisch nach der Pelletierung und in den unbehandelten Holzspänen (beimpft) am Ende des Versuchs.	75
Abbildung 9:	mögliche Ausgangsmaterialien für die Untersuchungen mit dem Erreger <i>Synchytrium endobioticum</i> ;	85
Abbildung 10:	Ergebnis der Datenanalyse zur Ermittlung eines Zusammenhanges zwischen dem Gewicht und der Anzahl getrockneter Dauersori isoliert aus 40 g Quarzsandpräparat 2006/2/P1; dargestellt ist die Anzahl Dauersori bei einem Gewicht von 0,00001 g (0,01 mg).	86
Abbildung 11:	Frontalansicht der Pelletieranlage, die im vorderen Bereich mit einem Käfig (D) versehen ist, um das Austreten von <i>S. endobioticum</i> mit den bei der Pelletierung entstehenden Stäuben zu verhindern. Im Käfig befindet sich die Vorrichtung für die Zufuhr der Sporensuspension zum Presskanal und der Matrize, wie auch die Vorrichtungen zum Trennen der Pellets vom nicht pelletierten Material. Des Weiteren zu sehen sind der Trichter (A) über den die Holzspäne für die Pelletierung zugeführt werden, Motor	

	(B), Kanal(C) zum Befeuchten und vermischen der Holzspäne (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)	90
Abbildung 12:	Blau eingefärbte Holzpellets aus dem Vorversuch zu den Untersuchungen in der Hochdrucktemperaturpelletieranlage mit <i>S. endobioticum</i> (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)	91
Abbildung 13:	Foto des vorderen Teils der Pelletieranlage nach erfolgter Pelletierung blau eingefärbter Holzspäne. Abgebildet sind der Presskanal (A), die Matrize (B) und die Vorrichtung zum Abtrennen der Pellets von der Matrize (C) der Pelletieranlage. Die Pfeile markieren unzugängliche Stellen, die eine Desinfektion der Maschine unmöglich machen; (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)	91
Abbildung 14:	Kartoffeln im Tuben-Test zur Überprüfung der Vitalität bzw. Virulenz der Dauersori. Die Kartoffeln sind über ein schwarzes Gummiband fest an den Tuben fixiert. Die Tuben (weiße, leicht konisch zulaufende Plastik-Zylinder) sind mit einem Gemisch aus gedämpfter Komposterde und Krebskompost befüllt. (Foto: Yvonne Schleusner, JKI).....	94
Abbildung 15:	Bewertung der Reaktion von Kartoffelsorten oder -genotypen auf den Erreger <i>S. endobioticum</i> an Hand der Symptome am Kartoffeltrieb (Fotos: Dr. K. Flath, JKI, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland);	95
Abbildung 16:	Einfluss einer thermischen Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen bei 133 °C und einem Druck von 3 bar für 20 Minuten auf Dauersori des Erregers <i>Synchytrium endobioticum</i> ; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent für beide Wiederholungen, je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt	96
Abbildung 17:	Einfluss einer thermischen Behandlung von Wasser 140 °C für 2 Stunden und einem Druck von 4 bar auf Dauersori des Erregers <i>S. endobioticum</i> ; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent	97
Abbildung 18:	Einfluss einer thermischen Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen bei 140 °C und einem Druck von 4 bar für 2 Stunden auf Dauersori des Erregers <i>Synchytrium endobioticum</i> ; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent für beide Wiederholungen, je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt	98
Abbildung 19:	Einfluss einer thermischen Behandlung von Klärschlamm der Uni Stuttgart bei 140 °C und einem Druck von 4 bar für 2 Stunden auf Dauersori des Erregers <i>Synchytrium endobioticum</i> ; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent für beide Wiederholungen, je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt	98
Abbildung 20:	Vergleich des Anteils rückisolierter vitaler Dauersori des Erregers <i>Synchytrium endobioticum</i> aus Klärschlamm aus Mühlhausen nach einer thermischen Behandlung bei 133 °C bzw. bei 140 °C	99
Abbildung 21:	Rückisolierungsrate vitaler Dauersori des Erregers <i>S. endobioticum</i> aus unbehandeltem und bei 133 °C bzw. 140 °C behandeltem Klärschlamm aus Mühlhausen im Vergleich zu unbehandeltem bzw. bei 133 °C behandeltem Klärschlamm, der für 6 Monate gelagert wurde	100

Abbildung 22: Einfluss einer Lagerung in Wasser auf Dauersori des Erregers *Synchytrium endobioticum*; dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 8 Zählungen und die STABW; d = Tag, W = Woche, M = Monat 102

Abbildung 23: Rückisolierungsrate vitaler, teilentleerter, leerer und denaturierter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Wasser; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 -7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt 103

Abbildung 24: Rückisolierungsrate vitaler, teilentleerter, leerer und denaturierter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt 104

Abbildung 25: Rückisolierungsrate von Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung aus Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt..... 105

Abbildung 26: Rückisolierungsrate vitaler Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung aus Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt..... 106

Abbildung 27: Rückisolierungsrate teilentleerter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt..... 107

Abbildung 28: Rückisolierungsrate leerer Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt 108

Abbildung 29: Rückisolierungsrate denaturierter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt..... 108

Abbildung 30: Tuben der Negativ-Kontrolle (links), der Positiv-Kontrolle (mitte) und der Infektion mit getrockneten Dauersori (rechts) 12 Wochen nach Infektion; in der Positiv-Kontrolle und bei Infektion mit getrockneten Dauersori sind bereits oberirdisch Gewebewucherungen zu sehen. (Foto: Yvonne Schleusner, JKI) 116

Abbildung 31:	Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen (rot markiert) als Reaktion auf eine Infektion mit <i>S. endobioticum</i> . Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die aus behandeltem Klärschlamm (20 Minuten bei 133 °C autoklaviert); Symptome entsprechen der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)	116
Abbildung 32:	Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen als Reaktion auf eine Infektion mit <i>S. endobioticum</i> . Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, aus Klärschlamm, behandelt bei 140 °C für 2 Stunden; Symptom entspricht der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)	116
Abbildung 33:	Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen markiert durch rote Pfeile, als Reaktion auf eine Infektion mit <i>S. endobioticum</i> . Aufnahme bei 18facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die 12 Wochen in Klärschlamm der Uni Stuttgart gelagert wurden; Symptome entsprechen der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)	117
Abbildung 34:	Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen in Form einer Linie (roter Pfeil) als Reaktion auf eine Infektion mit <i>S. endobioticum</i> . Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die 4 Wochen in Klärschlamm aus Möhringen gelagert wurden; Symptom entspricht der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI).....	117
Abbildung 35:	Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen als Reaktion (markiert durch roten Pfeil) auf eine Infektion mit <i>S. endobioticum</i> . Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die 4 Wochen in Klärschlamm aus Möhringen gelagert wurden; Symptom entspricht der Boniturnote 2 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI).....	117
Abbildung 36:	Stufen der Widerstandsfähigkeit von Krankheitserregern und Prüforganismen im Hinblick auf ihre Inaktivierung bei thermischer Behandlung nach Böhm (2007); entnommen aus: KTBL-Schrift 453, „Perspektiven der Klärschlammverwertung“	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Konzentrationen (mpn) von <i>Escherichia coli</i> und <i>Salmonella</i> ssp. in den Ausgangsmaterialien Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten. n.n.: nicht nachweisbar.....	48
Tabelle 2:	Konzentrationen (KbE/ml) von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben, gelagert bei 6 °C (+/-2 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	49
Tabelle 3:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für EAHEC O104:H4 in den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C) im Vergleich zu den Ausgangsproben. n.d.: nicht durchgeführt.....	49
Tabelle 4:	Konzentrationen (KbE/ml) von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	50
Tabelle 5:	Reduktionswerte R (log ₁₀) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	51
Tabelle 6:	Konzentrationen (KbE/ml) von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für 4 bzw. 18 Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt. n.d.: nicht durchgeführt.....	51
Tabelle 7:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für die Ausgangsproben, die Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für eine, zwei bzw. vier Stunden, sowie die Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	52
Tabelle 8:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	54
Tabelle 9:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	54
Tabelle 10:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	55
Tabelle 11:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	56
Tabelle 12:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach	

	Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt.....	56
Tabelle 13:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Escherichia coli</i> DSM 682 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	57
Tabelle 14:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Salmonella</i> Typhim. DT120 (monoph.) in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	59
Tabelle 15:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Salmonella</i> Typhim. DT120 (monoph.) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für 4 bzw. 18 Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	59
Tabelle 16:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Salmonella</i> Typhim. DT120 (monoph.) in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für 4 bzw. 18 Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	60
Tabelle 17:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Salmonella</i> Typhim. DT120 (monoph.) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	60
Tabelle 18:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Salmonella</i> Typhim. DT120 (monoph.) in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (+6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	61
Tabelle 19:	Reduktionswerte R (log ₁₀) für <i>Salmonella</i> Typhim. DT120 (monoph.) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt	62
Tabelle 20:	Übersicht: Mittlere Reduktionswerte (log ₁₀) für EAHEC, <i>Escherichia coli</i> DSM 682 und die monophasische Variante der <i>Salmonella</i> Serovar Typhimurium DT120 in Klärschlamm, Gülle und Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen.	63
Tabelle 21:	Konzentrationen (log Titer KID ₅₀ /ml) sowie Reduktionswerte R (log ₁₀) für das bovine Parvovirus (BPV) in den Kontroll- (6 °C) und den Testproben in Klärschlamm und Gülle bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde.	64
Tabelle 22:	Konzentrationen (log Titer KID ₅₀ /ml) sowie Reduktionswerte R (log ₁₀) für das bovine Parvovirus (BPV) in den Kontroll- (6 °C) und den Testproben in Klärschlamm und Gülle bei 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde.	64
Tabelle 23:	Konzentrationen (KbE/ml) von <i>Bacillus globigii</i> in der Sporensuspension und den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-1 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-1 °C) für 20 Minuten. n.d.: nicht durchgeführt.....	66

Tabelle 24: Reduktionswerte (\log_{10}) für *Bacillus globigii* in der Sporensuspension, den beimpften Ausgangssubstraten und in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten..... 66

Tabelle 25: Konzentrationen (KbE/ml) von *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension und den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, +98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-1 °C) für 20 Minuten. n.d.: nicht durchgeführt..... 67

Tabelle 26: Reduktionswerte (\log_{10}) von *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension und den beimpften Ausgangssubstraten in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für 1 Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten. n.d.: nicht durchgeführt..... 68

Tabelle 27: Konzentrationen (KbE/ml bzw. KbE/g) für den Nachweis von EAHEC O104:H4 in der Bakteriensuspension (+6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten an Tag 0 und nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei +10 °C (+/-2 °C). 69

Tabelle 28: Reduktionswerte R (\log_{10}) für EAHEC in der Bakteriensuspension (bei 6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C)..... 70

Tabelle 29: Konzentrationen (KbE/ml bzw. g) für den Nachweis von *Salmonella* Typhimurium DT120 (monoph.) in der Bakteriensuspension (6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten an Tag 0 , nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C)..... 71

Tabelle 30: Reduktionswerte R (\log_{10}) für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in der Bakteriensuspension (6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C). 71

Tabelle 31: Konzentrationen (KbE/ml bzw. g) für den Nachweis von *Bacillus globigii* in der Bakteriensuspension (+6 °C) und im Klärschlamm, in Gülle und Gärprodukten an Tag 0 und nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei +10 °C (+/-2 °C). 72

Tabelle 32: Reduktionswerte R (\log_{10}) *Bacillus globigii* in der Bakteriensuspension (6 °C) und im Klärschlamm, in Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C). 73

Tabelle 33: Konzentrationen (KbE/ml) von *Escherichia coli* K12, *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral und *Bacillus globigii* in der Keim- bzw. Sporensuspension, den beimpften Holzspänen zu Beginn des Versuchs, in den Pellets, dem Staub-Pellet-Gemisch und in den Holzspänen am Ende des Versuchs in der Hochdrucktemperatur-Pelletierungsanlage. n.d.: nicht durchgeführt..... 74

Tabelle 34: Reduktionswerte (\log_{10}) für *Escherichia coli* K12, *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral und *Bacillus globigii* in den Pellets, dem Staub-Pellet-Gemisch

	nach der Pelletierung und in den unbehandelten Holzspänen (beimpft) am Ende des Versuchs. n.d.: nicht durchgeführt.....	74
Tabelle 35:	Anzahl Dauersori in 35 ml Sporensuspension bei nacheinander durchgeführten Isolierungen aus ein und demselben Ausgangsmaterial (40 g Krebskompost).....	84
Tabelle 36:	Vergleich der Anzahl in Klärschlamm eingebrachter Dauersori mit der Zahl zurückisolierter Dauersori, bei Verwendung von 200 ml Wasser bzw. Kalium-Phosphat-Puffer zur Isolierung; *Isolierung der Dauersori mit 400 ml Wasser	87
Tabelle 37:	Boniturschema für die Beurteilung des Zustandes der Dauersori; Aufnahme bei 200facher Vergrößerung; Größe der Dauersori: 25 - 75 µm; Größe von Gelbrostsporen: 14-30 x 13-23 µm (Fotos: Yvonne Schleusner, JKI)	88
Tabelle 38:	Versuchsaufbau der Autoklaviersuche.....	93
Tabelle 39:	Boniturschlüssel nach Stachewicz (Bartels und Backhaus, 2000) unter Angabe der Boniturnote und Symptomausprägung	95
Tabelle 40:	Zusammensetzung der untersuchten Klärschlämme	110
Tabelle 41:	Versuchsaufbau und Boniturergebnisse des ersten Biotestes zur Überprüfung der Pathogenität nach erfolgter thermischer Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen (K=Kontrolle, B= behandelt, DS=Dauersori)	113
Tabelle 42:	Versuchsaufbau des zweiten Biotestes zur Überprüfung der Pathogenität nach erfolgter thermischer Behandlung von Klärschlamm der Uni Stuttgart bzw. nach erfolgter Lagerung unterschiedlicher Klärschlämme für 4 Wochen, 12 Wochen und 5 Monate; (K=Kontrolle, B= behandelt, DS=Dauersori, M=Monate, W= Wochen)	114
Tabelle 43:	Behandlungsverfahren, die in Anlage 2 des Entwurfes zur Novellierung der AbfklärV (2010 bzw. 2013) gelistet sind, als weitergehende Verfahren zur Hygienisierung von Klärschlamm, deren zugrundeliegende Wirkmechanismen, einzuhaltende Konditionen sowie deren Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen	125

Klärschlammhygiene

µl *Mycroliter*
AbfklärV *Klärschlammverordnung*
ASFV *Afrikanische Schweinepest-Virus*
B *behandelt*
BioAbfV *Bioabfallverordnung*
BMU *Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit*
BPLS-Agar *Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar*
BPV *bovine Parovirus*
CPE *cytopathischen Effekts*
Cr *Chrom*
d *Tag*
DS *Dauersori*
DüMV *Düngemittelverordnung*
D-Wert *Dezimale Reduktionszeit*
EAEC *Enteroaggregative Escherichia coli*
EAHEC *Enteroggregativer-Hämorrhagischer Escherichia coli*
EFSA *European Food Safety Authority*
EHEC *enterohämorrhagische Escherichia coli-Stämme*
EPPO *European and Mediterranean Plant Protection Organization*
ESBL *Extended-Spectrum Beta-Lactamasen*
EU *Europäische Union*
f. sp *Forma specialis*
FAO *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
g *Gramm*
h *Stunde*
HTP *Hochdrucktemperatur-Pelletierung*
IPPC *International Plant Protection Convention*
ISPM *International Standards for Phytosanitary Measures*
K *Kontrolle*
KbE *koloniebildende Einheit*
KID50 *Kulturinfektiöse Dosis*
KrWG *Kreislaufwirtschaftsgesetz*
KTBL *Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft*
mg *Milligramm*
MH *Klärwerk Mühlhausen bei Stuttgart*
min *Minuten*
Mio *Millionen*
ml *Milliliter*
MPN *Most Probable Number*
MR *Klärwerk Möhringen*
P1 *Pathotyp 1*
PAK *Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe*
PCB *Polychlorierte Biphenyle*
PFU *Plaque Forming Unit*
pH *pH-Wert*
Plie *Klärwerken Plieningen-Kemnat*
QLA *Qualitätssicherung landbaulicher Abfallverwertung e.V.*
QSO *Quarantäneschadorganismus*
Se *Synchytrium endobioticum, Synchytrium endobioticum*
spp *Subspezies*
STABW *Standardabweichung*
STEC *Shigatoxin-producing E. coli*
stx *Shigatoxin-kodierendes Gen*
TS *Trockensubstanz*
Uni *Universität Stuttgart (Klärwerk Brünsau)*
VQSD *Verbandes zur Qualitätssicherung von Düngung und Substraten e.V.*
WHO *World Health Organization*
XLD *Xylose-Lysin-Desoxycholat*
µm *Mycrometer*

1 Zusammenfassung

Die Schonung natürlicher Ressourcen sowie der Schutz der Umwelt gehören zu den umweltpolitischen Zielen in Deutschland. Es ist ein gesellschaftliches Bestreben möglichst viele Rest- und Abfallstoffe im Wirtschaftskreislauf zu belassen und sinnvoll zu verwerten. Dadurch verringert sich das Abfallaufkommen und endliche Ressourcen an mineralischen Nährstoffen werden geschont. Dieser Ansatz ist im seit 2012 gültigen Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Bewirtschaftung von Abfällen (Kreislaufwirtschaftsgesetz - KrWG) verankert. In Deutschland gibt es somit eine Pflicht Abfälle zu verwerten, wenn dies technisch möglich ist und wirtschaftlich zumutbar, vor allem dann, wenn für den zu verwertenden Stoff ein Markt vorhanden ist oder geschaffen werden kann (§7, Absatz 4, KrWG)¹. Die Verwertung von Klärschlämmen in der Landwirtschaft entspricht somit dem Kreislaufwirtschaftsgesetz, ist aber nicht frei von Risiken und wird deshalb über die Klärschlammverordnung geregelt. In Klärschlämmen und Wirtschaftsdüngern wie Gülle und Gärprodukten können pathogene Mikroorganismen, insbesondere auch Zoonosenerreger, vorhanden sein und eine Gesundheitsgefahr für Mensch und Tier darstellen (Appel et al., 2011). Die Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992) gilt für das Aufbringen von Klärschlamm auf landwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzten Böden und dieser darf nur so aufgebracht werden, dass das Wohl der Allgemeinheit nicht beeinträchtigt wird und die Aufbringung nach Art, Menge und Zeit auf den Nährstoffbedarf der Pflanzen unter Berücksichtigung der im Boden verfügbaren Nährstoffe und organischen Substanzen sowie der Standort- und Anbaubedingungen ausgerichtet ist. Im Übrigen gelten für das Aufbringen von Klärschlämmen die Bestimmungen des Düngemittelrechts. In den Entwürfen zur Novellierung der AbfKlärV (AbfKlärV, 2010 bzw. 2013) sind wesentliche Neuerungen vorgesehen. Dazu gehören strengere Grenzwerte für Schwermetalle und organische Schadstoffe sowie die Einführung von Grenzwerten für die seuchenhygienisch relevanten Salmonellen, die bislang nur in der Düngemittelverordnung zu finden sind. Diese Maßnahmen sollen die Schadstoffanreicherung im Boden begrenzen und die von der Klärschlamm Düngung ausgehenden hygienischen Risiken minimieren. Demzufolge dürfen nur noch Klärschlämme abgegeben oder ausgebracht werden, die einer hygienisierenden Behandlung unterzogen wurden und bei denen in 50 g Nasssubstanz keine Salmonellen nachweisbar sind. Die Behandlungsverfahren und entsprechenden Kriterien, die zur Erzielung der seuchenhygienischen Unbedenklichkeit des Endproduktes führen, werden im Anhang 2 zur Novellierung der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) vorgegeben. Hierzu zählen die Fremderhitzung durch Schlammpasteurisierung, die thermische Konditionierung, die Selbsterhitzung durch aerob-thermophile Schlammstabilisierung, die Schlammkompostierung in Mieten oder Reaktoren, die Zugabe von ungelöschtem Branntkalk sowie die Zugabe von Kalkhydrat, die Langzeitlagerung von Klärschlamm in Pflanzenbeeten sowie die Hochtemperaturtrocknung. Als neues Element werden ferner Anforderungen an die Qualitätssicherung von Klärschlämmen in den Novellierungsentwurf aufgenommen. Durch Teilnahme an einem Qualitätssicherungssystem kann der Träger der Qualitätssicherung unter bestimmten Bedingungen eine Befreiung von den Behandlungs- und Untersuchungspflichten bzgl. der Seuchenhygiene aussprechen. Die vorgesehenen Neuerungen in der AbfKlärV werden weitreichende Auswirkungen auf die Verfahrensweise von Kläranlagen, den Seuchenhygienestatus des Klärschlammes und die Maßnahmen im Rahmen der Qualitätssicherung haben. Die spezifischen Risiken für die Phytohygiene sind bisher nicht berücksichtigt und aufgrund der bestehenden Kläranlagentechnik erfordert eine flächendeckende weitergehende Behandlung hohe Investitionen. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche Risikomanagementoptionen erforderlich und geeignet sind ein stabiles und aus seuchen- und phytohygienischer Sicht möglichst unbedenkliches Produkt zu erzeugen.

¹ Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Bewirtschaftung von Abfällen (Kreislaufwirtschaftsgesetz - KrWG); Stand 24.02.2012

Zur Beantwortung dieser Frage wurden drei verschiedene Module bearbeitet:

- I. Untersuchungen zum Einfluss von Druck und Temperatur auf seuchen- und phytohygienisch relevante Schadorganismen im Klärschlamm

Hierzu wurden weitergehende thermische Verfahren, einschließlich der Hochdrucktemperatur-Pelletierung, hinsichtlich ihrer hygienisierenden Wirkung auf ausgewählte Pathogene der Phyto- und Seuchenhygiene einer experimentellen Prüfung unterzogen. Des Weiteren wurde die hygienisierende Wirkung einer Lagerung von Klärschlämmen geprüft.

- II. Literaturbasierte Bewertung von weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren hinsichtlich ihrer reduzierenden Wirkung auf Schadorganismen

Die von der Novellierung der Klärschlammverordnung vorgesehenen Behandlungsverfahren wurden hinsichtlich ihrer Eignung für die Seuchen- und Phytohygiene bewertet.

- III. Hygieneaspekte bei der Qualitätssicherung von Klärschlammprodukten

Voraussetzungen und Auswirkungen einer Befreiung von Behandlungs- und Untersuchungspflichten im Bereich der Hygiene wurden geprüft und Anforderungen für Hygieneaspekte in der Qualitätssicherung formuliert.

Der Bericht dient insgesamt der Bewertung verfügbarer Risikomanagementoptionen auf ihre Eignung zur Regelung in der Klärschlammverordnung.

I Untersuchungen zum Einfluss von Druck und Temperatur auf seuchen- und phytohygienisch relevante Schadorganismen in Klärschlämmen

Hinsichtlich der Seuchenhygiene bestand das Ziel der vorliegenden Untersuchungen in der Erarbeitung von Daten zur Tenazität verschiedener Erreger gegenüber Temperatureinflüssen und während der Langzeitlagerung von Klärschlämmen und Wirtschaftsdüngern, sowie der Überprüfung der Hochdrucktemperatur-Pelletierung bezüglich einer Inaktivierung verschiedener Erreger. Die Untersuchungen dienten dazu, sich einen Überblick über die Widerstandsfähigkeit der unterschiedlichen Erreger in Klärschlämmen und Wirtschaftsdüngern, wie Gülle und Gärprodukten, zu verschaffen um eine Risikobewertung der Klärschlammverwertung aus Sicht der Seuchenhygiene, sowie die Eignung des Hochdrucktemperatur-Pelletierungsprozesses (HTP-Anlage) als hygienisierende Behandlung im Sinne des Anhang 2 der AbklärV (2010 bzw. 2013) zur Novellierung der derzeit gültigen Klärschlammverordnung machen zu können. Aus den erarbeiteten Erkenntnissen und Informationen, sowie auf Grundlage einer Risikoanalyse bzw. -bewertung sollten Schlussfolgerungen und Empfehlungen in Bezug auf die seuchenhygienischen Aspekte, sowie die risikominimierte Klärschlammverwertung entwickelt und abgeleitet werden.

Im Fokus der Untersuchungen standen Mikroorganismen aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae*, thermoresistente Parvoviren sowie Sporen aerober und anaerober Sporenbildner. Aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* lag der Fokus der Untersuchungen auf einem enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4, das für einen epidemieartigen „EHEC“-Ausbruch mit schweren Erkrankungsfällen (hämorrhagische Colitis, hämolytisches urämisches Syndrom (HUS)) und Todesfällen in Deutschland und Frankreich 2011 verantwortlich war. Vergleichend dazu wurden eine monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120 sowie ein *Escherichia coli* DSM-Stamm untersucht. Des Weiteren wurden in den Versuchen sowohl Sporen von *Clostridium sporogenes*, als Vertreter der anaeroben Sporenbildner, als auch Sporen von *Bacillus globigii*, als Repräsentant der aeroben Sporenbildner, sowie ein bovines Parvovirus (BPV), Stamm Haden, berücksichtigt. Die Auswahl der Erreger erfolgte anhand des Projektantrages, Abweichungen ergaben sich hinsichtlich der verwendeten Erreger aus der Gattung *Clostridium* ssp. sowie des enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)-Stammes O157:H7. Anstelle der vorgesehenen Untersuchung von *Clostridium botulinum* und *Clostridium butyricum* wurden stellvertretend *Clostridium*

sporogenes, ein nicht-toxigener Stellvertreter für proteolytische *Clostridium botulinum*-Stämme (Brown et al., 2011; Bradbury et al., 2012; Basaran-Akgul et al., 2013), sowie im Vergleich dazu, der aerobe Sporenbildner *Bacillus globigii*, ein für den Menschen nicht-pathogener Vertreter der Gattung *Bacillus* (u.a. *Bacillus anthracis*) (Hosni et al., 2009), in den Versuchen verwendet. *Bacillus globigii* wurde in den vorliegenden Untersuchungen einerseits als Repräsentant der aeroben Sporenbildner und andererseits als biologischer Tracer verwendet. Anstelle des enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7-Stammes wurde ein *Escherichia coli*-DSM-Stamm sowie eine monophasische Variante der *Salmonella Serovar Typhimurium Lysotyp* DT120 verwendet und vergleichend zum EAHEC O104:H4 Stamm betrachtet. Bei den Salmonellen handelt es sich um human- und tierpathogene Infektionserreger, die aus Sicht des Verbraucherschutzes als Zoonosenerreger sowie als Verursacher von Lebensmittelinfektionen nach wie vor von großer Bedeutung sind. Nach Angaben verschiedener Autoren traten im Laufe der letzten zehn Jahre in zunehmendem Maße multiresistente monophasische *Salmonella Serovare* weltweit auf (EFSA, 2009; Hopkins et al., 2012; Trüpschuch et al., 2013).

Die Untersuchungen wurden einerseits in Form von Tenazitätsversuchen zur Überlebensfähigkeit bzw. zur Inaktivierung der oben angeführten Mikroorganismen in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung während der Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen, und während der Langzeitlagerung in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten durchgeführt. Andererseits sollte das Verfahren der Hochdrucktemperatur-Pelletierung (HTP) in Bezug auf dessen Entseuchungskapazität (Hygienisierungskapazität) anhand unterschiedlicher Erreger an einer Versuchsanlage der Hochschule für Forstwirtschaft Rottenburg überprüft werden. In den Erhitzungsversuchen wurden die Erreger anhand der zu erwartenden Tenazitäten in drei Versuchsgruppen eingeteilt. Dabei stellten die *Enterobacteriaceae* die Gruppe mit der niedrigsten Tenazität, und die Sporen von *Clostridium sporogenes* und *Bacillus globigii*, die mit der höchsten Tenazität, dar. Die Versuche an der Hochdrucktemperatur-Pelletierungsanlage (HTP-Anlage) wurden aus betriebstechnischen Gründen und wegen arbeitsschutzrechtlicher Bedingungen mit Holzspänen anstelle des Klärschlammes, sowie mit den für den Menschen nicht-pathogenen Erregern *Escherichia coli* K12 (Kontrollstamm), *Salmonella Typhimurium Zoosaloral* (Impfstamm) sowie Sporen von *Bacillus globigii* (biologischer Tracer) anstelle der pathogenen Erreger, insbesondere des EAHEC O104:H4-Stammes, durchgeführt.

In den Erhitzungsversuchen haben sich für die Vertreter der *Enterobacteriaceae* keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf deren Inaktivierung ergeben, jedoch zeigte sich eine teilweise etwas schnellere Inaktivierung des *Escherichia coli* DSM-Stammes im Vergleich zum EAHEC O104:H4-Stamm, sowie des monophasischen *Salmonella Typhimurium* DT120 Serovar. Eine vollständige Inaktivierung wurde bei einer achtzehnstündigen Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C), einer zweistündigen Erhitzung auf (+/-2 °C) und einer einstündigen Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) für alle Erreger aus der Familie der *Enterobacteriaceae* erreicht. Eine Reduktion um mindestens fünf log₁₀-Stufen, wie sie in der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 für die Prozessprüfung in Bezug auf eine Verminderung während der biotechnologischen Behandlung vorgesehen ist, wurde zudem bereits nach einer einstündigen Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für die drei Erreger, und bei 50 °C (+/-2 °C) nach achtzehn Stunden für alle Erreger in Gülle und für den *Escherichia coli* DSM-Stamm in allen untersuchten Substraten erreicht. Bei vierstündiger Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) wurde für den *Escherichia coli* DSM-Stamm ebenfalls in allen Substraten eine Reduktion um fünf log₁₀-Stufen festgestellt.

Ein eindeutiger Einfluss des Substrates bzw. Unterschied hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der Erreger in den verschiedenen Substraten konnte während der Erhitzung nicht festgestellt werden, jedoch konnte zum Teil eine schnellere Reduktion um fünf log₁₀-Stufen in der Gülle als in den übrigen Substraten nachgewiesen werden.

In den Versuchen zur Inaktivierung thermoresistenter Parvoviren, am Beispiel des bovinen Parvovirus (BPV) Stamm Haden, konnte während der einstündigen Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) eine Verminderung um 1,8 bzw. 2,1 log₁₀-Stufen und nach einstündiger Erhitzung auf 80 °C (+/-2 °C) eine Reduktion um 2,4 bzw. 3,4 log₁₀-Stufen in Klärschlamm bzw. Gülle festgestellt werden. Hinsichtlich des Einflusses der Substrate deu-

tet sich in den Untersuchungen eine etwas schnellere Inaktivierung des BPV in der Gülle im Vergleich zum Klärschlamm an.

Die Untersuchungen bezüglich der Inaktivierung der Sporen der aeroben und anaeroben Sporenbildner zeigten, dass nach einstündiger Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) bzw. dreißigminütiger Erhitzung auf 98 °C (+/-2 °C) im Wasserbad keine deutliche Verminderung für die Sporen von *Bacillus globigii*, weder in Klärschlamm noch in Gülle, festzustellen war. Für die Sporen von *Clostridium sporogenes* war eine geringfügige Reduktion um ca. 0,5 log₁₀-Stufen nach einstündiger Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) und von 1,0 bzw. 1,4 log₁₀-Stufen nach dreißigminütiger Erhitzung bei 98 °C (+/-2 °C) in Gülle bzw. Klärschlamm nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte eine vollständige Inaktivierung der Sporen, sowohl von *Clostridium sporogenes* als auch *Bacillus globigii*, nach Erhitzung auf 110 °C für dreißig Minuten und auf 133 °C für zwanzig Minuten, nachgewiesen werden.

Mit den Versuchen zur Hochdrucktemperatur-Pelletierung (HTP) von Klärschlamm sollte geprüft werden, ob dieses Verfahren einen reduzierenden Effekt auf Krankheitserreger hat. Die Versuche wurden in einer Pelletieranlage der Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg durchgeführt. Da Klärschlamm bereits humanpathogene Mikroorganismen enthalten kann und es während des Pelletierungsprozesses zu einer starken Staubentwicklung kommt, wurden die Untersuchungen aus arbeitsschutzrechtlichen Gründen mit Holzspänen (Fichtenspäne mit einem Wassergehalt von 9,7 %) anstelle von getrocknetem Klärschlamm durchgeführt. Untersucht wurden nicht-pathogene Vertreter der Bakterienspezies *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral, *Escherichia coli* K12, Sporen von *Bacillus globigii* als biologischer Tracer. Nach Angaben der Hochschule für Forstwirtschaft Rottenburg können während der Pelletierung Drücke von bis zu 250 MPa (=2500 bar) und Temperaturen von 90 °C bis 180 °C erzielt werden. Es zeigte sich, dass nach der Pelletierung eine vollständige Inaktivierung der Vertreter der *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* K12, *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral), sowie eine Inaktivierung bzw. Reduktion der Sporen von *Bacillus globigii* um 1,4 log₁₀-Stufen in den Pellets erzielt werden konnte. Des Weiteren konnte ein bakterizider Einfluss der verwendeten Holzspäne auf die Erreger aus der Familie der *Enterobacteriaceae* beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen verdeutlichen, dass eine thermische Behandlung von Klärschlamm zu einer signifikanten Reduktion pathogener Erreger führt. Als Parameter spielen insbesondere die Temperatur sowie die Dauer der Behandlung eine entscheidende Rolle. Eine Reduktion um mindestens fünf log₁₀-Stufen bzw. eine vollständige Inaktivierung der vegetativen Erreger (*Enterobacteriaceae*) wird bei allen angewandten Temperaturen beobachtet (53 °C (+/-2 °C) für 18 h; 60 °C (+/-2 °C) für 1 h und 2 h; 70 °C (+/-2 °C) für 1 h).

Eine Reduktion des bovinen Parvovirus (BPV) benötigt höhere Temperaturen und längere Einwirkungszeiten. Eine Reduktion um drei log₁₀-Stufen, wie sie in der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 aufgeführt wird, konnte in den vorliegenden Versuchen nur in Gülle nach einstündiger Erhitzung bei 80 °C (+/-2 °C) nachgewiesen werden.

Eine Inaktivierung bakterieller Sporen findet erst ab Temperaturen oberhalb 100 °C statt (z.B. 110 °C; 0,5 h). Die Behandlung von Klärschlamm bei 90 °C bzw. 98 °C (0,5 h und 1 h) erbrachte keine ausreichende Inaktivierung.

Die Ergebnisse der Hochdrucktemperatur-Pelletierung zeigen, dass mit diesem Verfahren vegetative Erreger (*Salmonellen* und *Escherichia coli*) ebenfalls ausreichend inaktiviert werden.

Klärschlämme können generell auch phytopathogene Erreger enthalten. Von besonderer Bedeutung sind hier widerstandsfähige Schadorganismen und Samen, die in der Lage sind, ungünstige Umweltbedingungen für lange Zeit zu überdauern. Sie können mit dem Abwasser aus Haushalten oder der industriellen Verarbeitung oder gewerblichen Bearbeitung von Lebensmitteln und pflanzlichen Erzeugnissen in den Klärschlamm gelangen. Hierzu gehört auch der Quarantäneschadorganismus (QSO) *Synchytrium endobioticum* (Se). Dieser bodenbürtige Pilz verursacht an Kartoffeln den so genannten Kartoffelkrebs, eine Pflanzenkrankheit, die für die Kartoffelproduktion nach wie vor große Bedeutung hat. Se ist äußerst persistent.

Die Persistenz beruht auf der Ausbildung von Überdauerungsorganen (Dauersori), mit denen der Pilz ungünstige Bedingungen für lange Zeit überdauern kann. In der Literatur wird beschrieben dass Dauersori im Boden bis zu 30 Jahren lebensfähig bleiben können (McDonnell and Kavanagh, 1980; Unger und Pietsch, 2002). Die Bedeutung dieses Schaderregers für die Kartoffelproduktion beruht vor allem auf den strengen Reglementierungen, die greifen, wenn ein Befall in einem Kartoffelbestand festgestellt wird. So bleibt die Befallsfläche für den Kartoffelanbau gesperrt, bis die Befallsfreiheit durch eine amtliche Untersuchung von Bodenproben bestätigt wird. Da es bisher keine Möglichkeit gibt, diesen Erreger zu bekämpfen, muss unter allen Umständen vermieden werden, dass Se im Klärschlamm vorkommt. Ein diesbezüglich erhöhtes Risiko besteht bei der Einleitung von Abwässern in Kläranlagen insbesondere aus der Kartoffelverarbeitung durch Gewerbe und Industrie oder aus landwirtschaftlichen Betrieben.

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens wurde untersucht, ob mit Se kontaminierte Klärschlämme durch den Einfluss einer thermische Behandlung oder die Langzeitlagerung inaktiviert werden können. Dabei bestand der Anspruch, Einflüsse auf die Dauersori und möglicherweise bestehende Reduktionsverläufe eindeutig nachvollziehen zu können. Die im Vorfeld der Untersuchungen durchgeführte ausführliche Methodvalidierung, ermöglichte die Verwendung isolierter und anschließend getrockneter Dauersori, die den Klärschlämmen in definierter Menge (gravimetrisch) zugegeben werden konnten. Damit war erstmals eine quantitative Ergebnisauswertung möglich. Ältere Untersuchungen mit Se beschränken sich auf rein qualitative Aussagen.

Klärschlämme können sich in Abhängigkeit vom Einzugsgebiet der Kläranlage und der Prozessführung bei der Wasserrauaufbereitung (verwendetes Flockungsmittel, hydraulische Verweilzeit im Faulturm) voneinander unterscheiden. Deshalb wurden Klärschlämme (Faulschlamm) aus vier verschiedenen Kläranlagen in die Untersuchungen einbezogen. Bei den Klärschlämmen der Klärwerke Möhringen und Mühlhausen handelte es sich um rein kommunale Klärschlämme. Demgegenüber befindet sich im Einzugsgebiet des Klärwerkes Plieningen-Kemnat ein Flughafen. Das Klärwerk in Büsnau reinigt ausschließlich die Abwässer der Universität Stuttgart.

Die Untersuchungen zur thermischen Behandlung (Autoklav) wurden mit Klärschlamm aus Mühlhausen bzw. mit Klärschlamm der Uni Stuttgart durchgeführt. Hierfür wurde mit Se kontaminierter Klärschlamm für zwanzig Minuten bei 133 °C bzw. zwei Stunden bei 140 °C (3 bzw. 4 bar) behandelt. Die Untersuchungen zur Wirkung einer Lagerung von Klärschlamm auf Dauersori von Se wurden mit allen vier Klärschlämmen im Vergleich zur Lagerung in Wasser durchgeführt. Die Inkubation der Proben erfolgte bei ca. 20 °C über einen Zeitraum von 1, 3, 7, 28, 84 und 152 Tagen. Um eine Beeinflussung der Proben durch UV-Strahlung ausschließen zu können, wurden die Proben in einem dunklen Raum aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte durch Rückisolierung der Dauersori aus den behandelten Klärschlammproben. Anschließend wurde die Konzentration der Dauersori in der aufgefangenen Sporensuspension ermittelt und eine optische Bewertung des Zustandes der Dauersori vorgenommen. Dabei wurde in vitale, denaturierte, teilentleerte und leere Dauersori unterschieden.

Nach einer thermischen Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen bei 133 °C, konnten rund 40 % der Dauersori vital nachgewiesen werden. Durch eine Behandlung bei 140 °C reduzierte sich der Anteil vitaler Dauersori lediglich auf 33 %. Die Reduktion war in beiden Wiederholungen etwa gleich ausgeprägt und somit reproduzierbar. In den nicht thermisch behandelten Kontrollen waren 64,9 % vitale Dauersori nachweisbar.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Klärschlamm der Uni Stuttgart sind weniger eindeutig. Der Anteil insgesamt zurückisolierter Dauersori war bei den nicht autoklavierten Kontrollen niedriger als in den behandelten Proben (Kontrolle: 32,9 bzw. 28,8 %; behandelte Proben: 38,5 und 46,6 %). Es ist zu vermuten, dass Adsorptionseffekte der Dauersori an Klärschlammbestandteile für diesen Befund verantwortlich sind.

Aus den Untersuchungen einer thermischen Behandlung von Dauersori des Kartoffelkrebses kann der Schluss gezogen werden, dass weder die Behandlung bei 133 °C (20 Min.) noch bei 140 °C (2 h) zu einer ausreichenden Inaktivierung von *Synchytrium endobioticum* führt.

Auch die Lagerung der Klärschlämme führte nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der Dauersori. Die Ergebnisse sind aber insgesamt sehr vielversprechend hinsichtlich des Einflusses der Klärschlämme auf die Vitalität der Dauersori. So lässt die Lagerung von Klärschlamm aus Möhringen, Mühlhausen und Plieningen-Kemnat erkennen, dass ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Lagerungszeit und der Reduktion vitaler Dauersori besteht. Dabei fiel der Anteil vitaler Dauersori in Abhängigkeit vom geprüften Klärschlamm unterschiedlich aus. Nach einer Lagerungszeit von 12 Wochen waren im Klärschlamm aus Möhringen 12,3 % der Dauersori vital nachweisbar. Bei Klärschlamm aus Mühlhausen waren 11,0 % und bei Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat lediglich 4,6 % der Dauersori noch vital. Demgegenüber waren in der Kontrolle (Lagerung für 12 Wochen in Wasser) 53,0 % der Dauersori vital. Damit muss die Reduktion der Dauersori von Se von der Art der Klärschlämme abhängig sein.

Der Anteil vitaler Dauersori lag auch nach fünfmonatiger Lagerung in der Kontrolle wesentlich höher als bei den gelagerten Klärschlammproben. Er lag bei der Kontrolle bei 45,8 %. Demgegenüber konnten im Klärschlamm aus Möhringen 16,9 % vital nachgewiesen werden, im Klärschlamm aus Mühlhausen 19,8 % und im Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat 11,5 %. Ein Vergleich mit den 12 Wochen lang gelagerten Klärschlammproben zeigte, dass der Anteil vitaler Dauersori in den fünf Monate lang gelagerten Proben höher war. Das lässt sich damit erklären, dass die Klärschlämme für den Versuchsansatz zur fünfmonatigen Lagerung wesentlich älter waren, als die Klärschlämme für alle anderen Lagerungsvarianten. Es wird vermutet, dass die mikrobielle Aktivität in den älteren Klärschlämmen herabgesetzt war.

Die Ergebnisse zur Lagerung von Klärschlamm der Uni Stuttgart zeigten unerwartet geringe Rückisolierungsraten. Ein Zusammenhang zwischen Lagerungszeit und Reduktion vitaler Dauersori war nicht zu erkennen. Es wurde wiederum vermutet, dass sich Dauersori an diesem Klärschlamm angelagert haben und daher nicht zurückisoliert werden konnten. Gegebenenfalls muss auch die Wirkung mikrobieller Aktivität in Betracht gezogen werden. Die hydraulische Verweilzeit im Faulturm der Uni Stuttgart war mit 50 Tagen am längsten. Bei allen anderen Klärwerken betrug die hydraulische Verweilzeit 10 bis 20 Tage. Bei einer hydraulischen Verweilzeit von 50 Tagen wird organische Substanz nahezu vollständig abgebaut. Damit lag eventuell eine Unterversorgung der Mikroorganismen vor, was die starke Erregerreduktion ebenfalls erklären könnte. Um diese Theorie zu überprüfen, müsste die mikrobielle Aktivität mit beobachtet werden, was in diesem Projekt nicht vorgesehen war. Dieser Aspekt sollte in eventuellen Folgeprojekten Berücksichtigung finden. Ebenso wie Analysen zur mikrobiellen Diversität in ausgefaulten Klärschlämmen. Die Untersuchungen lassen vermuten, dass bereits die Lagerung von Klärschlamm die Reduktion einer Vielzahl von Organismen mit sich bringt.

Im Rahmen der Untersuchungen waren ursprünglich auch Untersuchungen in einer Hochdrucktemperatur-Pelletieranlage (HTP) vorgesehen. Leider konnte in keiner der dafür in Frage kommenden HTP-Anlagen die Auflagen zum Arbeiten mit QSO eingehalten werden, sodass diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden konnten. Anhand der Ergebnisse, die die Uni Hohenheim generiert hat, kann aber eine Wirkung auf Dauersori abgeleitet werden. Der Endosporenbildner *Bacillus globigii*, findet als biologischer Tracer Anwendung bei der Bestimmung von z.B. hydraulischen Verweilzeiten in Biogasanlagen. Seine Endosporen sind ähnlich beständig, wie die Dauersori von *S. endobioticum*. Im Rahmen der Untersuchungen in der Pelletieranlage wurde *Bacillus globigii* ebenfalls als biologischer Tracer verwendet und war in den erzeugten Pellets nachweisbar (siehe Abschnitt 4.1.3.6). Damit kann davon ausgegangen werden, dass auch *S. endobioticum* die Pelletierung überdauert hätte.

Die erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass sich durch eine gezielte Prozessführung während der Lagerung von Klärschlamm eine weitere Reduktion vitaler Dauersori erreichen lässt, vielleicht sogar eine vollständige Inaktivierung der Dauersori. Es wird vermutet, dass der Abbau von Dauersori auf Mikroorganismen im Klärschlamm zurückzuführen ist. So hängt die Zusammensetzung der Mikroflora im Belebtschlamm laut

Rheinheimer (1991) sowohl von der Beschaffenheit des Abwassers, als auch von der Behandlungsweise ab. Bei den Bakterien dominieren in der Regel Pseudomonaden, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Sphaerotilus* und Nocardien. Unter den Pseudomonaden sind auch chitinabbauende Vertreter zu finden. Dazu gehört *Pseudomonas aeruginosa*, ein ubiquitäres Bakterium, das in feuchten Böden und Gewässern, aber auch in Waschbecken, Duschen, Toiletten vorkommt. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein fakultativ aerobes lebendes Bakterium, das auch in Medien mit einem sehr geringen Nährstoffangebot nachgewiesen werden konnte. Somit wäre dieses Bakterium in der Lage auch eine anaerobe Faulung zu überstehen und könnte im Faulschlamm vertreten sein. Folders et al. (2001) konnten bei diesem Bakterium nicht nur die Expression von Chitinase nachweisen, sondern auch belegen, dass die gebildete Chitinase homolog zur Chitinase von *Serratia marcescens* und *Bacillus circulans* ist. *Serratia marcescens* ist ein ubiquitäres Bakterium, das im Boden, im Wasser sowie auf Tieren und Pflanzen vorkommt demgegenüber ist *Bacillus circulans* ein fakultativ anaerobes Bakterium. Damit können chitinasebildende Mikroorganismen im Klärschlamm vorkommen, wodurch die Grundvoraussetzung für einen mikrobiellen Abbau von *S. endobioticum* gegeben ist.

II Literaturbasierte Bewertung von weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren hinsichtlich ihrer reduzierenden Wirkung auf Schadorganismen

Von den in Anlage 2 der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) vorgegeben Verfahren zur weitergehenden Behandlung von Klärschlämmen, sind vor allem thermische Verfahren geeignet, die Anforderungen der AbfKlärV hinsichtlich hygienischer Unbedenklichkeit zu erreichen. Dies gilt sowohl aus seuchenhygienischer als auch aus phytohygienischer Sicht. Aufgeführt sind die Schlammpasteurisierung, die thermische Konditionierung, die aerob-thermophile Schlammpasteurisierung und die Hochtemperaturtrocknung. Bei ordnungsgemäßer Anwendung eines dieser Verfahren kann weitgehend gewährleistet werden, dass Klärschlämme hygienisch unbedenklich verwertet werden können. Temperaturen über 40 °C - 45 °C führen, in Abhängigkeit von der Einwirkzeit, bei den meisten Mikroorganismen zu einer Inaktivierung und die Organismen werden abgetötet. Diese gilt auch für die Mehrzahl der phytopathogenen Erreger. Es gibt aber auch Ausnahmen, die i. d. R. auf physiologische Besonderheiten der Erreger zurückzuführen sind. So wird der Erreger des Kartoffelkrebses, *Synchytrium endobioticum*, aber auch Sporen von *Clostridium spp.*, durch keines der Verfahren inaktiviert, was die im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Untersuchungen belegen. Steinmüller et al. (2012 und 2013) berichten, dass *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* die Schlammpasteurisierung überdauert. Für Samen der Samtpappel (*Abutilon theophrasti*) ist ein Überdauern der Schlammpasteurisierung (70 °C für 60 min) ebenfalls sehr wahrscheinlich. Laut Bloemhard et al. (1992) können die Samen eine Erhitzung auf über 100 °C für 15 min überdauern.

Die Kompostierung von Klärschlämmen ist im Hinblick auf die Mehrzahl untersuchter Organismen ein zuverlässiges weitergehendes Behandlungsverfahren zur Reduktion von Krankheitserregern und Schadorganismen. Die hygienisierende Wirkung der Kompostierung beruht primär auf einer thermischen Wirkung, aber auch auf der Bildung toxisch bzw. antibiotisch wirkender Substanzen sowie durch mikrobiellen Abbau. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass, mit Ausnahme von *Clostridium spp.*, eine vollständige Inaktivierung human- und tierpathogener Schadorganismen erfolgt. In der Literatur belegt ist die Inaktivierung des Kartoffelzystennematoden *Globodera rostochiensis*. Untersuchungen von Bøen et al. (2006) und Steinmüller et al. (2012) beschreiben eine vollständige Inaktivierung der Zysten bei mindestens 50 °C für 8 Tage. Laut Steinmüller et al. (2012) wird *Synchytrium endobioticum* nicht abgetötet, ebenso übersteht der Erreger der Ringfäule der Kartoffel, *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, die Kompostierung (Steinmüller et al., 2007).

Ein weiteres Behandlungsverfahren zur Reduktion von Krankheitserregern und Schadorganismen ist die Verschiebung des pH-Wertes auf Werte größer als 12,8 durch Zugabe von Kalk. Mikroorganismen sind in der Regel nur in dem pH-Wert-Bereich lebensfähig, an den sie sich angepasst haben. Die meisten Bodenbakterien sind in einem pH-Wert-Bereich von 4,5 - 10 lebensfähig (Husson, 2013). Bei pH-Werten über 10 sind nur spezialisierte Mikroorganismen, z.B. alkaliphile Bakterien lebensfähig, wobei die Obergrenze hier

bei pH 12 liegt. Dies lässt die Vermutung zu, dass die meisten Mikroorganismen bei pH-Werten größer als 12,8 nicht lebensfähig sind. Beim Einsatz von Branntkalk kommt eine thermische Wirkung hinzu. Die Kombination beider Effekte führt, im Vergleich zu den jeweiligen Einzeleffekten, zu einer effektiveren Hygienisierung (Capizzi-Banas, 2004). Auch dieses Verfahren gewährleistet eine ausreichende Reduktion der meisten seuchen- und phytohygienischen Erreger. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass *S. endobioticum* diese Behandlung überdauert. Bei einer Verschiebung des pH-Werts auf 12,38 konnte Langerfeld (1984) nur einen geringen Einfluss auf den Erreger feststellen. Zysten von Kartoffelzystenematoden überlebten diese Behandlungsverfahren ebenfalls (Spaull und McCormack, 1989).

Auch bei einer Behandlung von Klärschlamm in Pflanzbeeten kann eine ausreichende Reduktion der seuchen- und phytohygienischen Erreger weitestgehend erreicht werden. Die hier formulierte Unsicherheit bezieht sich auf die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens gewonnenen Ergebnisse zur Langzeitlagerung. Die Untersuchungen haben zwar gezeigt, dass EAHEC und *Salmonella* bei einer Lagerung von 36 Wochen bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden können, ein vollständiges Abtöten erfolgt aber nicht. Für die phytopathogenen Erreger *Synchytrium endobioticum* (Kartoffelkrebs) und *Polymyxa betae* sowie die Zysten von *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* ist anzunehmen, dass eine langfristige Lagerung für eine vollständige Inaktivierung nicht ausreicht. Durch die Bildung von Überdauerungsorganen bleiben diese Erreger im Boden mehr als 10 Jahre lebensfähig (Asher und Blunt, 1987; Heijbroek, 1987; Turner, 1996; Stachewicz, 2003).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mehrzahl der seuchen- und phytopathogenen Erreger über die in Anlage 2 der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) aufgeführten weitergehenden Behandlungsmethoden inaktiviert werden können. Ausnahmen bilden Organismen, die persistente Überdauerungsorgane bilden, wie z.B. *Clostridium spp.* und *S. endobioticum*. In Abhängigkeit vom Behandlungsverfahren gehören auch Zysten der Kartoffelzystenematoden, thermoresistente Viren und hartschalige Unkrautsamen, wie z. B. die Samen der Samtpappel, zu den nicht inaktivierbaren Organismen.

III Hygieneaspekte bei der Qualitätssicherung von Klärschlammprodukten

Die Entwürfe zur Novellierung der AbfKlärV aus 2010 und 2013 sehen Ausnahmen von der weitergehenden hygienisierenden Klärschlammbehandlung bzw. hinsichtlich bestehender Untersuchungspflichten zum Gehalt von Salmonellen vor, wenn Klärschlämme aus einer Qualitätssicherung verwertet werden. Nach dem Entwurf vom 20.08.2010 kann auf die hygienisierende Behandlung verzichtet werden, wenn eine im Rahmen der Gütesicherung durchgeführte Risikoanalyse zu dem Ergebnis kommt, dass mit alternativen Maßnahmen ein vergleichbares Sicherheitsniveau erreicht wird. Der Entwurf vom 26.06.2013 fordert vom Träger der Qualitätssicherung ein Konzept zur Minderung seuchenhygienischer Risiken und gewährt die Ausnahmen ohne die Erfüllung weiterer Bedingungen, wenn eine Mitgliedschaft in einer Gütesicherung besteht.

Im Rahmen dieses Projektes wurden beispielhaft die Risikofaktoren der Klärschlammherzeugung und -verwertung und die risikomindernden Maßnahmen seitens des Trägers der Gütesicherung analysiert. Hierfür wurde der internationale Standard für pflanzengesundheitliche Maßnahmen, ISPM Nr. 11, herangezogen, der für die Abschätzung von Risiken für Mensch, Tier und Pflanze durch organische Dünger adaptiert werden kann. Dabei zeigte sich, dass die Träger der Qualitätssicherung nur einen sehr begrenzten risikomindernden Einfluss ausüben können, der in der Regel nicht zu einem verbesserten bzw. äquivalenten Hygieneniveau, wie eine zusätzliche, weitergehende Klärschlammbehandlung, führt. Die Klärschlämme der in Deutschland produzierten Kläranlagen sind in der Regel nicht weitergehend behandelt und die Qualitätssicherung verfügt nicht über effektive und quantitativ messbare erregerinaktivierende Maßnahmen, die einen Verzicht auf weitergehende Klärschlammbehandlungsverfahren verantworten könnten.

Eine Befreiung von der Behandlungspflicht im Rahmen der Gütesicherung ohne äquivalente Hygienemaßnahmen wird deshalb nicht befürwortet. Im Ergebnis würde das gütegesicherte Produkt ein geringeres Hygieneniveau aufweisen, als das nicht gütegesicherte, aber behandelte und untersuchte Produkt. Dies

würde dem Sinn der Gütesicherung nicht gerecht und wäre aus mikrobiologisch-hygienischer Sicht irreführend.

Sofern eine weitergehende Behandlung insgesamt nicht mehr angestrebt wird, weil die Klärschlammverwertung zu Dünge Zwecken mittelfristig eingestellt wird, sollten die bestehenden Anwendungsbeschränkungen und -verbote fortgeführt werden. Ferner sollten alle Klärschlämme auf „Indikatorerreger“ untersucht und bei Überschreiten von Grenzwerten einer Behandlung zugeführt werden, um das Hygieneniveau gegenüber dem Status Quo zu verbessern.

Eine Risikobewertung- bzw. -abschätzung bei Verzicht auf eine weitergehende Behandlung könnte sich zunächst auf den quantitativen Gehalt ausgewählter Infektionserreger, wie z.B. Salmonellen und *Escherichia coli* begrenzen ($< 1 \times 10^2$ KbE/g für Salmonellen und $< 1 \times 10^3$ KbE/g für *E. coli*), bis weitere Erkenntnisse aus Forschungsprojekten zur möglichen Aufnahme von Infektionserregern für Mensch und Tier über die Wurzeln in die Pflanzen vorliegen. In der novellierten Klärschlammverordnung muss daher die Berücksichtigung von quantitativen mikrobiologischen Untersuchungen ein essentieller Bestandteil der Gütesicherung sein. Werden die Grenzwerte um 50 % überschritten, werden Maßnahmen zur Reduktion der Konzentrationen von Krankheitserregern und Schadorganismen erforderlich. Aus dem Bereich der Phytohygiene wären Samen und austriebsfähige Pflanzenteile als Indikatoren geeignet. Die Untersuchung auf Samen und austriebsfähige Pflanzenteile könnte zusätzliche Informationen über den Hygienestatus des Klärschlammes aus phytohygienischer Sicht bereitstellen und Belastungen des Klärschlammes mit Unkrautsamen verhindern. Hinsichtlich der Grenzwerte und Nachweisverfahren könnten die Vorgaben der BioAbfV (Bio-AbfV, 2013) herangezogen werden, die sowohl für flüssige und feste Stoffe vorliegen.

Aufgrund des permanenten, allerdings qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Vorhandenseins pathogener Mikroorganismen in Klärschlämmen und Wirtschaftsdüngern und der vorliegenden Ergebnisse, erscheint aus Sicht der Seuchenhygiene eine Behandlung des Klärschlammes bzw. der Wirtschaftsdünger vor der Ausbringung sinnvoll, um den Eintrag pathogener Keime in die Umwelt zu verhindern bzw. zu minimieren. Dies betrifft auch resistente bzw. multiresistente Keime und deren Eintrag in die Futtermittel- und Lebensmittelkette, sowie die Verbreitung von Resistenzgenen.

Im Hinblick auf eine Risikoabschätzung, sowie als Maßnahmen zur Risikominimierung bezüglich einer Klärschlammverwertung, können einerseits Anwendungsbeschränkungen bzw. Anwendungsverbote, hinsichtlich der Herkunft der Substrate oder der Ausbringungsflächen, und andererseits Untersuchungen der Klärschlämme zum Gehalt von ausgewählten Krankheitserregern, einen wichtigen Beitrag leisten. Eine obligatorische Untersuchung kann neben der quantitativen Bestimmungen von Salmonellen auch andere Indikatororganismen, wie beispielsweise *Escherichia coli* und/oder *Enterococcus* ssp., umfassen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen ist ersichtlich, dass die weitergehende Behandlung von Klärschlämmen z.B. in Form einer thermischen Behandlung, einer Langzeitlagerung oder durch Hochdrucktemperatur-Pelletierung zu einer signifikanten Reduktion vegetativer Erreger führt. Eine derartig biotechnologische Behandlung der Klärschlämme stellt aus Sicht der Seuchenhygiene eine sinnvolle Maßnahme zur Risikoverminderung dar. Bei einer Behandlungspflicht ist davon auszugehen, dass die meisten relevanten Human- und Tierpathogene aus Klärschlämmen beseitigt werden. Ausnahmen sind sporenbildende Bakterien. Auch die Mehrzahl der Viren wird reduziert bzw. inaktiviert, so dass von dieser Organismengruppe ebenfalls kaum Infektionsrisiken zu befürchten sind.

Die gleiche Betrachtungsweise gilt auch für die Mehrzahl der phytopathogenen Erreger und für Unkräuter. Ausnahme sind hier widerstandsfähige Quarantäneschadorganismen der Kartoffel. Als Risikominderungsmaßnahme im Hinblick auf die Quarantäneschadorganismen der Kartoffel sollten besonders risikoreiche Abwässer aus der gewerblichen Kartoffel- und Rübenverarbeitung vom Eintrag in die Kläranlage bzw. der späteren Verwertung in der Landwirtschaft ausgenommen werden. Dies sollte auch Abwässer aus Gewerbebetrieben für das Waschen, die Sortierung und sonstige Verarbeitung von Kartoffeln bzw. Zuckerrüben betreffen, weil durch diese Betriebe große Mengen risikoreicher Anhangserde ins Abwasser gelangen können.

2 Summary

The protection of natural resources and environment protection belong to the eco-political aims in Germany. It is a social ambition to leave as much recyclable material in the economic circle for a proper recycling. Thus the waste arisings are reduced and finite resources of mineral nutrients are preserved. This approach is anchored in the German Closed Substance Cycle and Waste Management Act (Kreislaufwirtschaftsgesetz - KrWG) which is in force since 2012. Thus there is an obligation in Germany to recover waste if this is technically possible and economically reasonable, mainly if a market for the recyclable material exists or it could be created (§7, par. 4, KrWG)². The utilization of sewage sludge in agriculture corresponds with the KrWG but is not free of risks and therefore is regulated by the Sewage Sludge Ordinance.

Pathogenic microorganisms especially also causal agents of zoonosis might occur in sewage sludge and organic fertilizers like liquid manure and fermentation residues from biogas production. They hold a health risk for humans and animals (Appel et al., 2011). The Sewage Sludge Ordinance (AbfKlärV, 1992) applies for the application of sewage sludge on arable land in agriculture and horticulture. It may only be applied in a manner that does not affect the public good and the application according to kind, quantity and time is aligned according to the nutrient requirements of the plants considering the resources of nutrients and organic substances in the soil and the site and the growing conditions. In addition the German Fertiliser Application Ordinance applies for the application of sewage sludge respectively the drafts (AbfKlärV, 2010 and 2013) on the amendment of the Sewage Sludge Ordinance provide essential alterations in respect of stronger limit value for heavy metals and organic harmful substances as well as the introduction of limit values for the hygienic relevant salmonella which were included only in the Fertiliser Application Ordinance up to now. These measures shall limit the concentration of pollutants in the soil and minimize the risks by pests of humans and animals which result from the sewage sludge fertilization. Hence, only sewage sludge may be marketed or be applied which has undergone a sanitizing treatment and for which no salmonella can be established in 50 g wet substance. The treatment procedures and related criteria leading to safe use in terms of human and animal health of the end product are listed in Annex 2 of the amended Sewage Sludge Ordinance (AbfKlärV, 2010 and 2013). Among these are the external heating by means of sludge pasteurizing, the thermic conditioning, the self-heating by aerobic-thermophile sludge stabilization, the sludge composting in stacks or reactors, the addition of non-slaked burnt lime as well as the addition of calcium hydroxyde, the long-term storage of sewage sludge in plant beds as well as the high temperature dehydration. Additionally, requirements for the quality assurance of sewage sludge were incorporated in the amendment draft. By participation in a quality assurance the responsible body of the quality assurance system can grant - under certain conditions - an exemption from the treatment and test obligation in respect to the hygienic requirements. The envisaged alterations in the Sewage Sludge Ordinance will have extensive effects on the procedures in sewage treatment plants, the safety status in respect of hygiene of the sewage sludge and the measures in the frame of the quality assurance. The specific risks in respect of plant pathogens and weeds have not been considered up to now and because of the existing techniques in sewage treatment plants a more efficient sanitizing treatment demands high investments. This is the background for the question which options of risk management were necessary and suitable to guarantee a stable product that guarantees a safe use of sewage sludge in terms of human, animal and plant health.

² Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Bewirtschaftung von Abfällen (Kreislaufwirtschaftsgesetz - KrWG) vom 24.02.2012 (BGBl. I S. 212)

Three different modules were worked on to answer this question:

- I. Investigations on the influence of pressure and temperature on pests of humans, animals and plants with relevance to sewage sludge

More efficient sanitizing heat treatments including the high-pressure pelleting were experimentally investigated in respect to their sanitation effect on specific agents of the epidemic and phyto-sanitation. Furthermore the sanitation effect of the storage of sewage sludge was examined.

- II. Literature based assessment of sewage sludge treatments in respect to their reducing efficacy on pests. These treatments are more efficient for the sanitation of sewage sludge than usually applied treatments in Germany.

The procedures provided for by the draft of the Sewage Sludge Ordinance were evaluated in respect to their suitability for sanitation in respect to human, animal and plant pests.

- III. Hygienic aspects for the quality assurance of sewage sludge products

Conditions for and consequences of an exemption from treatment and test obligations in the scope of hygiene were checked and requirements for the quality assurance were drafted.

The report serves for the evaluation of available risk management options on their suitability for the regulation in the Sewage Sludge Ordinance.

I Investigations on the influence of pressure and temperature on pests in relevance to epidemic and phyto sanitation in sewage sludge

The aim of the presented experiments was to achieve data on the tenacity of different human and animal pathogens against temperature influences and during the long-term storage of sewage sludge and organic fertilisers as well as the testing of the high pressure temperature pelleting in relation to an inactivation of different germs. The examinations provided a general view of the resistance of the different pathogens in sewage sludge and organic fertilisers, like liquid manure and fermentation residues. The results aim to prepare a risk assessment on the sewage sludge utilisation as well as the suitability of the high pressure temperature pelleting process (HTP-facility) as sanitizing treatment in the sense of Annex 2 of the draft (AbfKlärV, 2010 and 2013) on the amendment of the actual Sewage Sludge Ordinance (AbfKlärV, 1992). From the results and information and on the basis of a risk analysis resp. assessment conclusions and recommendations in relation to sanitization and the risk minimized utilization of sewage sludge should be developed and derived.

The analyses were focused on micro-organisms belonging to the group of the *Enterobacteriaceae*, thermo-resistant parvoviruses and spores of aerobic and anaerobic spore builders. In the group of the *Enterobacteriaceae* the examinations were focused on an entero-aggregative haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC), Serovar O104:H4, that was responsible for an epidemic-like „EHEC“-outbreak with severe cases (haemorrhagic Colitis, haemolytic uraemic syndrome (HUS)) and death cases in Germany and France 2011. In comparison, a monophasic variant of the *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120 as well as an *Escherichia coli* DSM-strain was examined. Furthermore spores of *Clostridium sporogenes* as a representative of the anaerobic spore creator and spores of *Bacillus globigii*, as representative of the aerobic spore creator as well as bovine Parvovirus (BPV) strain Haden were considered in the trials. The selection of the pathogens was done according to the project application. Differences were found in respect to the used pathogens belonging to the genus *Clostridium* ssp. as well as the entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-strain O157:H7. Instead of the foreseen examination of *Clostridium botulinum* and *Clostridium butyricum* substitutional *Clostridium sporogenes*, a non-toxigenic representative for proteolytic *Clostridium botulinum*-strains, (Brown et al., 2011; Bradbury et al., 2012; Basaran-Akgul et al., 2013) was used. In addition, for comparison purposes the aerobic spore creator *Bacillus globigii*, a representative of the genus *Bacillus*

(amongst others *Bacillus anthracis*) (Hosni et al., 2009) which is non-pathogenic for humans was used in the trials. In the presented examinations *Bacillus globigii* was used on the one hand as a representative of the aerobic spore builders and on the other hand as a biological tracer. Instead of the entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7-strain an *Escherichia coli*-DSM-strain and a monophasic variant of the *Salmonella* Serovar Typhimurium Lysotyp DT120 were used and checked in comparison to the EAHEC O104:H4 strain. *Salmonella* are classical pathogens for humans and animals. From the perspective of consumer protection they are still of great importance as causal agent of zoonosis and food infections. According to several authors the worldwide occurrence of multi-resistant monophasic *Salmonella* Serovare increased within the last ten years (EFSA, 2009; Hopkins et al., 2012; Trüpschuch et al., 2013).

On the one hand the examinations were carried out in the form of tenacity trials on the survivability resp. the inactivation of the aforementioned micro-organisms in sewage sludge, liquid manure and isotonic saline solution during the heating at different temperature-/time combinations and during the long-term storage in sewage sludge, liquid manure and fermentation residues. On the other hand the procedure of the high pressure temperature-pelleting (HTP) in relation to its disinfection capacity should be checked by means of different pathogens in a testing facility of the University of Applied Forest Science in Rottenburg. In the heating trials the pathogens were divided into three test groups according to the expected tenacity. In the course of these trials the *Enterobacteriaceae* represented the one with the lowest tenacity and the spores of *Clostridium sporogenes* and *Bacillus globigii*, the one with the highest tenacity. In the course of the trials in the high pressure temperature-pelleting facility (HTP-facility) chipped wood was used instead of sewage sludge because of operational and health and safety reasons, in addition the *Escherichia coli* K12 (check strain), *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral (inoculum strain) which are non-pathogenic for humans and germs and spores of *Bacillus globigii* (biological tracer) were used instead of the pathogens especially the EAHEC O104:H4-strain.

During the heating trials no clear differences were established for the representatives of the *Enterobacteriaceae* in relation to their inactivation. Nevertheless, a partly slightly faster inactivation of the *Escherichia coli* DSM-strain in comparison to the EAHEC O104:H4-strain and the mono-phasic *Salmonella* Typhimurium DT120 Serovar could be observed. A complete inactivation was reached in the case of a heating for eighteen hours to 53 °C (+/-2 °C), a heating for two hours to 60 °C (+/-2 °C), and a heating for one hour to 70 °C (+/-2 °C) for all pathogens from the family *Enterobacteriaceae*. A reduction by at least five log₁₀-levels, as required by the Order (EU) No. 142/2011 for the process inspection in respect to a reduction during the biotechnological treatment could already be established after an one-hour heating to 60 °C (+/-2 °C) for the three pathogens and to 50 °C (+/-2 °C) after eighteen hours for all pathogens in liquid manure. Also for the *Escherichia coli* DSM-strain a reduction by at least five log₁₀-levels was found in the case of a four-hour heating to 53 °C (+/-2 °C) in all tested substrates.

An explicit influence of the substrate resp. difference in respect to the survivability of the pathogens in the different substrates could not be established during the heating, nevertheless, partly a faster reduction by five log₁₀-levels in the liquid manure than in the remaining substrates could be established.

In the trials on the inactivation of thermo-resistant Parvoviruses the example of the bovine Parvovirus (BPV) strain Haden was used. During the heating for one hour to 70 °C (+/-2 °C) a reduction by 1.8 resp. 2.1 log₁₀-levels and after a one-hour heating to 80 °C (+/-2 °C) a reduction by 2.4 resp. 3.4 log₁₀-levels in sewage sludge resp. liquid manure could be established. In respect to the influence of the substrates a slightly faster inactivation of the BPV in the liquid manure in comparison to the sewage sludge was indicated in the trials.

The tests in respect to the inactivation of the spores of the aerobic and anaerobic spore creator revealed that after the heating for one hour to 90 °C (+/-2 °C) resp. heating for 30 minutes to 98 °C (+/-2 °C) in a water-bath no clear reduction for the spores of *Bacillus globigii*, neither in sewage sludge nor in liquid manure, could be established. For the spores of *Clostridium sporogenes* a slight reduction by app. 0.5

\log_{10} -levels after a heating for one hour auf 90 °C (+/-2 °C) and of 1.0 resp. 1.4 \log_{10} -levels after a heating for 30 minutes at 98 °C (+/-2 °C) in liquid manure resp. sewage sludge was established. On the contrary to this a complete inactivation of the spores of *Clostridium sporogenes* and also of *Bacillus globigii*, after a heating to 110 °C for thirty minutes and to 133 °C for twenty minutes, could be established.

In additional trials it was examined whether high temperature pelleting (HTP facility) of sewage sludge has a reducing effect on pathogens. The trials were carried out in a HTP facility of the Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg. In these experiments chipped wood of spruce (water content 9,7%) was used instead of sewage sludge because of dust formation by the pelleting process and the risk, that pathogens in the sewage sludge might pose a risk to human health. The non-pathogenic bacteria *Salmonella Typhimurium* Zoosaloral, *Escherichia coli* K12 and spores of *Bacillus globigii* were examined. According to information of the Hochschule für Forstwirtschaft Rottenburg pressures up to 250 MPa (=2500 bar) and temperatures between 90 °C and 180 °C can be obtained during the pelleting process. After the pelleting process a complete inactivation was found in the pellets for representatives of the *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* K12, *Salmonella Typhimurium* Zoosaloral), and a reduction of spores of *Bacillus globigii* by 1,4 \log_{10} -levels. Furthermore, a bactericidal influence of the used wood chips on the pathogens from the family *Enterobacteriaceae* could be observed the results of the presented examinations clarify that a heat treatment results in a significant reduction of pathogens in sewage sludge. Especially the temperature as well as the duration of the treatment plays an important role in the process. A reduction by at least five \log_{10} -levels resp. a complete inactivation of vegetative germs (*Enterobacteriaceae*) can be observed at temperatures of 53 °C (+/-2 °C) after eighteen hours, 60 °C (+/-2 °C) after one resp. two hours and 70 °C (+/-2 °C) after one hour. A reduction of the bovine Parvovirus (BPV) higher temperatures and longer exposure times are needed. In the presented trials a reduction by three \log_{10} -levels as listed in the Order (EU) No. 142/2011 could only be established in liquid manure after heating for one hour at 80 °C (+/-2 °C). An inactivation of bacterial spores happens at temperatures higher than 100 °C (f. e. 110 °C, 0,5 h). The treatment of sewage sludge for thirty minutes and temperatures of 90 °C resp. 98 °C for thirty minutes resp. one hour didn't result in sufficient inactivation. The results of the high pressure temperature-pelleting indicate that the procedure can also inactivate vegetative germs like salmonella and *Escherichia coli* sufficiently. In general, sewage sludge can also contain pathogens of plant and weeds. In this case resistant pests and seeds are of special importance. They are capable to survive unfavourable environmental conditions for a long period. They can get into the sewage sludge via the waste water from households or industrial processing of food and plant products. Also the quarantine pest *Synchytrium endobioticum* (Se) belongs to this group. This soil-borne fungus causes the so-called potato wart of potatoes, a plant disease that still is of great importance for the potato production. Se is extremely persistent. The persistency is based on the creation of resting sporangia with which the fungus is able to survive unfavourable conditions for a long period. In the literature it is described that resting sporangia can stay viable in the soil up to 30 years (McDonnell and Kavanagh, 1980; Unger and Pietsch, 2002). The importance of this pest for the potato production is mainly based on the strong regimentations in the case of an infestation in a potato crop. For instance, the infested area remains prohibited for the production of potatoes until the infestation freedom is confirmed by an official examination of soil samples. Up to now there is no possibility to control this pest. Thus a contamination of sewage sludge must absolutely be prevented. An enhanced risk of contamination is given by discharging waste water from commerce and industry and from agriculture into a sewage plant. In the frame of the present research project it was checked if sewage sludge which is contaminated with Se could be inactivated by means of a heat treatment or the long-term storage. In doing so, there was the ambition to distinctly comprehend the influences on the resting sporangia and possibly existing reduction courses. That is why previously a detailed method validation was especially emphasised. For the first time quantitative examinations were carried out with isolated and dried resting sporangia, that were added to the sewage sludge in a gravimetrically defined quantity. Earlier examinations with Se were restricted to mere qualitative results.

Sewage sludge can be different from each other dependent on the catchment area of the sewage water plant and the procedures in the course of water treatment (used flocculants, hydraulic detention period in the digester tower). Thus sewage sludge (digested sludge) from four different sewage plants was considered in the experiments. In the case of the sewage sludge of the sewage plants of Möhringen and Mühlhausen only municipal sewage sludge is concerned. In contrast to that there is an airport in the catchment area of the sewage plant of Plieningen-Kemnat. The sewage plant in Büsnau only cleans wastewater from the University Stuttgart.

The tests on the heat treatment (autoclave) were carried out with sewage sludge from Mühlhausen resp. with sewage sludge of the University Stuttgart. Therefore Se contaminated sewage sludge was treated for twenty minutes at 133 °C (3 bar) resp. for two hours at 140 °C (4 bar). The investigations on the efficacy of the sewage sludge storage on the resting sporangia of Se were carried out with all four kinds of sewage sludge in comparison the storage in water at 20 °C. The samples were incubated at app. 20 °C over 1, 3, 7, 28, 84 and 152 days in a dark room to exclude an influence of ultraviolet light. The evaluation of the result was done for all treatment types by re-isolation of the resting sporangia from the treated sewage sludge samples. Subsequently the concentration of the resting sporangia in the collected spore suspension was established and an optical evaluation of the condition of the resting sporangia was conducted. Vital, denaturated and empty resting sporangia were differentiated.

After a heat treatment of sewage sludge from Mühlhausen at 133 °C app. 40 % of the resting sporangia were found to be vital. In the course of a treatment at 140 °C the portion of vital resting sporangia only was reduced to 33 %. The reduction was nearly similar in both repetitions and thus reproducible. In contrast 64 % viable resting sporangia were detectable in the non-heated control with sewage sludge.

The results of the examinations with sewage sludge of the University Stuttgart are less definite. The portion of totally re-isolated resting sporangia in the controls that were not treated by autoclave (32.9 resp. 28.8 %) lower than in the treated samples (38.5 and 46.6 %). It is assumed, that an accretion of resting sporangia on components in sewage sludge are responsible for these results.

From the examination of the heat treatment on resting sporangia of *Synchytrium endobioticum* can be concluded that neither the treatment at 133 °C for twenty minutes nor a treatment at 140 °C for two hours is sufficient for the inactivation of *Synchytrium endobioticum*.

Also the storage of the sewage sludge did not lead to a complete inactivation of the resting sporangia. Nevertheless, the results are very promising in respect to the influence of sewage sludge on the vitality of the resting sporangia. The storage of sewage sludge from Möhringen, Mühlhausen und Plieningen-Kemnat let assume that there is a connection between the duration of the storage and the reduction of vital resting sporangia. The portion of vital resting sporangia differed depending on the checked sewage sludge. After a storage period of 12 weeks 12.3 % vital resting sporangia could be re-isolated from sewage sludge from Möhringen. In the case of sewage sludge from Mühlhausen there were 11.0 % vital after 12 weeks of storage and in the case of sewage sludge from Plieningen-Kemnat only 4.6 %. In contrast, in the controls (storage in water) there were 53.0 % vital resting sporangia after 12 weeks of storage. Thus it can be concluded that the reduction of the resting sporangia of Se must depend from the kind of sewage sludge.

After a five months-storage the controls showed also a considerably higher portion of vital resting sporangia than for the stored samples of the sewage sludge. The control showed a portion of 45.8 %. In comparison, in sewage sludge from Möhringen 16.9 % could be detected vital, in sewage sludge from Mühlhausen 19.8 % and in sewage sludge from Plieningen-Kemnat 11.5 %. A comparison with the sewage sludge samples that were stored for 12 weeks revealed that the portion of vital resting sporangia was higher in the five months-stored samples. This can be explained from the fact that the sewage sludge for the trial for the storage about five-months was considerably older than the sewage sludge for all the other storage variants. It is assumed that the microbial activity in the older sewage sludges was reduced.

The result on the storage of sewage sludge at the University Stuttgart showed minor re-isolating-rates. A relationship between the storage duration and the reduction of vital resting sporangia could not be seen. It was assumed that resting sporangia were attached to organic particles in this sewage sludge and thus could not be re-isolated. Perhaps also the efficacy of microbial activity should be considered. The hydraulic detention period in the digester tower of the University Stuttgart was the longest with 50 days. For all other sewage plants the hydraulic detention period was between 10 and 20 days. In the case of a detention period of 50 days organic substances are degraded nearly completely. Possibly this resulted in the undersupply of the micro-organisms what could also explain the important reduction of the pathogen. For checking this theory also the microbial activity would have to be looked at what was not planned for this project. This aspect should be considered in possible subsequent projects as well as analyses on the microbial diversity in digested sewage sludge. The tests let assume that the storage of sewage sludge alone can reduce most organisms.

Originally also tests in a high pressure temperature pelleting facility were planned in the frame of the tests. Unfortunately in neither of the HTP-facilities the requirements for the work with quarantine pests could be met so that these tests could not be conducted. On the basis of the results which were generated with pests of humans and animals the efficacy on resting sporangia can be deduced. The endospore-creator *Bacillus globigii*, is used as biological tracer in the course of determination of, f. e., hydraulic detention period in bio gas facilities. Its endospores are similarly consistent like the resting sporangia of *S. endobioticum*. In the frame of the tests in the pelleting facility also *Bacillus globigii* was used as biological tracer and could be detected in the produced pellets (see par. 4.1.3.6). With this result it can be concluded that also *S. endobioticum* would have survived the pelleting.

The gained results let assume that by means of a targeted procedure during the storage of sewage sludge a further reduction of vital resting sporangia can be achieved, possibly a complete inactivation of the resting sporangia. It is assumed that the reduction of resting sporangia can be traced back to micro-organisms in sewage sludge. According to Rheinheimer (1991) the composition of the micro-flora in activated sludge depends on the composition of the waste water as well as on the treatment procedure. In the case of bacteria normally dominate Pseudomonads, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Sphaerotilus* and Nocardia. Amongst the Pseudomonads also chitin reducing representatives can be found. Amongst them is *Pseudomonas aeruginosa*, an ubiquitous bacterium that occurs in damp soils and waters but also in wash-bowls, showers, and facilities. *Pseudomonas aeruginosa* is a facultative aerobe vivid bacterium that could also be detected in media with very low nutrient supply. That is why this bacterium is capable to survive an anaerobe digesting and could be present in digested sludge. Folders et al. (2001) could not only detect the expression of chitinase but also prove that the built chitinase is homologous to the chitinase of *Serratia marcescens*, which is also an ubiquitous bacterium that occurs in the soil, in water and on animals and plants and also the facultative anaerobe *Bacillus circulans*. Thus chitinase building micro-organisms can be present in sewage sludge. This is the basic condition for a microbial reduction of *S. endobioticum*.

II Literature based assessment of sewage sludge treatments in respect to their reducing efficacy on pests

Annex 2 of the draft of the Sewage Sludge Ordinance (2010 resp. 2013) lists treatments that are more efficient for the sanitation of sewage sludge than usually applied treatments in Germany. Heat treatment procedures are especially suitable to fulfil the requirements of the Sewage Sludge Ordinance in respect of hygiene from the point of human, animal and plant health. Specified are the sludge pasteurization, the heat conditioning, the aerob-thermophile sludge treatment and the high temperature dehydration. Properly applied these treatments can largely ensure a safe utilization of sewage sludge. In the case of most micro-organisms temperatures above ca. 40° - 45° C lead to an inactivation and killing of the organisms. This is also true for most of the pathogens of plants and weeds. However, there are exemptions which can be attributed to physiological characteristics of the organisms. For instance, the causal agent of

the potato wart disease, *Synchytrium endobioticum*, but also *Clostridium* spp., is inactivated by none of the procedures. This is proofed by the tests which were carried out in the frame of this research project. In addition Steinmüller et al. (2012 and 2013) reported that *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* is able to survive the sludge pasteurisation. The survival of seeds of *Abutilon theophrasti* is also most likely. According to Bloemhard et al. (1992) the seeds can survive a heating to more than 100 °C for 15 min. The sludge pasteurisation is done at 70 °C for 60 minutes.

The composting of sewage sludge is a reliable, more efficient treatment for the reduction of pathogens and weeds. The sanitising effectiveness of the composting is based on a thermic effect, on the creation of toxic resp. antibiotic effective substances as well as via microbial degradation. Here can also be assumed that with the exemption of *Clostridium* spp., a complete inactivation of pathogens of humans and animals will work. Literature based is the inactivation of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Investigations of Bøen et al. (2006) and Steinmüller et al. (2012) describe a complete inactivation of the cysts at 50 °C for 8 days at least. According to Steinmüller et al. (2012) *Synchytrium endobioticum* is not killed and also potato ring rot *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* survives the composting process (Steinmüller et al., 2007).

A further treatment procedure for the reduction of pathogens and weeds is the shifting of the pH-value to values above 12.8 via addition of lime. Most soil bacteria prefer pH-values between 4.5 and 10 (Husson, 2013). Only specified microorganisms e.g. alcaliphilic bacteria can live above pH-values of 10 to 12 as a maximum. Using burnt lime there is an additional heat effect. Compared with the respective single effects the combination of both effects leads to an effective sanitation impact (Capizzi-Banas, 2004). Also this procedure guarantees a sufficient reduction of most organisms. Nevertheless it is most likely that *S. endobioticum* survives this treatment. Langerfeld (1984) could only ascertain a minor influence on the agent by shifting the pH-value to 12.38. Also cysts of potato cyst nematodes survived these treatments (Spaull und McCormack, 1989).

Pathogens of human and animals can be also reduced sufficiently by a treatment of sewage sludge in planting beds to a wide extent. The cited uncertainty refers to the results on the long-term storage gained from this research project. The tests did show that EAHEC and *Salmonella* are reduced below the detection limit, but there is no complete destruction after 36 weeks of storage. For the phytopathogenic causal agents *Synchytrium endobioticum* (potato wart disease) and *Polymyxa betae* as well as the cysts of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* it can be assumed that a long-term storage does not suffice for a complete inactivation. These pathogens stay more than 10 years viable in the soil by creation of survival organs (Asher and Blunt, 1987; Heijbroek, 1987; Turner, 1996; Stachewicz, 2003).

In summary it can be said that the majority of pathogens of humans, animals and plants as well as weed seeds can be inactivated by means of the treatments that are listed in Annex 2 of the Sewage Sludge Ordinance (2010 resp. 2013). Exemptions are organisms that create persistent survival organs, like *Clostridium* spp. and *S. endobioticum*. Dependent on the treatment procedures also cysts of the potato cyst nematodes, thermo-resistant viruses and hard shelled weed seeds, f. e. the seeds of *Abutilon theophrasti* belong to the organisms which cannot be inactivated.

III Aspects of hygiene in terms of the quality assurance of sewage sludge products

The drafts from 2010 and 2013 on the amendment of the Sewage Sludge Ordinance (AbfKlärV, 2010 and 2013) provide exemptions from more efficient sanitizing treatments of sewage sludge resp. the obligation for the testing on salmonella if the sewage sludge is subject to a quality assurance system. According to the draft of 20-08-2010 (AbfKlärV, 2010) the sanitizing treatment can be omitted, if a risk analysis which was carried out in the frame of the quality assurance reveals that a comparable security level could be achieved with alternative measures. The draft of 26-06-2013 (AbfKlärV, 2013) requires a conception on minimizing risks of pathogens for humans and animals, established by the responsible body of the quality

assurance system and grants the exemptions without the fulfilment of further conditions in the case that a membership in a quality assurance system exists.

In the frame of this project risk factors in the course of the production and use of sewage sludge as well as risk minimizing measures on the side of the responsible body of the quality assurance system were analyzed as an example. For this reason the International Standard for Plant Health Measures (ISPM No. 11) was considered which can be adapted for the assessment of risks for humans, animals and plants by organic fertilizers. This revealed that a quality assurance system has only a limited risk minimizing influence which normally does not lead to an improved resp. equivalent sanitation level like an additional sewage sludge treatment. The sewage sludge of the sewage plants in Germany normally is not treated with more efficient sanitizing treatments and the quality assurance provides no effective measures that could render a sanitation treatment unnecessary.

An exemption from the treatment obligation in the scope of quality assurance without equivalent sanitation measures is therefore not supported. As a result the quality controlled product would have a lower hygienic status than the non-quality controlled but treated and tested product. This would not meet the sense of quality assurance and would be misleading from the microbiological-hygiene point of view.

In the case that a further treatment is no longer aimed at because the use of sewage sludge for fertilizing purposes will be medium-term ceased, existing application restrictions and prohibitions should be continued. Additionally all sewage sludge should be tested on indicator germs and if limit values were exceeded it should be treated for improving the hygienic status compared to the status quo.

A risk assessment in the case without an obligation for a more efficient sanitizing treatment could firstly be limited to an assessment of the quantitative content of selected infectious agents, f. e., salmonella and *Escherichia coli* (1×10^2 KbE/g for salmonella and 1×10^3 KbE/g for *E. coli*) until further results from research projects on the possible uptake of infectious agents for humans and animals via the plant root are available. Thus an essential component of quality assurance in the amended Sewage Sludge Ordinance must be the consideration of quantitative micro-biological tests. In the case that the limit values are exceeded by a power of ten, measures on the reducing of the germ density are necessary. From the scope of plant health viable seeds and reproductive parts of plants were suitable as indicators. The testing on viable seeds and reproductive parts of plants could provide additional information on the sanitation level of the sewage sludge from the view of plant health and prevent loading of the sewage sludge with weed seed. In respect to the limit values and detection methods the requirements of the Bio Waste Ordinance (BioAbfV, 2013) could be used which are available for liquids as well as for solid substances.

Due to the possible presence of pathogenic microorganisms in sewage sludge and organic fertilizers and the presented results for pathogens of humans and animals a treatment of the sewage sludge resp. of organic fertilisers before the application seems to be reasonable to hinder resp. to reduce the entry of pathogens into the environment. This refers also to resistant resp. multi resistant germs and their entry into the forage and food chain, as well as the spread of resistant genes. With regard to a risk assessment as well as to measures on the risk minimization in respect to a utilization of the sewage sludge it is possible that on the one hand application restrictions resp. application prohibition in respect to the origin of the substrates or the application areas and on the other hand examinations of the sewage sludge on the content of selected pathogens and weeds contribute significantly. F. e., a mandatory examination could include beside the quantitative classification of salmonella also other indicator organisms like *Escherichia coli* and/or *Enterococcus ssp.*). It can be seen from the results of the presented experiments that a more efficient sanitizing treatment of sewage sludge e.g. in the form of a heat treatment, a long-term storage or by the high pressure temperature-pelleting can ensure a significant reduction of vegetative germs. Thus a biotechnological treatment of the sewage sludge is a meaningful measure for risk reduction.

In the case of a treatment obligation it can be assumed that most relevant pathogens of humans and animals in sewage sludge are eliminated. Exceptions are spore-creating bacteria or organisms. Also the ma-

majority of the viruses are reduced resp. inactivated so that there isn't much fear of infection risks. The same is also true for the majority of plant pathogens and weeds with the exception of the resistant quarantine pests of the potato. As a risk reducing measure with respect to quarantine pests of the potato extremely risky sewage waters from the professional potato and beet processing should be excluded from the entry into the sewage plant resp. the later use in agriculture. This should also apply for the washing, sorting and other processing of potatoes resp. sugar beets because in these plants big quantities of risky adherent soil get into the sewage water.

3 Einleitung

Im Jahr 2011 fielen in Deutschland 1,9 Mio. Tonnen Klärschlamm (Trockensubstanz) aus kommunalen Abwasserbehandlungsanlagen an, wovon 567.187 Tonnen (ca. 29 %) als Dünger in der Landwirtschaft verwendet wurden (BMU, 2014). Unter dem Begriff Klärschlamm werden ausgefaulte bzw. stabilisierte Schlämme, die bei der Abwasserreinigung anfallen, zusammengefasst. Als Nebenprodukt der Abwassereinigung enthalten Klärschlämme je nach Herkunft des Abwassers, nicht nur viele Nähr- und Humusstoffe, sondern auch all die Komponenten (Mikroorganismen, chemische und organische Substanzen), die im gereinigten Wasser nicht erwünscht sind, weil sie ein potentiell Risiko für Mensch, Tier, Pflanze oder Umwelt darstellen. Die Bewertung von Gesundheitsrisiken erfolgt heute durch die so genannte Risikoanalyse. Risiko wird üblicherweise definiert als die Möglichkeit des Zusammentreffens irgendeiner Form des Leids, des Verlustes oder Schadens. Risiko wird nach der FAO/WHO Codes Alimentarius Kommission definiert als die Wahrscheinlichkeit einer gesundheitlichen Schädigung und daraus resultierender Konsequenzen, die sich aus einer Gefahr ergibt. Gefahr definiert die FAO/WHO Codes Alimentarius Kommission als ein Agens oder ein Faktor von biologischer, chemischer oder physikalischer Natur mit der Eigenschaft, eine Gesundheitsschädigung hervorrufen zu können (Zangerl, 2007). Die Risikoanalyse besteht nach Forsythe (2010) aus drei Komponenten:

- die Risikoeinschätzung: sie identifiziert das Risiko und Faktoren, die es beeinflussen,
- das Risikomanagement: es zeigt, wie das Risiko kontrolliert oder verhindert werden kann;
- und die Risikokommunikation: sie informiert andere über das Risiko.

In Bezug auf "Risikoanalysen" variiert die Terminologie über Disziplinen und Länder (Anonym (a), 2010). Im Bereich der Pflanzengesundheit existiert ein internationaler FAO-Standard, der sich auf das Internationale Pflanzenschutzübereinkommen IPPC stützt. Der Standard ISPM Nr. 11 wird seit Mitte der 90iger Jahre durchgeführt, und ist auch auf die Situation bei der Verwendung von organischen Düngern in der Kreislaufwirtschaft anwendbar (Unger und Pietsch, 2002). So kann z.B. der Frage nachgegangen werden, welches Risiko für die Pflanzengesundheit von einem organischen Dünger unter praxisüblichen Bedingungen ausgeht. Bei der Risikoanalyse nach ISPM 11 handelt es sich um einen dreistufigen Prozess in dem zunächst die Schadorganismen und Verbreitungswege identifiziert und anschließend das daraus resultierende Risiko bewertet wird. Im letzten Schritt werden Managementoptionen zur Risikominderung ermittelt.

Dieser Bericht befasst sich primär mit Managementoptionen, d.h. Maßnahmen und Verfahren zur Risikominderung. Da Risikomanagementoptionen sehr stark vom vorliegenden Risiko beeinflusst werden, sollen zunächst die relevanten Schadorganismen betrachtet werden, die mit Klärschlamm verbreitet werden können.

Klärschlamm kann grundsätzlich jeden seuchenhygienisch relevanten Erreger enthalten, der mit dem Kot und Urin ausgeschieden wird, human- und tierpathogene Erreger, Zoonoseerreger sowie multiresistente Bakterien. Die Erreger werden mit dem Abwasser in die Kläranlage eingeleitet und gelangen durch die verschiedenen Reinigungsstufen in den Klärschlamm, soweit sie nach Angaben von Bulling (1988) nicht bereits im Abwasser oder bei der Klärschlammgewinnung absterben. Nach Carrington (1977) kommen Salmonellen, *Shigella*, *Escherichia coli*, Clostridien und *Mycobacterium tuberculosis* am häufigsten in Klärschlamm vor. Von besonderer epidemiologischer Bedeutung sind nach Böhm (2006) und Böhm (2007) Salmonellen, Enteroviren, Caliciviren, Cryptosporidien und parasitäre Dauerstadien wie Spulwurmeier. Ihr Vorkommen hängt vor allem von den epidemiologischen Bedingungen in einer Region ab (Strauch, 1991). Zoonotische Erreger finden sich vermehrt im Klärschlamm, wenn Schlachthofabwässer eingeleitet werden (Böhm, 2006). Nach Chale-Matsau (2005) können im Klärschlamm aber auch Erreger enthalten sein, die normalerweise pflanzenpathogen sind, beim Menschen jedoch ebenfalls Erkrankungen hervorrufen können. Eine Auswahl obligat pathogener und fakultativ pathogener Bakterien, die im Klärschlamm vorkommen

können, wird nachfolgend aufgeführt. Die Liste wurde von Strauch (1991) erstellt und an dieser Stelle nach Literaturangaben ergänzt (Anonym, 2006 c; Prazmo et al., 2003; Chale-Matsau, 2005):

- obligat pathogen:
 - *Salmonella* spp.
 - *Shigella* spp.
 - *Escherichia coli*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Yersinia enterocolitica*
 - *Clostridium perfringens*
 - *Clostridium botulinum*
 - *Bacillus anthracis*
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Vibrio cholerae*
 - *Mycobacterium* spp.
 - *Leptospira* spp.
 - *Campylobacter* spp.
 - *Staphylococcus* spp.
 - *Streptococcus* spp.
 - Legionellen
- fakultativ pathogen:
 - *Escherichia coli*
 - *Klebsiella*
 - *Enterobacter*
 - *Serratia*
 - *Citrobacter*
 - *Proteus*
 - *Providencia*
 - multiresistente Bakterien
 - *Helicobacter pylori*
 - *Plesiomonas shigelloides*
 - *Aeromonas* spp.
 - *Chromobacterium violaceum*
 - *Leclercia adecarboxylata*
 - *Rhodococcus australis*
 - *Acinetobacter calcoaceticus*
 - *Oligella urethralis*

Klärschlamm bzw. Abwasser ist regelmäßig mit Salmonellen kontaminiert, wie Untersuchungen von Haible (1989); Karuniawati (2001); Haumacher et al. (2005); Guzmán et al. (2007) und Gmelin (2009) zeigen. In allen untersuchten Klärschlammproben werden nach Haumacher et al. (2005) qualitativ Salmonellen festgestellt. Die ermittelten Konzentrationen sind jedoch gering und bewegen sich zwischen nicht nachweisbar und $3,0 \times 10^1$ KbE/ml. Nach Untersuchungen von Gmelin (2009) sind in 79,6 % aller Klärschlammproben Salmonellen zu finden. Die ermittelten Konzentrationen sind nach Angaben der Autorin gering mit bis zu max. 40 MPN/ml. Nach Haible (1989) werden in Klärschlamm bis zu $4,3 \times 10^2$ KbE/g TS an Salmonellen nachgewiesen. Einen etwas höheren Wert gibt Lang (1988 a) mit $2,5 \times 10^3$ KbE/ml an. Nach Philipp und Lang (1988) wird in Klärschlamm eine Vielzahl unterschiedlicher Salmonellen-Serovare nachgewiesen. Die Autoren finden in Klärschlamm bis zu 27 verschiedene Serovare, darunter auch *Salmonella* Thyphimurium. Aus Kläranlagenzulaufproben isoliert Karuniawati (2001) mehr als 35 verschiedene Salmonellen-Serovare.

Die Konzentrationen an *Enterobacteriaceae* in Klärschlamm liegen nach Haible (1989) und Lang (1988 a) im Bereich zwischen $>10^5$ KbE/ml und $>10^9$ KbE/g TS. Die Gehalte an Fäkalstreptokokken betragen nach Haible (1989) $>10^7$ KbE/g TS und nach Haumacher et al. (2005) durchschnittlich 10^4 KbE/ml. Fäkalcoliforme werden in Klärschlamm nach Untersuchungen von Haumacher et al. (2005) in Konzentrationen zwischen 10^3 und 10^5 KbE/ml festgestellt. Dagegen weist Chale-Matsau (2005) $8,9 \times 10^7$ KbE/g an Fäkalcoliformen nach. Die Zahl der Coliformen beträgt nach Lang (1988 a) in Klärschlamm bis zu 10^7 KbE/ml. Die Gehalte an thermophilen Actinomyceten in Klärschlamm liegen nach Haumacher et al. (2005) in einem Bereich zwischen 10^1 und 10^4 KbE/ml. *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* werden nach Untersuchungen von Stampi et al. (1999) durchschnittlich in Klärschlamm in Konzentrationen von 278 MPN/g TS bzw. 1.403 MPN/g TS nachgewiesen.

Im Gegensatz zu weniger entwickelten Regionen ist in Mitteleuropa wegen der geringen Prävalenz von Endoparasitosen in der Bevölkerung zwar mit einer entsprechend niedrigeren Belastung des Abwassers mit Dauerstadien humanpathogener Parasiten (z. B. *Ascaris*, *Trichuris*, *Enterobius*) zu rechnen. Zu berücksichtigen sind aber auch Dauerstadien von Tierparasiten, die aus landwirtschaftlichen Betrieben, Zoos und anderen Tierhaltungen, von Schlachthöfen oder aus Haushaltungen in das Rohwasser gelangen können und zum Teil auch für Menschen infektiös sind. Außerdem führen Mischkanalsysteme der Abwasserreinigungsanlage bei Regenfällen auch Schmutzwasser von Straßen zu, das Kot von Hunden und somit auch Parasitenstadien dieser Tierart enthält (z. B. *Toxocara*-Eier). In Rohschlamm von Kläranlagen kommt es zu einer Anreicherung von Parasitenstadien (Bauer, 2006). Da Parasitenstadien häufig schon in kleinen Dosen infektiös sein können und oft eine hohe Widerstandsfähigkeit besitzen, müssen sie bei der Hygienisierung berücksichtigt werden. Strauch (1991) hat eine Auswahl an Parasiten genannt, die in Form von Dauerstadien im Klärschlamm vorkommen können. Dies sind u. a. folgende Protozoen, Zestoden und Nematoden:

- Protozoen:
 - o *Cryptosporidium parvum*
 - o *Entamoeba histolytica*
 - o *Giardia lamblia*
 - o *Toxoplasma gondii*
 - o *Sarcocystis* spp.
- Zestoden:
 - o *Taenia saginata*
 - o *Taenia solium*
 - o *Diphyllobothrium latum*
 - o *Echinococcus granulosus*
- Nematoden:
 - o *Ascaris lumbricoides*
 - o *Ancylostoma duodenale*
 - o *Toxocara canis*
 - o *Toxocara cati*
 - o *Trichuris trichiura*.

Außerdem können nach Anonym (2006 c) und Hoppenheidt et al. (2008) in Klärschlamm *Cyclospora cayentanensis* und *Ancylostoma duodenale* / *Necator americanus* und *Balantidium coli*, *Ascaris suum* und *Hymenolepis nana*, *Schistosoma* spp. nachgewiesen werden. In Klärschlamm werden nach Untersuchungen von Chale-Matsau (2005) zwei *Ascaris*-Eier je Gramm TS nachgewiesen. In allen untersuchten Rohschlammproben werden nach Guzmán et al. (2007) *Cryptosporidien* in Konzentrationen bis zu $6,4 \times 10^2/10 \text{ g TS}$ nachgewiesen und in kompostiertem Klärschlamm sind es nach Angaben der Autoren noch maximal $4,3 \times 10^0/10 \text{ g TS}$.

In Abwasser und Klärschlamm kann auch eine Vielzahl von Viren enthalten sein, die von Menschen ausgeschieden werden und die die unterschiedlichsten Krankheiten hervorrufen können. 1991 waren mehr als 100 Viren bekannt, die von Menschen mit dem Kot ausgeschieden werden können und jeden Tag kommen neue hinzu (Strauch, 1991). Böhm (2002 a) führt folgende Viren an, die in Klärschlamm enthalten sein können: Enterovirus, Poliovirus, Coxsackievirus A und B, Echovirus und andere Enteroviren sowie Andeno-

virus, Reovirus, Hepatitis-A-Virus, Rotavirus, Astrovirus, Norwalk-Virus, Coronavirus, Andeno-associated-Virus und Parvovirus, die alle in unterschiedlichen Typen vorkommen können.

Nach Anonym (2006 c) können im Klärschlamm noch weitere Viren enthalten sein: Hepatitis-E-Virus und Calicivirus. Nach Untersuchungen von Teltsch et al. (1980) und Carducci et al. (2000) sind Viren in 71 % bzw. 55 % aller Abwasserproben enthalten. Viren werden nach Angaben von Mayr (2002) in Konzentrationen von bis zu 10^{10} KID₅₀/g Stuhl von kranken oder infizierten Personen mit inapparenten Krankheitsverläufen ausgeschieden und können so ins Abwasser und in den Klärschlamm gelangen. Nach Puig et al. (1994) und Carducci et al. (1995) sind Enteroviren in 75 % bzw. 58 % der Abwasserproben enthalten. Die Konzentrationen an humanen Enteroviren liegen nach Angaben von Mayr (2002) in einem Bereich von $6,0 \times 10^0$ und $8,2 \times 10^4$ PFU/l. Smith und Gerba (1982) ermittelten in Abwasser Enteroviruskonzentrationen bis zu 2.962 PFU/20 l-Probe.

Laut Höll (2010) können Norwalk-Viren, eine Spezies der Noroviren, in Abwässern und belasteten Oberflächenwassern relativ häufig nachgewiesen werden. Lodder et al. (1999), Maurer et al. (2000), Maunula et al. (2005) und Hewitt et al. (2007) konnten Ausbrüche viraler Gastroenteritis auf mit Noroviren belastetes Trinkwasser zurückführen. Fong et al. (2010) wiesen in allen untersuchten Abwasserproben menschliche Adenoviren nach. Die Konzentration im Abwasser wird von den Autoren mit $1,1 \times 10^6$ Viren/l angegeben, wobei durch den Abwasserreinigungsprozess in der Kläranlage weniger als $2 \log_{10}$ (<99 %) zurückgehalten werden. Viren sind nach He et al. (2011) in 35,4 % der Abwasserproben enthalten. Rotaviren sind nach Angaben der Autoren die am häufigsten nachgewiesenen Viren in Abwasser mit 32,3 %, gefolgt von Astroviren mit 6,3 % und Noroviren mit 3,1 %. Nach Angaben von Philipp (2010) werden Coxsackieviren und Polioviren am häufigsten unter den Enteroviren in Klärschlamm nachgewiesen. In behandeltem Klärschlamm bilden nach Wullenweber und Agbalika (1984) Polioviren mit 41 % die größte Gruppe, gefolgt von Coxsackieviren der Gruppe B mit 25 % und ECHO-Viren mit 7 %, die restlichen 27 % der Virusisolate konnte nicht identifiziert werden. Nach Untersuchungen von Miles et al. (2011) wird die Konzentration an pathogenen Prionen in Klärschlamm bei einer Temperatur von 37 °C nach 15 d um 2,4 Zehnerpotenzen reduziert.

In Zusammenhang mit der Ausbringung von Klärschlämmen wird nach Wiechmann et al. (2012) auch die Problematik der Verbreitung von resistenten Krankheitserregern diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass es in Kläranlagen, begünstigt durch die hohen Bakterienkonzentrationen, zum Austausch von Antibiotikaresistenzen zwischen verschiedenen Bakterien kommen kann, die mit dem Abwasser beispielsweise aus Krankenhäusern eingetragen werden. Dadurch ist es möglich, dass neue Kombinationen von Antibiotikaresistenzen entstehen oder dass Antibiotikaresistenzen auf Bakterien übertragen werden, die bisher keine Resistenz(en) aufwiesen. Dabei spielen die multiresistenten Bakterien der Enterokokken, Staphylokokken und *Escherichia coli* zunehmend eine wichtige Rolle. Ihr Vorhandensein ist besonders häufig in Kläranlagen nachzuweisen, in die Abwässer von Schlachthöfen und aus Krankenhäusern eingeleitet werden. Nach Gözalan (2004) werden in Schlachthofabwässern häufiger resistente *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* im Vergleich zu kommunalen Abwässern und in kommunalen Abwässern häufiger resistente Staphylokokken im Vergleich zu Schlachthofabwässern nachgewiesen.

Reinthalter et al. (2003) untersuchten 767 *Escherichia coli*-Isolate aus Kläranlagen mit dem Ergebnis, dass die höchsten Resistenzraten in einer Kläranlage gefunden wurden, die nicht nur kommunales Abwasser, sondern auch Abwasser aus einem Krankenhaus reinigt. Im Abwasser wurden *Escherichia coli*-Stämme nachgewiesen, die Resistenzen gegenüber 16 von 24 untersuchten Antibiotika aufwiesen. 57 % aller *Escherichia coli*-Isolate waren resistent gegenüber Tetracyclin, bis zu 35 % gegenüber Cefalothin und bis zu 18 % der *Escherichia coli*-Isolate wiesen Resistenzen gegenüber Ampicillin und bis zu 12 % gegenüber Piperacillin auf. Die Untersuchungen von Reinthalter et al. (2003) zeigen auch, dass Klärschlamm, der keiner chemischen bzw. desinfizierenden Behandlung unterzogen wird, zur Verbreitung von resistenten *Escherichia coli*-Stämmen in der Umwelt beiträgt, wenn er in der Landwirtschaft verwertet wird.

Nach Untersuchungen von Böhm et al. (2004) sind 21 %, der aus Schlachthofabwässern isolierten *Escherichia coli* und 61 % der isolierten *Enterococcus faecalis* resistent gegenüber Antibiotika. In kommunalen Abwässern konnten die Autoren dagegen nur bei 41 % der Isolate resistente *Enterococcus faecalis*-Stämme nachweisen. Nach Untersuchungen von Gallert et al. (2005) sind die meisten aus Abwasser isolierten Fäkalcoliformen, Enterokokken und Pseudomonaden resistent gegenüber Penicillin G, Ampicillin, Vancomycin, Erythromycin, Sulfonamide und Trimethoprim. Die Autoren stellten auch fest, dass Pseudomonaden multiresistenter waren als Enterokokken und Fäkalcoliforme.

Bei multiresistenten Salmonellen bereitet vor allem das breite Wirtsspektrum Probleme, da die Übertragung durch belebte Vektoren auf Tier und Mensch direkt oder indirekt erfolgen kann (Böhm, 2007). Wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass Klärschlamm Krankheitserreger enthält, hängt von der Art und der Herkunft des Klärschlammes ab (Böhm, 2006). Neben Abwässern, die menschliche und tierische Ausscheidungen enthalten, kann vor allem bei Abwässern aus Krankenhäusern, Schlacht- und Viehhöfen, Tierkörperbeseitigungsanstalten und sonstigen Betrieben, die tierische Produkte verarbeiten, ein höherer Anteil an pathogenen Erregern angenommen werden. In den direkt in den Kläranlagen anfallenden, unbehandelten Klärschlämmen konnten Gesamtbakterienkonzentrationen von bis zu 10^{11} KBE/g nachgewiesen werden. Die Bakterien gelangen bereits in großer Menge in die Abwasserreinigungsanlagen, reichern sich bei der Sedimentation an und können sich durch die als Nahrung dienenden Abwasserinhaltsstoffe noch weiter vermehren (Stottmeister, 1989).

Neben den vielen verschiedenen menschen- und tierpathogenen Erregern sind auch pflanzenpathogene Erreger in die Risikobetrachtung einzubeziehen. Risiken für die Pflanzengesundheit ergeben sich durch widerstandsfähige Schadorganismen und Samen, die mit dem Abwasser aus Haushalten, der industriellen Verarbeitung von Lebensmitteln und anderen pflanzlichen Erzeugnissen und vergleichbaren Einleitern in den Klärschlamm gelangen. Die relevanten Organismen müssen in der Lage sein, ungünstige Umweltbedingungen unter Umständen über lange Zeit zu überdauern, bevor Wirtspflanzen erneut infiziert werden.

Ein besonderes Risiko geht von Quarantäneschadorganismen gemäß der EU-Richtlinie 2000/29/EG aus. Die Richtlinie dient dem Schutz vor einer Ein- oder Verschleppung sowie einer Ansiedlung von bekannten oder potenziellen Quarantäneschadorganismen bei der Einfuhr und dem innergemeinschaftlichen Verbringen von Pflanzen und pflanzlichen Erzeugnissen. Quarantäneschadorganismen können in der Regel nicht durch chemische Bekämpfungsmaßnahmen kontrolliert werden. Ihr Auftreten führt teilweise zu starken Einschränkungen der landwirtschaftlichen Bodennutzung, da sie langjährige Bodenverseuchungen verursachen können. Insbesondere Quarantäneschadorganismen der Kartoffel wie z.B. Kartoffelzystenematoden (*Globodera pallida* und *Globodera rostochiensis*), Schleimfäule der Kartoffel (*Ralstonia solanacearum* Rasse 3) und *Synchytrium endobioticum* (Kartoffelkrebs) (Unger und Pietsch, 2002) sind wegen ihrer langen Überdauerungsfähigkeit und großen Schädigung hervorzuheben.

Relevante phytopathogene Schadorganismen können den Nematoden, Viren, Bakterien, Pilzen als auch den Unkräutern zugeordnet werden. Nematoden können insbesondere durch Waschwasser in den Klärschlamm gelangen. Spaul und McCormack (1989) fanden in Schottland unabhängig von der Jahreszeit eine geringe Grundbelastung mit Kartoffelnematoden in Schlammproben von 9 Kläranlagen.

Von vielen phytopathogenen Viren gibt es Nachweise zur Überdauerungsfähigkeit in Wasser oder Abwasser. Das Sickerwasser von mit dem *Cucumber green mottle virus* infizierten Gurken im Gewächshaus bzw. von Gurkenabfällen führte zu Infektionen der Wirtspflanzen, wenn es in verdünnter Form zur Bewässerung verwendet wurde (van Dorst, 1988). Lesemann und König (1988) fanden pflanzenpathogene Viren verbreitet in Oberflächengewässern. Dabei handelte es sich vorwiegend um Viren, die keinen Vektor benötigten, in der Regel eine hohe Stabilität aufweisen und einen weiten Wirtspflanzenkreis haben. *Tomato bushy stunt virus* war noch nach der menschlichen Darmpassage infektiös (Tomlinson et al. 1982). Das *Tobacco mosaic virus* besitzt ebenfalls eine sehr hohe Stabilität und war noch nach 70 Tagen im Substrat einer mesophilen Vergärung nicht inaktiviert (Ceustermans et al., 2011).

Unter den Bakterien ist der Erreger der Schleimfäule der Kartoffel (*Ralstonia solanacearum*) in Oberflächengewässern dauerhaft nachweisbar (Elphinstone, 2001). *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, der Erreger der Kartoffelringfäule konnte von Bröther (2002) sowie Müller und Parusel (1998) in Sedimenten und Abwässern der Kartoffel verarbeitenden Industrie nachgewiesen.

Viele Pilze können widerstandsfähige Dauerorgane bilden mit denen ungünstige Perioden für längere Zeit überdauert werden können. Hierzu gehört insbesondere der Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*) dessen Dauersori bis zu 30 Jahre im Boden infektiös bleiben können (Unger und Pietsch, 2002). Nach Jevremenko und Jakloveva (1981) konnten vitale Dauerorgane des Erregers im Sediment von Klärbecken der kartoffelverarbeitenden Industrie noch nach zwei bis drei Monaten festgestellt werden, wenn die Temperatur unterhalb von 21 ° C lag. Auch pilzähnliche Formen wie *Polymyxa betae* und die Kohlhernie (*Plasmodiophora brassicae*) sind phytopathogen und können mit Hilfe ihrer Dauerorgane im Boden überdauern. *Polymyxa betae* hat vorwiegend als Vektor des *Rhizomania*-Virus (*Beet necrotic yellow vein virus*) Bedeutung. Sofern der Vektor ungünstige Perioden überdauern kann, trifft dies auch für das *Rhizomania*-Virus zu. Nach Dickens et al. (1995) wird *Polymyxa betae* durch verschiedene Abwasserbehandlungsverfahren nicht inaktiviert. Somit besteht das Risiko, dass der Erreger mit dem Abwasser aus der Zuckerrüben- und Gemüseverarbeitung in Kläranlagen gelangt.

Letztlich sind auch Unkräuter zu bedenken. Sie können im Wesentlichen in Form von Samen mit häuslichem Abwasser nach menschlicher Darmassage (z.B. Tomaten), über Waschwasser aus Haushalten und Industrie, sowie bei Mischsystemen über Regenwasser in die Kläranlage gelangen. Chytil (1986) fand neben *Solanum lycopersicum* (Tomate) hauptsächlich lebensfähige Samen von *Chenopodium album* (Weißer Gänsefuß), *Chenopodium ficifolium* (Feigenblättriger Gänsefuß) *Amaranthus retroflexus* (Zurückgebogener Amaranth), *Polygonum lapathifolium* (Ampferknöterich) und *Echinochloa crus-galli* (Hühnerhirse) in Klärschlamm.

Aus den Ausführungen wird deutlich, dass vielfältige Krankheitserreger und Parasiten von Mensch, Tier und Pflanze in unterschiedlicher Konzentration im Klärschlamm enthalten sein können und damit ein permanentes seuchen- und phytohygienisches Risiko bei der Verwertung anzunehmen ist, wenn keine ausreichende weitergehende Behandlung zur Reduktion der Konzentration von Krankheitserregern und Schadorganismen stattfindet.

Das aktuelle Risikomanagement der landwirtschaftlichen Verwertung von Klärschlamm erfolgt auf Grundlage der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992). Die AbfKlärV in ihrer aktuellen Fassung legt primär Grenzwerte für die Belastung mit Schwermetallen und anderen Schadstoffen fest. Den hygienischen Risiken des Klärschlammes wird durch Anwendungsverbote bzw. Anwendungsbeschränkungen Rechnung getragen. Die mittlerweile wesentlich höheren Anforderungen zum Schutz von Böden, Gewässern und Ressourcen wie auch zur Erzeugung gesunder Nahrungsmittel machen eine Novellierung der seit 1992 gültigen AbfKlärV notwendig. Hierbei steht auch eine Verschärfung der Hygienebelange zur Diskussion.

Mit der Novellierung der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 2010 bzw. 2013) sollen spezifische Anforderungen an die seuchenhygienische Qualität des Klärschlammes festgelegt werden. So ist grundsätzlich vorgesehen, dass Klärschlamm keine Salmonellen enthalten darf und er einer weitergehenden Behandlung zu unterziehen ist. Allerdings sehen die o.g. Entwürfe keine generellen Untersuchungen der Klärschlämme auf Salmonellen vor. Zulässige weitergehende Behandlungsverfahren, die bei Einhaltung aller Anforderungen der AbfKlärV zur Sicherstellung der seuchenhygienischen Unbedenklichkeit bei der Ausbringung von Klärschlamm geeignet sind, sind in Anlage 2 der Entwürfe benannt. Bei einer Anwendung von Klärschlammbehandlungsverfahren könnte in Zukunft eine breitere Anwendung von Klärschlamm ermöglicht werden. Um dies realisieren zu können, müssten Gesundheitsrisiken zuverlässig ausgeschlossen werden und eine verpflichtende Anwendung der weitergehenden Behandlungen erfolgen. Die spezifischen Belange der Phytohygiene sind bisher unberücksichtigt und aufgrund der bestehenden Kläranlagentechnik erfordert eine flächendeckende weitergehende Behandlung hohe Investitionen (Klages et al. 2009). Vor diesem Hin-

tergrund stellt sich die Frage, welche Risikomanagementoptionen geeignet sind, ein stabiles, seuchen- und phytohygienisch unbedenkliches Produkt zu gewährleisten.

Projektziele

Das Projekt umfasst drei Module:

1. Um geeignete Behandlungsverfahren identifizieren zu können, wurden gezielte Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Erregern aus den Bereichen der Phyto- und Seuchenhygiene durchgeführt. Bei den dafür notwendigen Untersuchungen fanden verschiedene technische Parameter Berücksichtigung, mit dem Ziel optimierte Bedingungen für weitergehende Behandlungen zu identifizieren. Dabei wurden weitergehende thermische Verfahren hinsichtlich ihrer hygienisierenden Wirkung auf ausgewählte Pathogene der Phyto- und der Seuchenhygiene bewertet bzw. einer experimentellen Prüfung unterzogen. Des Weiteren wurde die Wirkung der zu prüfenden Behandlungsverfahren auf die Toxine von *Clostridium botulinum* untersucht. Zu den experimentell geprüften Behandlungsverfahren gehören:
 - Thermische Behandlung von Klärschlämmen mit unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten
 - Lagerung des Klärschlammes
 - Hochtemperaturpelletierung
2. Die in Anhang 2 der Novellierung der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 2010 bzw. 2013) genannten weitergehenden Behandlungsverfahren wurden im Rahmen einer literaturbasierten Bewertung betrachtet und aus seuchen- und phytohygienischer Sicht auf ihre Eignung als hygienisierende Maßnahme geprüft. Die Bewertung soll Erkenntnisse über die Eignung von verschiedenen Vorsorgemaßnahmen für die Seuchen- und Phytohygiene ermitteln und mögliche Schwachstellen aufdecken.
3. Die Entwürfe zur Novellierung der AbfKlärV (AbfKlärV, 2010 bzw. 2013) sehen auch Ausnahmen von der weitergehenden hygienisierenden Klärschlammbehandlung vor. Nach dem Entwurf vom 20.08.2010 kann auf die hygienisierende Behandlung verzichtet werden, wenn eine im Rahmen der Gütesicherung durchgeführte Risikoanalyse zu dem Ergebnis kommt, dass mit alternativen Maßnahmen ein vergleichbares Sicherheitsniveau erreicht wird. Der Entwurf vom 26.06.2013 fordert vom Träger der Qualitätssicherung ein Konzept zur Minderung seuchenhygienischer Risiken. Aufgrund der Mitgliedschaft in einer Gütesicherung, kann ohne spezifische Bedingungen auf eine weitergehende Klärschlammbehandlung verzichtet werden. Welche Auswirkungen diese Ausnahmeregelung auf den Hygienestatus des Klärschlammes haben, wird in dieser Arbeit bewertet und es werden Handlungsoptionen im Sinne einer sinnvollen Seuchen- und Phytohygiene entwickelt.

4 Untersuchungen zum Einfluss von Druck und Temperatur auf seuchen- und phytohygienisch relevante Schadorganismen in Klärschlamm

4.1 Seuchenhygiene

4.1.1 Einleitung

In Klärschlamm und Wirtschaftsdüngern wie Gülle und Gärprodukten können pathogene Mikroorganismen, insbesondere auch Zoonoseerreger, vorhanden sein und eine Gesundheitsgefahr für Mensch und Tier darstellen (Appel et al., 2011). Die Untersuchungen zur Seuchenhygiene umfassen Erreger aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae*, thermoresistente Parvoviren sowie aerobe und anaerobe Sporenbildner. Dabei handelt es sich um eine enteroaggregative enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4, eine monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120, bovines Parvovirus (BPV) sowie *Clostridium sporogenes* als Vertreter der anaeroben Sporenbildner und *Bacillus globigii* als Repräsentant der aeroben Sporenbildner.

Im Mai/Juni 2011 erfolgte ein epidemieartiger „EHEC“-Ausbruch in Deutschland und Frankreich, in dessen Folge es zu schweren Erkrankungen, wie hämorrhagischer Colitis (HC), dem Hämolytischen Urämischem Syndrom (HUS), und Todesfällen kam. Verursacht wurde der Ausbruch durch einen enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 Stamm, der sowohl Eigenschaften der enteroaggregativen *Escherichia coli* (EAEC) sowie der klassischen enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) vereint. Da es sich um einen neuen Stamm handelt, ist über dessen Tenazität in der Umwelt bislang relativ wenig bekannt (Appel et al., 2011). Nach Angaben von Appel et al. (2011) und Beutin et al. (2011) scheint es derzeit so zu sein, dass der Erreger sein Hauptreservoir im Menschen besitzt, sich im Menschen vermehrt und nach Freisetzung über Fäkalien mit den Abwässern und Klärschlämmen in die Umwelt gelangt. Die minimale Infektionsdosis für EHEC O157:H7 liegt bei weniger als 100 Bakterien, demgegenüber die von EAEC-Stämmen bei 10^{10} KBE. Es ist davon auszugehen, dass der EAHEC-Stamm O104:H4 ebenfalls eine, dem EHEC O157:H7-Stamm vergleichbare, niedrige minimale Infektionsdosis aufweist (Appel et al., 2011; Beutin et al., 2011). Die Möglichkeit des Eintrags dieses Erregers über mit Wirtschaftsdüngern bzw. Klärschlämmen gedüngten Boden oder durch Bewässerung in die Umwelt, sowie Pflanzen zu kontaminieren und zu internalisieren, ist von besonderem Interesse (Beutin et al., 2011; EFSA, 2009, 2011). Hinsichtlich des Vorkommens Shigatoxin-produzierender *Escherichia coli* (STEC) in kommunalen Abwässern und Klärschlamm berichten Holler et al. (1999) von einer Prävalenz von 93% stx1 oder stx2-positiver Proben in Norddeutschland, und Vernozy-Rozand et al. (2002) von 53% bzw. 80% in Kläranlagen bzw. deren Lagerungslagunen. Zu einer Kontamination von Badewasser, Flüssen und Trinkwasser mit EHEC und einer anschließenden Infektion des Menschen kann es durch Fäkalien von Menschen, Haustieren und Wildtieren, und durch Abwässer, Gülle und Festmist aus der Tierhaltung kommen (Muniesa et al. 2006). Daher sollten in unseren Untersuchungen Daten in Bezug auf die Überlebensfähigkeit im Klärschlamm und in Wirtschaftsdüngern wie Gülle und Gärprodukten während einer Langzeitlagerung sowie bei unterschiedlichen Temperatureinwirkungen gewonnen werden.

Bei den Salmonellen handelt es sich um human- und tierpathogene klassische Infektionserreger, die aufgrund ihrer Bedeutung als Zoonoseerreger und Verursacher von Lebensmittelinfektionen nach wie vor von großer Bedeutung aus Sicht des Verbraucherschutzes sind. Nach Angaben verschiedener Autoren traten im Laufe der letzten 10 Jahre in zunehmendem Maße monophasische *Salmonella* Serovare mit Multiresistenzen weltweit auf (EFSA, 2009; Hopkins et al., 2012; Trüpschuch et al., 2013). Aufgrund ihrer relativ hohen Tenazität, dem wochen- bis monatelangen Überleben in der Umwelt, und nicht zuletzt wegen ihres Vorkommens in Abwasser und Klärschlamm, sind sie für die Untersuchungen von großem Interesse. Sahlström (2003) berichtet von Salmonellen-Nachweisen in über 50% behandelter Klärschlämme in Schweden.

Als Repräsentant der thermoresistenten Parvoviren wurde das bovine Parvovirus (BPV) aufgrund seiner hohen Hitzetoleranz und nicht zuletzt aufgrund seines guten Handlings ausgewählt.

Als Vertreter der Sporenbildner dienen *Clostridium sporogenes* und *Bacillus globigii*. *Clostridium sporogenes* ist ein nicht-toxischer Stellvertreter für proteolytische *Clostridium botulinum*-Stämme, der in der Überprüfung (Validierung) thermischer Prozesse in der Lebensmittelproduktion, der Herleitung von Temperatur-Zeitverläufen und als Modellorganismus für proteolytische *Clostridium botulinum*-Stämme Verwendung findet (Bradbury et al., 2012; Basaran-Akgul et al., 2013). Bei *Bacillus globigii* handelt es sich um einen für den Menschen nicht-pathogenen Vertreter der Gattung *Bacillus*, u.a. als Stellvertreter für *Bacillus anthracis* (Hosni et al., 2009), der in der Desinfektionsmittelprüfung verwendet wird und als Repräsentant der aeroben Sporenbildner sowie als biologischer Tracer in den Versuchen verwendet wird.

Die vorliegenden Untersuchungen dienen dazu, einen Überblick über die Widerstandsfähigkeit der unterschiedlichen untersuchten Erreger, insbesondere des neuen EAHEC O104:H4-Stammes, im Klärschlamm sowie den Wirtschaftsdüngern Gülle und Gärprodukten gegenüber Temperatureinflüssen sowie während der Langzeitlagerung von Klärschlamm zu erhalten. Ebenfalls sollte die Hochdrucktemperaturpelletierung (HTP) auf ihre Eignung hinsichtlich einer Nutzung als hygienisierende Behandlungsmöglichkeit des Klärschlammes im Sinne des Anhangs 2 der AbfKlärV (2010) getestet werden. Die erarbeiteten Erkenntnisse und Informationen aus den Untersuchungen sollten die Grundlage einer Risikoanalyse bzw. -bewertung in Bezug auf die seuchenhygienischen Aspekte der Klärschlammverwertung darstellen.

4.1.2 Material und Methoden

4.1.2.1 Erhitzungsversuche

In den Erhitzungsversuchen sollte die Tenazität der angewandten Erreger gegenüber Hitzeeinwirkungen in den unterschiedlichen Substraten (Wirtschaftsdüngern) untersucht werden. Als Substrate wurden im Vergleich Klärschlamm, Gülle sowie physiologische Kochsalzlösung (0,9%) verwendet. Aufgrund der zu erwartenden unterschiedlichen Tenazitäten der ausgewählten Erreger wurden die Erreger in den Versuchen in drei Versuchsgruppen unterteilt. In der ersten Versuchsgruppe, mit der geringsten Tenazität, wurden vergleichend Erreger aus der Familie der *Enterobacteriaceae* getestet. Dazu gehörte ein enteroaggregativer hämorrhagischer *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 Stamm und im Vergleich dazu ein *Escherichia coli*-Stamm (DSM 682) sowie eine monophasische Variante (Seroformel: O4, [5],12:i:-) der *Salmonella* Serovar Typhimurium Phagentyp DT120 (kurz: S. Typhim.). Im zweiten Versuchsansatz wurden die hitzeresistenten Parvoviren, als Repräsentant das bovine Parvovirus (BPV), untersucht. Die dritte Versuchsgruppe mit der höchsten Tenazität bildeten die Sporenbildner. Dabei wurden einerseits Sporen von *Clostridium sporogenes*, als Repräsentant der anaeroben Sporenbildner, und andererseits Sporen von *Bacillus atrophaeus* ssp. *globigii* (*B. globigii*), als Vertreter der aeroben Sporenbildner, vergleichend untersucht. Die Temperatur-Zeit-Kombinationen wurden für die jeweilige Versuchsgruppe anhand der zu erwartenden Tenazitäten ausgewählt. Die Versuchsdurchführung erfolgte im Wasserbad oder im Autoklaven.

Erhitzungsversuche mit Vertretern der *Enterobacteriaceae*

Die Vertreter aus der Familie der *Enterobacteriaceae* weisen von den in den Versuchen ausgewählten Erregern, die geringste Tenazität auf. Die Versuche wurden durchgeführt mit dem enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4, einem *Escherichia coli*-Stamm (DSM 682) und einer monophasischen Variante (Seroformel: O4, [5],12:i:-) der *Salmonella* Serovars Typhimurium DT120 (kurz: S. Typhim.). Die Erhitzungsversuche wurden im Wasserbad bei +50 °C (+/-2 °C) und +53 °C (+/-2 °C) für jeweils vier bzw. achtzehn Stunden, bei +60 °C (+/-2 °C) für eine, zwei bzw. vier Stunden und bei +70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde durchgeführt. In jedem Versuchsdurchgang wurden die Konzentrationen in den Ausgangsproben bestimmt sowie eine Kontrollprobe, die bei +6 °C (+/-2 °C) gelagert wurde, im Anschluss an den Versuch untersucht.

Herstellung der Bakteriensuspension:

Die Herstellung der jeweiligen Bakteriensuspension der Erreger erfolgte durch Überimpfen einer, nach morphologischen Kriterien typischen, Kolonie einer Reinkultur in 50 ml Müller-Hinton-Bouillon und anschließender Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden. Aus dieser ersten Passage wurden am folgenden Tag 100 µl in 50 ml Müller-Hinton-Bouillon überimpft und erneut für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet und somit die zweite Passage mit konstanten Konzentrationen erhalten. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend zur Beimpfung der Testproben verwendet.

Herstellung der Testproben:

Zur Herstellung der Testproben wurden 10 ml (bzw. g) des jeweiligen Substrates in sterile Reagenzröhrchen gegeben und mit 1 ml einer frisch hergestellten Bakteriensuspension (hergestellt wie oben beschrieben) des jeweiligen Erregers beimpft. Die Testproben wurden gut geschüttelt und anschließend in den Versuchen verwendet.

Erhitzungsversuche mit dem Bovine Parvovirus

In den Versuchen wurde das Bovine Parvovirus (BPV) als Repräsentant der hitzeresistenten Parvoviren verwendet. Als Versuchsparameter wurden die Temperatur- / Zeit-Kombinationen +70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde und 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde gewählt und in den Substraten Klärschlamm und Gülle getestet. Dazu wurde das BPV auf spezielle Sandwich-Keimträger aufgebracht und so in die vorerhitzten Substrate eingebracht.

Herstellung der Sandwich-Virenträger:

Zunächst wurde das Virus aufgetaut und mit dem Beladungs-Puffer eine Virusverdünnung (1:10) hergestellt, so dass schlussendlich jeweils 1 ml der Virusverdünnung pro Keimträger vorhanden war. Das Beladen der Keimträger mit dem bovinen Parvovirus (BPV) erfolgte mithilfe spezieller Filtrationsvorsätze auf Zetapor (bzw. Virosorb)-Blättchen, auf denen sich nur das adsorbierte Virus befindet. Danach wurde der beladene Keimträger in ein vorgefertigtes Polycarbonatmembran-Briefchen gegeben, und rundum dicht verschweißt. Die so hergestellten Virenträger wurden für den Erhitzungsversuch in 50 ml-Röhrchen mit dem jeweiligen, vorerhitzten Substrat gegeben und im Wasserbad bei +70 °C (+/-2 °C) bzw. bei +80 °C (+/- 2 °C) für eine Stunde behandelt und anschließend ausgewertet.

Erhitzungsversuche mit Vertretern aus der Gruppe der Sporenbildner

Als dritte Gruppe wurden die Vertreter der Sporenbildner bzw. deren Sporen getestet. Bei den bakteriellen (Endo-)Sporen handelt es sich um Dauerformen, die eine ausgesprochen hohe Tenazität gegenüber Hitze und Trockenheit aufweisen. In den Versuchen wurden sowohl Sporen der anaeroben Sporenbildner, als Vertreter *Clostridium sporogenes*, als auch der aeroben Sporenbildner, als Repräsentant *Bacillus globigii*, verwendet.

Herstellung der Sporensuspension von *Clostridium sporogenes*:

Die Herstellung und Bereitstellung der Sporensuspension von *Clostridium sporogenes* erfolgte extern durch das, u.a. auf die Gattung *Clostridium* spezialisierte, RIPAC-Labor GmbH in 14476 Potsdam-Golm.

Herstellung der Sporensuspension von *Bacillus globigii*:

Zur Herstellung der Sporensuspension von *Bacillus globigii* wurde zunächst eine Bakteriensuspension angefertigt. Hierzu wurde eine morphologisch typische Kolonie in TSB überimpft und bei +36 °C (+/-1 °C) inkubiert, anschließend aus dieser ersten Passage 100 µl in TSB überimpft und bei +36 °C (+/-1 °C) bebrütet. Die so hergestellte zweite Passage der Bakteriensuspension von *Bacillus globigii* wurde zur Beimpfung mehrerer Kulturflaschen nach Roux (mit Hefeextrakt-Agar (MYA)) benutzt. Hierzu wurden 5-10 ml der Bakteriensuspension in die Roux-Flasche gegeben, mit Hilfe von sterilen Gaspelchen durch Schwenken gleich-

mäßig auf der Nährbodenoberfläche verteilt und die überschüssige Suspension anschließend abgesaugt. Die beimpften Roux-Flaschen wurden zunächst für 48 Stunden bei +36 °C (+/-1 °C), und anschließend für weitere 14 Tage bei +30 °C (+/-1 °C) bebrütet. Der Grad der Versporung wurde regelmäßig durch Herstellung eines nach RAQUETTE gefärbten Objektträgerpräparates und anschließender Beurteilung unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach der zweiwöchigen Inkubation wurden die Sporen abgeschwemmt und gesammelt. Hierzu wurden ca. 10-15 ml steriles destilliertes Wasser in die Roux-Flasche gegeben und durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken der Flasche mit Hilfe der Glasperlen die Sporen vom Nährboden abgelöst und in die Flüssigkeit aufgenommen. Die gewonnene Flüssigkeit wurde anschließend durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Hierzu wurde die Sporensuspension in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 3000 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten bei +4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert und verworfen. Zur Inaktivierung vegetativer Zellen wurde das, die Sporen enthaltende, Pellet in ca. 20 ml Propanol (65%) gelöst und gevortext. Nach einer Einwirkungszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur (20 °C) wurden ca. 20 ml steriles destilliertes Wasser dazu gegeben und bei 3000 Umdrehungen für 30 Minuten bei +4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20-30 ml sterilem destilliertem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde mindestens fünfmal wiederholt bis die gewünschte Reinigung der Sporen erreicht war. Anschließend wurde die Sporensuspension bei +4 °C (+/-1 °C) gelagert und in den Versuchen verwendet.

Herstellung der Testproben:

Zur Herstellung der Testproben wurden 10 ml bzw. 20 ml (oder g) des jeweiligen Substrates in sterile Reagenzröhrchen bzw. Schottflaschen gegeben und mit 1 ml bzw. 2 ml der jeweiligen Sporensuspension des entsprechenden Erregers beimpft. Die Testproben wurden gut geschüttelt und anschließend in den Versuchen verwendet.

Die Erhitzungsversuche wurden sowohl im Wasserbad bei +90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde und +98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, als auch im Autoklaven bei +110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten und +133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten durchgeführt.

4.1.2.2 Lagerungsversuche

In den Lagerungsversuchen sollte der Einfluss der Lagerung von Klärschlamm und Wirtschaftsdüngern auf das Überleben von pathogenen Mikroorganismen untersucht werden. Die Lagerungsversuche wurden über einen Zeitraum von 36 Wochen durchgeführt. Bei den verwendeten Substraten handelte es sich neben Klärschlamm, sowohl um Gülle als auch um Gärrückstände aus einer Biogasanlage. Die unterschiedlichen Substrate wurden mit Bakterien- bzw. Sporensuspensionen der ausgewählten Erreger im Verhältnis 1:10 bzw. 1:100 (Sporensuspension) beimpft um somit eine möglichst hohe Ausgangskonzentration der Erreger in den Substraten zu erhalten. In den Versuchen wurden als Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae*, das enteroaggregative hämorrhagische *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4 (kurz: EAHEC O104:H4) und eine monophasische Variante (Antigenformel: O4, [5],12:i:-) des *Salmonella* Serovars Typhimurium Phagentyp DT120 (kurz: S. Typhim. DT120), und als Repräsentant der sporenbildenden Bakterien Endosporen des aeroben Sporenbildners *Bacillus atrophaeus* ssp. *globigii* (kurz: *B. globigii*) verwendet. Als Lagerungstemperatur, orientiert an der Jahresdurchschnittstemperatur in Deutschland, wurden +10 °C (+/- 2 °C) gewählt. Avery et al. (2005) wählten in ihren Versuchen ebenfalls eine Temperatur von +10 °C anhand der Jahresdurchschnittstemperatur und den durchschnittlichen Temperaturen in den unterschiedlichen Lagerungsbehältern der organischen Abfälle / Wirtschaftsdünger.

Herstellung der Bakterien- bzw. Sporensuspensionen:

Die Herstellung der Bakterien- bzw. Sporensuspensionen erfolgte analog der Beschreibung bei den Erhitzungsversuchen.

Herstellung der Testproben:

Zur Herstellung der Testproben für die Lagerung wurden für jede Probe 90 ml des jeweiligen Substrates in sterile Plastikgefäße gegeben und anschließend mit 10 ml der entsprechenden Bakterien- bzw. Sporensuspension (1:10 verdünnt) beimpft. Die Proben wurden verschlossen, gut gemischt und umgehend in einen Kühlschrank bei +10 °C (+/- 2 °C) verbracht. Es wurden für jeden Zeitpunkt der Probenahme zwei parallele Proben für jeden Erreger hergestellt. Die mikrobiologischen Untersuchungen der Testproben erfolgten zu Beginn (Tag 0), nach 14 Tagen, sowie nach 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen des Versuchs.

4.1.2.3 Versuche an der Hochdrucktemperaturpelletierungsanlage (HTP-Anlage)

Die Hochdrucktemperatur-Pelletierung (HTP) von Klärschlamm sollte auf ihren Effekt einer Reduktion von Krankheitserregern geprüft werden. Dazu sollte der Einfluss des Pelletierungsprozess, v.a. die Wirkung von hoher Temperatur und hohem Druck, auf die ausgewählten Erreger in unseren Versuchen untersucht werden. Die Versuche wurden in einer Pelletierungsanlage an der Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg durchgeführt. Es wurde eine Pelletpresse RMP 250 der Firma Münch mit einer Ringmatrize 6x39 mit einem Pressverhältnis von 1:6,5 (zylindrische Presskanäle) verwendet. Bei dieser Matrize entstehen nach Angaben der Hochschule für Forstwirtschaft Rottenburg Presskanaldrücke bis zu ca. 250 MPa (=2500 bar) und Temperaturen von 90 °C bis 180 °C. Eine Temperatur von mehr als 150 °C zeigt sich durch eine dunkle Verfärbung der Pellets, die durch die chemische Zersetzung des Holzes hervorgerufen wird. Da Klärschlamm bereits humanpathogene Mikroorganismen enthalten kann, bestanden Bedenken hinsichtlich der unkontrollierten Verbreitung der Mikroorganismen während des Pelletierungsprozesses, z. B. durch starke Staubbildung. Aus betriebstechnischen Gründen (Einstellung der Anlage auf eine neue Matrix, stärkere Abnutzung der Matrices durch metallhaltigen Klärschlamm) konnte der Versuch (Pelletierung) nicht mit Klärschlamm, sondern stattdessen, nur mit Holzspänen durchgeführt werden. Im Versuch wurden Fichtenspäne mit einem Wassergehalt von 9,7 % verwendet. Es erfolgte keine Zugabe von Dampf, aber Wasser wurde in Form der Erreger-Suspension hinzugegeben. Aus Arbeitsschutzgründen wurden anstelle der pathogenen Erreger nicht-pathogene Vertreter der jeweiligen Bakterienspezies verwendet. In den Versuchen wurde der *Salmonella*-Impfstamm *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral (kurz: S. Zoosaloral), der attenuierte Kontrollstamm *Escherichia coli* K12 (kurz: E. coli K12) und als biologischer Tracer Sporen von *Bacillus globigii* verwendet. Die beiden stellvertretenden Stämme S. Zoosaloral und K12 wurden in Vorversuchen hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz im Vergleich zu anderen *Salmonella*- und *Escherichia coli*-Stämmen getestet und konnten somit repräsentativ für die sonst in den Versuchen verwendeten Erreger aus der Familie der *Enterobacteriaceae* in dem Versuch angesehen werden. Nach Aussage der Hochschule für Forstwirtschaft Rottenburg, hat die dortige Pelletieranlage einen Wirkungsgrad von 60 %, was bedeutet, dass bei der Pelletierung nur etwa 60 % der Holzspäne zu Pellets verarbeitet werden. Die restlichen 40 % werden nicht oder nur unvollständig pelletiert. Deshalb werden für die Ergebniserhebung sowohl Pellets, als auch das anfallende Staub-Pellet-Gemisch herangezogen.

Durchführung der Versuche:

Zunächst wurden zwei Vorversuche durchgeführt, einerseits ein Erhitzungsversuch um die Hitzeresistenz der verwendeten Erreger *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral und *Escherichia coli* K12 im Vergleich zu den in den übrigen Versuchen getesteten Erregern zu vergleichen. Und andererseits wurde der Einfluss der verwendeten Holzspäne auf das Überleben der Erreger in einem Vorversuch untersucht.

Herstellung der Bakterien- und Sporensuspensionen:

Die Bakteriensuspensionen wurden wie bereits zuvor beschrieben für die verwendeten Erreger *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral und *Escherichia coli* K12 vorbereitet. Des Weiteren wurde auch die Sporensuspension für *Bacillus globigii* verwendet.

Herstellung des Probenmaterials:

Die Holzspäne wurden direkt zu Beginn des Versuchs mit einer Mischung der Bakterien- und Sporensuspensionen im Verhältnis 1:1:0,1 (*Salmonella* Typhimurium Zoosaloral: *Escherichia coli* K12: *Bacillus globigii*) beimpft. Zu diesem Zweck wurden 10 ml bzw. 20 ml der gemischten Bakterien-/Sporensuspension pro Kilogramm Holzspäne gegeben und mit Hilfe eines Bohrquirls gut gemischt. Nach dem Anlaufen und der Feineinstellung der Pelletpresse wurde die Anlage durch den Einfülltrichter mit den kontaminierten Holzspänen beschickt und in regelmäßigen Abständen Proben der Pellets sowie des neben der Matrize herausfallenden Staub-Pellet-Gemisches genommen. Des Weiteren wurden zu Beginn und am Ende des Versuchs Proben der kontaminierten Holzspäne zur Ermittlung der Konzentrationen in den Ausgangssubstraten vor der Pelletierung und als Kontrollproben nach Ende des Versuchs genommen und untersucht.

4.1.2.4 Nachweismethoden

Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe

Zur quantitativen Untersuchung einer Probe wurde als erster Schritt eine dekadische Verdünnungsreihe benötigt. Hierzu wurden 10 (20) ml des Probenmaterials in 90 (180) ml einer sterilen physiologischen (0,9%ig) Kochsalzlösung eingewogen bzw. pipettiert und über Nacht im Kühlraum bei +6 °C (+/-2 °C) auf den Schüttler gestellt. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe (10^{-1}) wurde eine dekadische Verdünnungsreihe angefertigt in dem 1 ml der Vorverdünnung in 9 ml sterile 0,9%ige Kochsalzlösung pipettiert und anschließend auf dem Reagenzglasschüttler vermischt wurde. Aus dieser zweiten Verdünnungsstufe (10^{-2}) wurde wiederum 1 ml in 9 ml sterile 0,9%ige Kochsalzlösung pipettiert um die dritte Verdünnungsstufe (10^{-3}) zu erhalten. Diesem Prinzip folgend wurden die Proben weiter verdünnt bis die gewünschte Endverdünnungsstufe erreicht war.

Most Probable Number (MPN)-Verfahren

Die Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe war dem MPN-Verfahren vorangestellt, die wie oben beschrieben, bis zur gewünschten Verdünnungsstufe hergestellt wurde. Anschließend wurden aus jeder Verdünnungsstufe je ein Milliliter in drei parallele Reagenzgläser mit der, dem jeweiligen Bakterium (EAHEC O104:H4, *Escherichia coli*, *Salmonella* ssp.) entsprechenden, Anreicherungsbouillon überimpft und geschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation, je nach Bakterienart, aerob bei 36 °C (+/-1 °C) bzw. 42 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden. Daran schloss sich je nach Erreger die Auswertung bzw. die Überimpfung auf einen oder mehrere Selektiv-Nährböden an. Die Nährböden wurden für jede Verdünnungsstufe gedrittelt und aus jedem Parallelröhrchen wurde mit einer sterilen Impföse auf einem Drittel der Platte ausgestrichen. Die Agarplatten wurden aerob bei 36 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden bebrütet.

Die Auswertung erfolgte nach der Bebrütung in dem jedes Drittel beurteilt und anhand eines Farbumschlages des Nährbodens bzw. des typischen Koloniewachstums als positiv bzw. als negativ bewertet wurde. Bei nicht eindeutigen Wachstum wurde das Ergebnis durch eine weitere Testung, z.B. durch spezifische serologische oder biochemische Nachweise je nach Erreger, verifiziert. Auf diese Weise wurde ein dreistelliger MPN-Code erhalten und mithilfe der korrigierten Tabelle nach De Man (1983) ausgewertet. Die MPN-Methode ermöglichte eine direkte Konzentrationsbestimmung von Bakterien, auch beim Vorliegen nur geringer Konzentrationen.

Nachweis von EAHEC O104:H4

Der quantitative Nachweis für EAHEC O104:H4 wurde in Anlehnung an die, nach Beutin et al. (2011) beschriebene Methode, mittels MPN-Verfahren durchgeführt. Zunächst wurde eine dekadische Verdünnungsreihe angefertigt und von dieser jeweils ein Milliliter der entsprechenden Verdünnungsstufe in drei parallele Röhrchen mit neun Milliliter BRILA-Bouillon gegeben, gevortext und anschließend bei 36 °C (+/-1 °C)

für 24 Stunden inkubiert. Die verdächtigen Röhren, die eine Trübung zeigten, wurden anschließend auf gedrittelten chromogenen STEC O104:H4-Spezialnährböden (Fa. Mast Diagnostika) für jede Verdünnungsstufe ausgestrichen. Die Beurteilung erfolgte anhand der Koloniemorphologie, insbesondere der typischen malvenfarbigen Färbung der Kolonien, sowie evtl. durch biochemische Bestätigung. Das Wachstum anderer Bakterien, u.a. auch anderer STEC, wurde weitestgehend durch eine Antibiotikasupplementierung der Spezialnährböden unterdrückt. Auf diese Weise erhielt man einen dreistelligen MPN-Code der anhand der korrigierten Tabelle nach De Man (1983) ausgewertet wurde.

Nachweis von *Escherichia coli* DSM 682

Bei dem Nachweis von *Escherichia coli* DSM 682 fand ebenfalls das MPN-Verfahren Anwendung. Wie bereits erwähnt, bildete die Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe die Grundlage. Von der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden je ein Milliliter in drei parallele Röhren mit neun Milliliter MacConkey-Bouillon gegeben, gevortext und anschließend bei 36 °C (+/-1 °C) für 24-48 Stunden aerob inkubiert. Verdächtige Röhren zeigten sich durch einen Farbumschlag von lila zu gelb und wurden anschließend auf gedritteltem MacConkey-Nährboden für jede verdächtige Verdünnungsstufe ausgestrichen. Die Beurteilung erfolgte anhand der Koloniemorphologie, dabei zeigten sich typische Kolonien als rosa bis rote Kolonien, die einen rosa Trübungshof im Bereich des Koloniewachstums des ursprünglich klaren Nährbodens hervorriefen. Auf diese Weise erhielt man einen dreistelligen MPN-Code der anhand der korrigierten Tabelle nach De Man (1983) ausgewertet wurde.

Nachweis von *Salmonella* ssp. (monophasische Variante der Serovar Typhimurium)

Das MPN-Verfahren wurde ebenfalls für den quantitativen Nachweis von *Salmonella* ssp. verwendet. Dazu wurde von der Probe eine dekadische Verdünnungsreihe in 0,9%iger Kochsalzlösung bis zur benötigten Verdünnungsstufe angefertigt. Aus diesen Verdünnungsstufen wurde je Verdünnungsstufe jeweils ein Milliliter in drei parallele Reagenzgläser mit neun Milliliter gepuffertem Peptonwasser pipettiert. Eine aerobe Inkubation schloss sich bei +36 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden an. Danach wurde aus der Voranreicherung je Röhren 100 µl in 10 ml Anreicherungsbouillon nach Rappaport-Vassiliadis pipettiert und aerob +42 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden bebrütet.

Anschließend wurde auf Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)- und Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose (BPLS)-Agar auf jeweils gedrittelten Platten ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte aerob bei 36 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden. Im Anschluss wurden die Drittel der Platten anhand der typischen Koloniemorphologie und des typischen Erscheinungsbildes auf den Spezialnährböden ausgewertet. Salmonellen erschienen auf dem BPLS-Agar als blassrosafarbene, durchsichtige Kolonien in deren Umgebung es zusätzlich durch pH-Wert-Änderung zu einem Farbumschlag des Nähragars nach rosa bis pink kam. Das in XLD-Agar enthaltene Natriumdesoxycholat diente der Unterdrückung des Wachstums der gramnegativen Begleitflora. Eine Schwefelwasserstoffbildung wurde durch die Ausfällung von schwarzem Eisensulfid aus Thiosulfat und Eisen-III-Sulfat gezeigt, durch das die durchsichtigen Kolonien ein schwarzes Zentrum in den Kolonien aufwiesen, woran auch Salmonellen zu erkennen waren.

Beim Vorhandensein verdächtiger Kolonien wurde mittels steriler Impfüse eine verdächtige Kolonie abgenommen und ein Dreiösenausstrich auf Standard I-Agar angefertigt und aerob bei 36 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden bebrütet. Dies diente der Anfertigung von Reinkulturen zur weiteren Charakterisierung. Von den Reinkulturen wurde eine Kolonie abgenommen und mit Hilfe der Objektträgeragglutination mit speziellen Anti-Salmonella-Testseren auf das Vorhandensein salmonellenspezifischer Oberflächenantigene getestet.

Nachweis von Bovinem Parvovirus (BPV)

Der Nachweis des Bovinen Parvovirus (BPV) erfolgte durch Aufarbeitung und Auswertung der Sandwich-Virenträger. Die hergestellten Virenträger wurden vor der thermischen Behandlung, sowie nach der jeweiligen Hitzeeinwirkung aufgearbeitet und der Virustiter (in log KID₅₀) bestimmt.

Jeder Vireenträger wurde in ein vorbereitetes Reagenzglas mit einem Milliliter Fleischextrakt („beef“-Lösung (pH 8,5) gegeben und auf Eis ins Ultraschallbad verbracht, 5 Minuten beschallt (eluiert), anschließend bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten zentrifugiert, titriert und ausgewertet. Im Anschluss an die Beschallung im Ultraschallbad wurde zunächst eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur gewünschten Verdünnungsstufe angefertigt. Hierzu wurden 100 µl des Eluats in 900 µl des DMEM-Mediums pipettiert und anschließend weiter verdünnt. Von der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 µl in vier parallele Löcher (Wells) einer 96-Lochplatte, in die am Tag zuvor BEL-Zellen (bovine embryonale Lungenzellen) zur Herstellung eines einschichtigen (Monolayer) Zellrasens eingesät wurden, gegeben. Die Inkubation erfolgte bei +36 °C (+/-1 °C) und 5% CO₂-Spannung für zehn Tage.

Die Beurteilung der BEL-Zellen (bovine embryonale Lungenzellen) in den beimpften 96-Lochplatten erfolgte durch mikroskopische Beurteilung anhand eines cytopathischen Effekts (CPE) alle zwei Tage für insgesamt zehn Tage. Die Auswertung wurde nach der zehntägigen Inkubation durch die Berechnung des Virustiters als Kulturinfektiose Dosis 50 (KID₅₀/ml bzw. log KID₅₀/ml) nach Spearman und Kärber.

Formel: $\log_{10} \text{KID}_{50} = (X_0 - d/2 + d \sum r/n)$ in 100 µl bzw. KID₅₀/ml = 10

- X₀ = Dek. Logarithmus der höchsten Verdünnung in der noch in allen Löchern (Wells) ein CPE sichtbar ist.
- d = log₁₀ des Verdünnungsfaktors (hier log₁₀ 10 = 1)
- r = Anzahl der positiven Löcher pro Verdünnungsstufe
- n = Anzahl der Ansätze pro Verdünnungsstufe

Nachweis von *Bacillus globigii* (Sporen)

Der Nachweis von *Bacillus globigii* erfolgte nach dem Prinzip des KOCH'schen Oberflächenverfahrens. Dazu wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur gewünschten Verdünnungsstufe hergestellt. Hierzu wurden zunächst 20 g bzw. 20 ml des Probenmaterials in 180ml einer 0,9%igen physiologischen Kochsalzlösung gegeben und bei +4 °C für 4 Stunden geschüttelt. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe wurde eine dekadische Verdünnungsreihe angefertigt. Von den letzten drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen, unter denen die zu erwartende Konzentration zu vermuten war, wurden jeweils 100 µl auf zwei parallele Caso-Agarplatten (Fa. Oxoid) pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels gleichmäßig auf der Nährbodenoberfläche verteilt, und anschließend bei 36 °C (+/-1 °C) für 24 Stunden bebrütet und ausgezählt. Die auszählenden Kolonien wurden anhand ihres typischen morphologischen Erscheinungsbildes beurteilt und nur diese gezählt. Zum Auszählen wurden die Caso-Agarplatten ausgewählt auf denen die Koloniezahl der gesuchten Kolonien von *Bacillus globigii* zwischen 15 und 300 lag. Es wurden jeweils zwei parallele Platten pro Verdünnungsstufe ausgezählt, der arithmetische Mittelwert gebildet und auf ein Milliliter bzw. ein Gramm der Probe bezogen.

Nachweis von *Clostridium sporogenes* (Sporen)

Der Nachweis von *Clostridium sporogenes* erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip des KOCH'schen Oberflächenverfahrens. Zunächst wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis zu der angestrebten Verdünnungsstufe angefertigt. Von den letzten drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen, unter denen die zu erwartenden Konzentrationen zu vermuten waren, wurden jeweils 100 µl auf zwei parallele Columbia Blutagarplatten (Fa. Oxoid) pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Die beimpften Columbia Blutagarplatten wurden bei 36 °C (+/-1 °C) für 48 Stunden anaerob in einem Anaerobiertopf bebrütet und anschließend ausgezählt. Die auszählenden Kolonien

wurden anhand ihres typischen morphologischen Erscheinungsbildes und der von ihnen verursachten Hämolyse beurteilt und nur diese ausgezählt. Zum Auszählen wurden die Columbia-Blutagarplatten ausgewählt auf denen die Koloniezahl der gesuchten Kolonien von *Clostridium sporogenes* zwischen 15 und 300 lag. Es wurden jeweils zwei parallele Platten pro Verdünnungsstufe ausgezählt, der arithmetische Mittelwert gebildet und auf ein Milliliter bzw. ein Gramm der Probe bezogen.

4.1.3 Ergebnisse

4.1.3.1 Ergebnisse der Untersuchungen der unbehandelten Substrate

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der in den Versuchen verwendeten Ausgangsmaterialien Klärschlamm, Gülle und Gärrückstände für den Nachweis auf *Salmonella* ssp. (qualitativ und quantitativ) und *Escherichia coli* (quantitativ) dargestellt.

Tabelle 1: Konzentrationen (mpn) von *Escherichia coli* und *Salmonella* ssp. in den Ausgangsmaterialien Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten. n.n.: nicht nachweisbar

	Probe	E. coli (mpn)	Salmonella (qualitativ / Serovar)	Salmonella (MPN)
Klärschlamm	1	4,3x10 ⁴	n.n.	-
	2	9,3x10 ⁴	Pos. S. Albany / S. subsp. I, rauh	0,3
Gülle	1	9,3x10 ⁴	n.n.	-
	2	2,3x10 ⁵	n.n.	-
Gärrückstände	1	2,3x10 ¹	n.n.	-
	2	7,5x10 ¹	n.n.	-

In einer Klärschlammprobe waren Salmonellen nachweisbar. Dabei handelte es sich um zwei unterschiedliche *Salmonella*-Serovare, einerseits um *Salmonella* Albany und andererseits um *Salmonella* subspezies I (O2), serologisch rauh. In den Proben der Gülle und der Gärrückstände wurden keine Salmonellen nachgewiesen. Die Konzentrationen für *Escherichia coli* lagen im Klärschlamm bei 4,3x10⁴ bis 9,3x10⁴ KbE/ml, in der Gülle bei 9,3x10⁴ bis 2,3x10⁵ KbE/ml und in den Gärprodukten bei 2,3x10¹ bis 7,5x10¹ KbE/ml.

4.1.3.2 Erhitzungsversuche mit Vertretern der *Enterobacteriaceae*

Enteroaggregative hämorrhagische *Escherichia coli* (EAHEC)-Serovar O104:H4

Erhitzungsversuch bei 50 °C (+/-2 °C)

Die Konzentrationen für den Nachweis von EAHEC O104:H4 für die Erhitzungsversuche bei 50 °C (+/-2 °C) sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Tabelle zeigt die Einzelwerte des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs sowie deren geometrische Mittelwerte für die beimpften Substrate physiologische Kochsalzlösung (0,9%ig), Klärschlamm und Gülle zu Beginn des Versuchs, den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden sowie achtzehn Stunden, und in den bei 6 °C (+/-2 °C) gelagerten Kontrollproben. Die mittleren Konzentrationen in den beimpften Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 1,6x10⁸ KbE/ml und 2,3x10⁸ KbE/ml und nach Erhitzung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden im Bereich zwischen 3,8x10⁷ KbE/ml und 9,3x10⁷ KbE/ml und nach achtzehn Stunden bei 8,4x10² KbE/ml in Gülle, bei 1,5x10⁵ KbE/ml in Klärschlamm und 5,3x10⁴ KbE/ml in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%ig). In den Kontrollproben lagen die Konzentrationen nach dem Versuch bei 1,2x10⁸ bis 2,3x10⁸ KbE/ml.

Tabelle 2: Konzentrationen (KbE/ml) von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben, gelagert bei 6 °C (+/-2 °C). n.d.: nicht durchgeführt

EAHEC	Versuch	Start	+50 °C für 4 h	+50 °C für 18 h	Kontrolle +6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	1,6x10 ⁸	6,3x10 ⁷	3,0x10 ⁶	1,2x10 ⁸
	2	n.d.	2,3x10 ⁷	9,3x10 ²	n.d.
	Mittelwert		3,8x10 ⁷	5,3x10 ⁴	
Klärschlamm	1	2,3x10 ⁸	9,3x10 ⁷	9,3x10 ⁵	2,3x10 ⁸
	2	n.d.	9,3x10 ⁷	2,3x10 ⁴	n.d.
	Mittelwert		9,3x10 ⁷	1,5x10 ⁵	
Gülle	1	2,3x10 ⁸	9,3x10 ⁷	7,5x10 ³	2,3x10 ⁸
	2	n.d.	4,3x10 ⁷	9,3x10 ¹	n.d.
	Mittelwert		6,3x10 ⁷	8,4x10 ²	

Aus Tabelle 3 sind die Reduktionswerte R (log₁₀) für EAHEC O104:H4 in den beimpften Substraten nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie der Kontrollproben (6 °C), im Vergleich zur Ausgangsprobe ersichtlich. Die Tabelle 3 zeigt die Einzelwerte für die zwei Versuchsdurchgänge sowie die jeweiligen Mittelwerte. Die mittleren Reduktionswerte lagen nach vier Stunden Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) bei 0,3 bzw. 0,5 bzw. 0,6 log₁₀-Stufen und nach achtzehn Stunden bei 3,20 bzw. 3,4 bzw. 5,4 log₁₀-Stufen für Klärschlamm bzw. Kochsalzlösung bzw. Gülle. In den Kontrollproben bei 6 °C wurde nur für Gülle eine Reduktion um 1,0 log₁₀-Stufen nachgewiesen, in Kochsalzlösung und Klärschlamm blieben die Konzentrationen unverändert. (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reduktionswerte R (log₁₀) für EAHEC O104:H4 in den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C) im Vergleich zu den Ausgangsproben. n.d.: nicht durchgeführt

EHAEC	Versuch	50 °C* für 4 h	50 °C* für 18 h	Kontrolle 4 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	0,4	1,7	0,1
	2	0,8	5,2	n.d.
	Mittelwert	0,6	3,4	-
Klärschlamm	1	0,3	2,3	0
	2	0,3	4	n.d.
	Mittelwert	0,3	3,2	-
Gülle	1	0,3	4,4	1
	2	0,7	6,3	n.d.
	Mittelwert	0,5	5,4	-

Erhitzungsversuch bei 53 °C (+/-2 °C):

Die Ergebnisse für den Nachweis von EAHEC O104:H4 nach Erhitzung der Testproben auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden sind in Tabelle 4 zu sehen. Die Tabelle zeigt die Konzentrationen, dabei

die Einzelwerte des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs sowie deren geometrische Mittelwerte, für den Nachweis von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten (physiologische Kochsalzlösung (0,9%ig), Klärschlamm und Gülle) vor der Erhitzung, in den Testproben nach Erhitzung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden bzw. achtzehn Stunden, und in den bei 6 °C (+/-2 °C) gelagerten Kontrollproben. Die Konzentrationen (Mittelwerte) in den beimpften Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 1,7x10⁸ KbE/ml und 3,0x10⁸ KbE/ml und nach Erhitzung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden bei 9,3x10⁵ KbE/ml in Kochsalzlösung, 9,9x10⁶ KbE/ml in Klärschlamm und 1,5x10⁷ KbE/ml in Gülle. Nach achtzehn Stunden bei 53 °C (+/-2 °C) lagen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml in allen drei Substraten. Die Konzentrationen in den Kontrollproben bei 6 °C lagen bei 2,3x10⁸ bis 4,3x10⁸ KbE/ml (Tabelle 4).

Tabelle 4: Konzentrationen (KbE/ml) von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

EAHEC	Versuch	Start	53 °C für 4 h	53 °C für 18 h	Kontrolle 4 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	9,3x10 ⁷	9,3x10 ⁵	< 3,0	2,3x10 ⁸
	2	2,3x10 ⁸	9,3x10 ⁵	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,7x10 ⁸	9,3x10 ⁵	< 3,0	-
Klärschlamm	1	4,3x10 ⁸	2,3x10 ⁶	< 3,0	4,3x10 ⁸
	2	1,5x10 ⁸	4,3x10 ⁷	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	3,0x10 ⁸	9,9x10 ⁶	< 3,0	-
Gülle	1	2,3x10 ⁸	2,3x10 ⁷	< 3,0	4,3x10 ⁸
	2	4,3x10 ⁸	9,3x10 ⁶	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	2,5x10 ⁸	1,5x10 ⁷	< 3,0	-

Die Reduktionswerte R (log₁₀) für EAHEC O104:H4 in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (+6 °C), im Vergleich zur Ausgangsprobe sind aus Tabelle 5 ersichtlich. Die Tabelle 5 zeigt die Einzelwerte für die zwei Versuchsdurchgänge sowie die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte. Die mittleren Reduktionswerte lagen nach vier Stunden Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) bei 1,4 bzw. 2,2 bzw. 4,6 log₁₀-Stufen und nach achtzehn Stunden bei 8,4 bzw. 8,1 bzw. 8,5 log₁₀-Stufen für Klärschlamm bzw. Kochsalzlösung bzw. Gülle. In den Kontrollproben bei 6 °C blieben die Konzentrationen mehr oder weniger unverändert (Tabelle 5).

Erhitzungsversuch bei 60 °C (+/-2 °C):

Die Tabelle 6 veranschaulicht die Ergebnisse für den Nachweis von EAHEC O104:H4 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für ein, zwei bzw. vier Stunden und in den Kontrollproben. Dabei zeigt die Tabelle 6 die Konzentrationen, sowohl die Einzelwerte des ersten, zweiten und dritten Versuchsdurchgangs als auch deren geometrische Mittelwerte. Die Mittelwerte der Konzentrationen in den Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 3,7x10⁸ KbE/ml und 1,3x10⁹ KbE/ml. Nach Erhitzung bei 60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde befanden sich die Konzentrationen bei 6,0x10² KbE/ml in Gülle, 6,1x10³ KbE/ml in Kochsalzlösung und in Klärschlamm bei 9,7x10⁴ KbE/ml. Nach zwei Stunden bei 60 °C (+/-2 °C) lagen die Konzentrationen bei 4,8x10¹ KbE/ml in Kochsalzlösung, bei 9,6x10¹ KbE/ml in Klärschlamm und unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml in Gülle. Nach vier Stunden Erhitzung

lagen die Konzentrationen in allen Substraten unterhalb der Nachweisgrenze. Die Konzentrationen in den Kontrollproben bei 6 °C lagen bei $2,3 \times 10^8$ bis $4,3 \times 10^8$ KbE/ml (Tabelle 6).

Tabelle 5: Reduktionswerte R (\log_{10}) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

EAHEC	Versuch	+53 °C (+/-2 °C) für 4 h	53 °C (+/-2 °C) für 18 h	Kontrolle +6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	2,0	7,9	-0,4
	2	2,3	8,3	0
	Mittelwert	2,2	8,1	-0,2
Klärschlamm	1	2,2	8,6	0
	2	0,5	8,1	-0,5
	Mittelwert	1,4	8,4	-0,2
Gülle	1	1,0	8,3	-0,3
	2	1,6	8,6	0
	Mittelwert	1,3	8,5	-0,1

Tabelle 6: Konzentrationen (KbE/ml) von EAHEC O104:H4 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für 4 bzw. 18 Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt. n.d.: nicht durchgeführt

EAHEC	Versuch	Start	+60 °C für 1h	+60 °C für 2 h	+60 °C für 4 h	Kontrolle 4 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	$4,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^4$	n.d.	< 3,0	$2,1 \times 10^8$
	2	$9,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	< 3,0	n.d.
	3	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^2$	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	$1,2 \times 10^9$	$6,1 \times 10^3$	$4,8 \times 10^1$	< 3,0	-
Klärschlamm	1	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^5$	n.d.	< 3,0	$2,3 \times 10^8$
	2	$9,3 \times 10^7$	$9,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	< 3,0	n.d.
	3	$2,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^4$	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	$3,7 \times 10^8$	$9,7 \times 10^4$	$9,6 \times 10^1$	< 3,0	-
Gülle	1	$2,3 \times 10^9$	$2,3 \times 10^4$	n.d.	< 3,0	$2,3 \times 10^8$
	2	$9,3 \times 10^7$	< 3,0	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	$2,3 \times 10^8$	$9,3 \times 10^3$	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	$3,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^2$	< 3,0	< 3,0	-

In Tabelle 7 werden die Reduktionswerte R (\log_{10}), sowohl die Einzelwerte für die drei Versuchsdurchgänge als auch die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte für EAHEC O104:H4 nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) gezeigt. Die Reduktionswerte R (\log_{10}) in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde lagen bei 3,5 \log_{10} -Stufen für Klärschlamm, 5,2 \log_{10} -Stufen für Kochsalzlösung und 5,7 \log_{10} -Stufen für

Gülle. Die mittleren Reduktionswerte nach zwei Stunden Erhitzung sind 6,1 bzw. 7,1 bzw. 8,1 für Klärschlamm bzw. Kochsalzlösung bzw. Gülle und nach vier Stunden 8,5 log₁₀-Stufen für Klärschlamm und Gülle bzw. 9,0 log₁₀-Stufen für Kochsalzlösung. Für die Kontrollproben bei 6 °C sind Reduktionswerte von 1,0 bis 1,3 log₁₀-Stufe in allen Substraten ersichtlich. Die Tabelle verdeutlicht, dass bereits nach einer Stunde Erhitzung bei 60 °C (+/-2 °C) in Gülle und Kochsalzlösung eine Reduktion um mehr als fünf log₁₀-Stufen erreicht wird. Nach zwei Stunden wurde in allen Substraten eine Reduktion von mindestens sechs log₁₀-Stufen erreicht (Tabelle 7).

Erhitzungsversuch bei 70 °C (+/-2 °C)

In den Erhitzungsversuchen bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde lagen die Konzentrationen in allen drei Wiederholungen nach der Erhitzung unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml. Es wurden Reduktionswerte von 8,1 log₁₀-Stufen in Klärschlamm und Gülle und 8,2 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung erreicht (Abbildung 1).

Tabelle 7: Reduktionswerte R (log₁₀) für die Ausgangsproben, die Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für eine, zwei bzw. vier Stunden, sowie die Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

EHAEC	Versuch	60 °C für 1h	60 °C für 2 h	60 °C für 4 h	Kontrolle 4 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	5,3	n.d.	9,6	1,3
	2	4,6	5,6	9,0	n.d.
	3	6,0	8,6	8,6	n.d.
	Mittelwert	5,3	7,1	9,1	-
Klärschlamm	1	4,0	n.d.	9,4	1,0
	2	3,0	4,0	8,0	n.d.
	3	3,7	8,4	8,4	n.d.
	Mittelwert	3,6	6,2	8,6	-
Gülle	1	5,0	n.d.	9,4	1,0
	2	8,0	8,0	8,0	n.d.
	3	4,4	8,4	8,4	n.d.
	Mittelwert	5,8	8,2	8,6	-

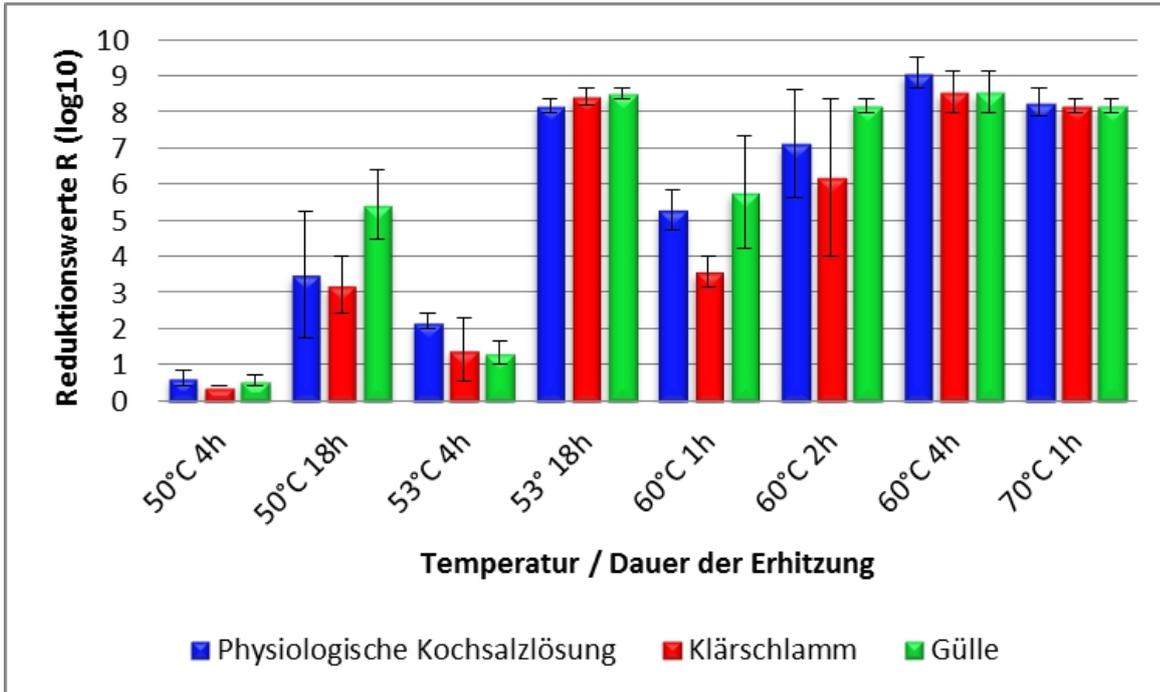


Abbildung 1: Mittlere Reduktionswerte R (log₁₀) für EAHEC O104:H4 in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen aus allen Versuchsdurchgängen.

Zusammenfassung

In Abbildung 1 sind die mittleren (arithmetischer Mittelwert) Reduktionswerte R (log₁₀) in Bezug auf die Ausgangskonzentrationen für EAHEC O104:H4 in den beimpften Substraten, physiologische Kochsalzlösung, Klärschlamm und Gülle, nach thermischer Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier und achtzehn Stunden, bei 53 °C (+/-2 °C) für vier und achtzehn Stunden, bei 60 °C (+/-2 °C) für ein, zwei und vier Stunden und bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde dargestellt. Bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden wurde nur eine geringe Reduktion von ca. 0,5 log₁₀-Stufen in den drei Substraten erreicht. Eine Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden ergab eine etwas höhere Reduktion von ca. 1,5 bis 2 log₁₀-Stufen. Für eine Behandlungsdauer von 18 Stunden wurde bei 50 °C (+/-2 °C) eine Reduktion von ca. 3 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung und Klärschlamm sowie von 5 log₁₀-Stufen in Gülle erreicht und bei 53 °C (+/-2 °C) eine höhere Reduktion um 8 log₁₀-Stufen in allen Substraten. Bei 60 °C (+/-2 °C) wurden durch eine einstündige Behandlung Reduktionen von 3 bis 6 log₁₀-Stufen und bei einer zweistündiger Behandlung Reduktionen von 6 bis 8 log₁₀-Stufen nachgewiesen. Nach einer Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für vier Stunden und auf 70 °C (+/-1 °C) für eine Stunde wurden Reduktionswerte von mehr als 8,0 log₁₀-Stufen in allen Substraten erreicht (Abbildung 1).

Escherichia coli DSM-Stamm 682:

Erhitzungsversuch bei 50 C ° (+/-2 °C):

Die Konzentrationen für den Nachweis von *Escherichia coli* DSM 682 für die Erhitzungsversuche bei 50 °C (+/-2 °C) sind in Tabelle 8, sowohl als Einzelwerte des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs als auch deren geometrische Mittelwerte, für die beimpften Ausgangssubstrate Klärschlamm, Gülle und physiologische Kochsalzlösung (0,9%ig) dargestellt. Die Konzentrationen (Mittelwerte) in den beimpften Ausgangssubstraten liegen im Bereich zwischen 1,6x10⁸ KbE/ml und 2,3x10⁸ KbE/ml. Nach Erhitzung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden sind Konzentrationen von 2,8x10⁶ KbE/ml in Kochsalzlösung, 6,3x10⁷ KbE/ml in Gülle und

1,5x10⁸ KbE/ml in Klärschlamm ersichtlich. Nach achtzehn Stunden Erhitzung lagen die Konzentrationen bei 5,3x10⁴ KbE/ml in Kochsalzlösung (0,9%ig), bei 2,9x10¹ KbE/ml in Klärschlamm und 3,1x10² KbE/ml in Gülle. Konzentrationen von 1,5x10⁸ KbE/ml in Klärschlamm, 4,3x10⁷ KbE/ml in Gülle sowie von 1,2x10⁸ KbE/ml sind in den Kontrollproben bei 6 °C nach dem Versuch festzustellen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Konzentrationen (KbE/ml) von *Escherichia coli* DSM 682 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

E. coli	Versuch	Start	50 °C für 4 h	50 °C für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	1,6x10 ⁸	8,5x10 ⁶	3,0x10 ⁶	1,2x10 ⁸
	2	n.d.	9,3x10 ⁵	9,3x10 ²	n.d.
	Mittelwert	1,6x10 ⁸	2,8x10 ⁶	5,3x10 ⁴	-
Klärschlamm	1	2,3x10 ⁸	9,3x10 ⁷	9,3x10 ¹	1,5x10 ⁸
	2	n.d.	2,3x10 ⁸	9,2	n.d.
	Mittelwert	2,3x10 ⁸	1,5x10 ⁸	2,9x10 ¹	-
Gülle	1	2,3x10 ⁸	4,3x10 ⁷	2,3x10 ³	4,3x10 ⁷
	2	n.d.	9,3x10 ⁷	4,3x10 ¹	n.d.
	Mittelwert	2,3x10 ⁸	6,3x10 ⁷	3,1x10 ²	-

Die Reduktionswerte R (log₁₀), sowohl die Einzelwerte der zwei Versuchsdurchgänge als auch die jeweiligen Mittelwerte, sind in Tabelle 9 für *Escherichia coli* DSM 682 dargestellt. Die Mittelwerte für die beimpften Substrate nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden lagen bei 0,2 bzw. 0,5 log₁₀-Stufen in Klärschlamm bzw. Gülle und bei 1,7 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung. Nach der Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) über achtzehn Stunden sind Konzentrationen von 6,3 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung, 6,9 log₁₀-Stufen in Klärschlamm und 5,8 log₁₀-Stufen in Gülle feststellbar. In den Kontrollproben bei 6 °C liegen Reduktionswerte von 0,1 bis 0,7 log₁₀-Stufen vor (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Escherichia coli* DSM 682 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

E. coli	Versuch	50 °C* für 4 h	50 °C* für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	1,2	4,5	0,5
	2	2,2	8,2	n.d.
	Mittelwert	1,7	6,3	-
Klärschlamm	1	0,3	6,3	0,1
	2	0	7,4	n.d.
	Mittelwert	0,2	6,9	-
Gülle	1	0,7	5,0	0,7
	2	0,3	6,7	n.d.
	Mittelwert	0,5	5,8	-

Erhitzungsversuch bei 53 °C (+/-2 °C):

Die Ergebnisse, sowohl die Einzelwerte des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs als auch deren Mittelwerte, für den Nachweis von *Escherichia coli* DSM 682 nach Erhitzung der Testproben auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Konzentrationen (Mittelwerte) in den beimpften Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 1,6x10⁸ KbE/ml und 5,2x10⁸ KbE/ml in den drei Substraten. Nach der Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden lagen die Konzentrationen bei 4,8x10¹ KbE/ml in Klärschlamm, 4,8 KbE/ml in Gülle und 9,9x10² KbE/ml in Kochsalzlösung. Aus der Tabelle 10 ist ersichtlich, dass die Konzentrationen nach achtzehn Stunden bei 53 °C (+/-2 °C) unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml in allen drei Substraten lagen. Die Konzentrationen in den Kontrollproben liegen im Bereich zwischen 9,3x10⁷ und 1,5x10⁸ KbE/ml (Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentrationen (KbE/ml) von *Escherichia coli* DSM 682 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

E. coli	Versuch	Start	53 °C für 4 h	53 °C für 18 h	Kontrolle 4 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	4,3x10 ⁸	4,3x10 ³	< 3,0	9,3x10 ⁷
	2	7,5x10 ⁸	2,3x10 ²	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	5,2x10 ⁸	9,9x10 ²	< 3,0	-
Klärschlamm	1	4,3x10 ⁸	2,3x10 ³	< 3,0	1,5x10 ⁸
	2	4,3x10 ⁷	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,6x10 ⁸	4,8x10 ¹	< 3,0	-
Gülle	1	9,3x10 ⁷	2,3x10 ¹	< 3,0	9,3x10 ⁷
	2	9,3x10 ⁸	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	2,4x10 ⁸	4,8	< 3,0	-

Die Reduktionswerte R (log₁₀) für *Escherichia coli* DSM 682 in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (4 °C), im Vergleich zur Ausgangsprobe sind aus Tabelle 11 ersichtlich. Die Tabelle zeigt die Einzelwerte für die zwei Versuchsdurchgänge sowie die jeweiligen Mittelwerte. Die mittleren Reduktionswerte lagen nach vier Stunden Erhitzung bei 6,5 bzw. 5,7 bzw. 7,7 log₁₀-Stufen und nach achtzehn Stunden bei 8,2 bzw. 8,7 bzw. 8,3 log₁₀-Stufen für Klärschlamm bzw. Kochsalzlösung bzw. Gülle. In den Kontrollproben sind Reduktionswerte im Bereich zwischen 0 bis 0,66 log₁₀-Stufe für die drei getesteten Substrate zu sehen (Tabelle 11).

Erhitzungsversuch bei 60 °C (+/-2 °C):

Die Tabelle 12 veranschaulicht die Ergebnisse, die Einzelwerte des ersten, zweiten und dritten Versuchsdurchgangs sowie deren Mittelwerte, für den Nachweis von *Escherichia coli* DSM 682 in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-1 °C) für ein, zwei bzw. vier Stunden. Die geometrischen Mittelwerte der Konzentrationen in den Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 9,3x10⁷ KbE/ml und 1,1x10⁸ KbE/ml. Die Tabelle zeigt für die Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde Konzentrationen von 1,7x10¹ KbE/ml in Klärschlamm, 8,4x10¹ KbE/ml in Kochsalzlösung und in Gülle von 3,2 KbE/ml. Nach zwei bzw. vier Stunden Erhitzung lagen die Konzentrationen in allen Substraten unterhalb der Nachweisgrenze. Die Konzentrationen in den Kontrollproben bei 6 °C lagen bei 9,3x10⁷ bis 2,3x10⁸ KbE/ml (Tabelle 12).

Tabelle 11: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Escherichia coli* DSM 682 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

E. coli	Versuch	53 °C (+/-1 °C) für 4 h	53 °C (+/-1 °C) für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	5,0	8,6	0,7
	2	6,5	9,0	n.d.
	Mittelwert	5,7	8,7	-
Klärschlamm	1	5,3	8,6	0,5
	2	7,6	7,6	n.d.
	Mittelwert	6,5	8,2	-
Gülle	1	6,6	8,0	0
	2	9,0	9,0	n.d.
	Mittelwert	7,7	8,4	-

Tabelle 12: Konzentrationen (KbE/ml) von *Escherichia coli* DSM 682 in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

E. coli	Versuch	Start	60 °C für 1h	60 °C für 2 h	60 °C für 4 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	1,2x10 ⁸	2,3x10 ²	n.d.	< 3,0	9,3x10 ⁷
	2	7,2x10 ⁷	1,4x10 ³	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	1,5x10 ⁸	< 3,0	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,1x10 ⁸	8,4x10 ¹	< 3,0	< 3,0	-
Klärschlamm	1	9,3x10 ⁷	3,6	n.d.	< 3,0	2,3x10 ⁸
	2	3,8x10 ⁷	4,3x10 ²	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	1,5x10 ⁸	3,6	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	9,3x10 ⁷	1,7x10 ¹	< 3,0	< 3,0	-
Gülle	1	1,5x10 ⁸	3,6	n.d.	< 3,0	2,1x10 ⁸
	2	4,3x10 ⁷	9,2	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	2,3x10 ⁸	< 3,0	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,1x10 ⁸	3,2	< 3,0	< 3,0	-

Tabelle 13: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Escherichia coli* DSM 682 in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

E. coli	Versuch	60 °C für 1h	60 °C für 4 h	60 °C für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	5,4	n.d.	8,0	0,1
	2	4,7	7,8	7,8	n.d.
	3	8,1	8,1	8,1	n.d.
	Mittelwert	6,1	8,0	8,0	-
Klärschlamm	1	7,4	n.d.	7,9	-0,4
	2	4,9	7,5	7,5	n.d.
	3	7,8	8,3	8,3	n.d.
	Mittelwert	6,7	7,9	7,9	-
Gülle	1	7,6	n.d.	8,1	-0,2
	2	6,6	7,6	7,6	n.d.
	3	8,3	8,3	8,3	n.d.
	Mittelwert	7,5	8,1	8,1	-

Erhitzungsversuch bei 70 °C (+/-2 °C):

In den Erhitzungsversuchen bei 70 °C (+/-2 °C) wurden die Testproben der Temperatur eine Stunde ausgesetzt. In allen drei Wiederholungen waren die Konzentrationen nach der Erhitzung unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml. Aus Abbildung 2 geht hervor, dass Reduktionswerte von 8,0 log₁₀-Stufen in Klärschlamm, 8,4 log₁₀-Stufen in Gülle und 7,9 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung erreicht werden.

Zusammenfassung

In Abbildung 2 sind die mittleren Reduktionswerte R (log₁₀) für *Escherichia coli* DSM 682 in Bezug auf die Ausgangskonzentrationen der beimpften Substrate (physiologische Kochsalzlösung, Klärschlamm und Gülle) nach thermischer Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) bzw. 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, bei 60 °C (+/-2 °C) für ein, zwei und vier Stunden und bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde dargestellt (Abbildung 2).

Escherichia coli DSM 682 erwies sich als weniger hitzeresistent als EAHEC O104:H4. Nach vier Stunden Behandlungsdauer bei 50 °C (+/-2 °C) wurde nur eine geringe Reduktion von 50 erreicht. Bereits bei 50 °C (+/-2 °C) für 18 Stunden und 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden wurden relativ hohe Reduktionen von ca. 6 bis 8 log₁₀-Stufen nachgewiesen. Bei achtzehnstündiger Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) lag eine Reduktion um mehr als 8 log₁₀-Stufen in allen Substraten vor. Bei der Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) führte eine einständige Behandlung zu Reduktionen von ca. 6 bis 7,5 log₁₀-Stufen; bei zweistündiger oder vierstündiger Behandlung zu Reduktionen von ca. 8 log₁₀-Stufen in allen Substraten. Auch nach Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde wurden Reduktionen von ca. 8 log₁₀-Stufen in allen Substraten erreicht (Abbildung 2).

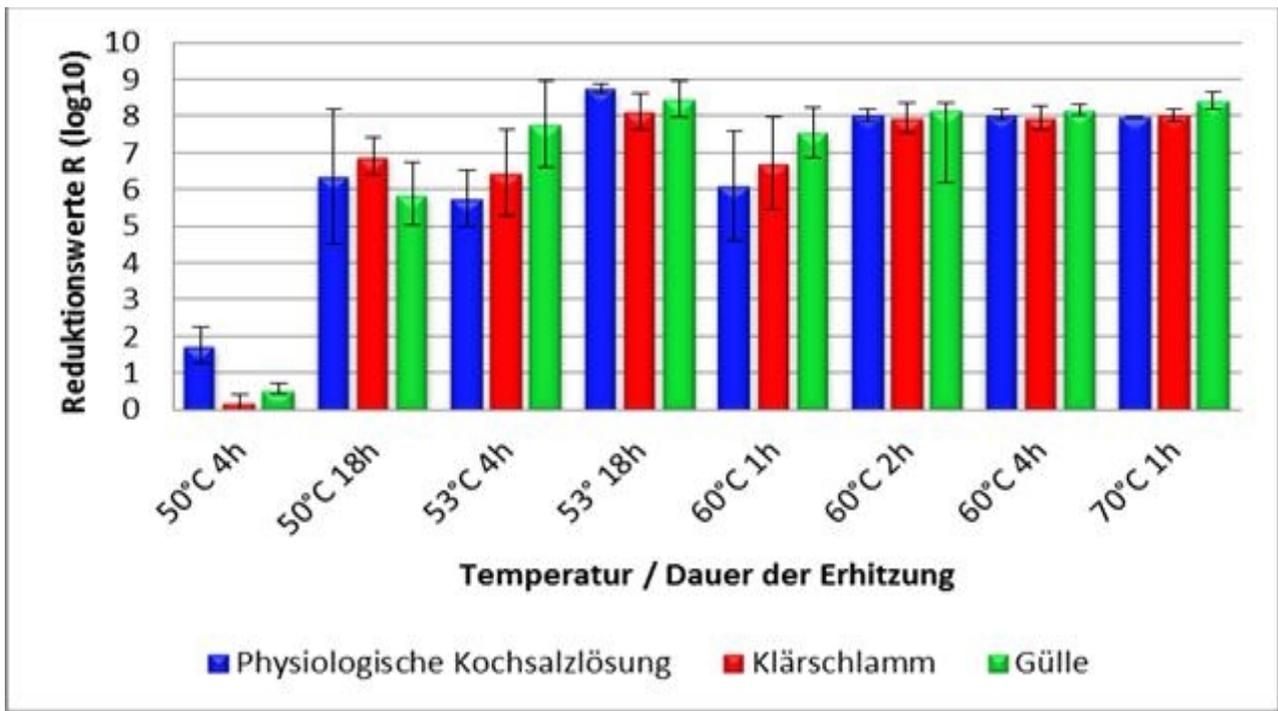


Abbildung 2: Mittlere Reduktionswerte R (log₁₀) für *Escherichia coli* DSM 682 in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen aus allen Versuchsdurchgängen

Monophasische Variante (04:[5],12:i-) der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120

Erhitzungsversuch bei 50 °C (+/-2 °C):

Die Konzentrationen für den Nachweis von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) für die Erhitzungsversuche bei 50 °C (+/-2 °C) sind in Tabelle 14 als Einzelwerte des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs sowie deren Mittelwerte dargestellt. Die mittleren Konzentrationen in den beimpften Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen $1,7 \times 10^8$ KbE/ml und $4,3 \times 10^8$ KbE/ml. Nach Erhitzung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden zeigt die Tabelle Konzentrationen im Bereich zwischen $2,2 \times 10^7$ KbE/ml und $4,3 \times 10^7$ KbE/ml und nach achtzehn Stunden von $9,3 \times 10^2$ KbE/ml in Gülle, von $9,4 \times 10^3$ KbE/ml in Klärschlamm und $1,5 \times 10^5$ KbE/ml in Kochsalzlösung (0,9%ig). Konzentrationen von $2,3 \times 10^7$ KbE/ml in Klärschlamm, $9,3 \times 10^7$ KbE/ml in Gülle sowie von $7,4 \times 10^8$ KbE/ml waren in den Kontrollproben nach dem Versuch festzustellen (Tabelle 14).

Die Reduktionswerte R (log₁₀), sowohl die Einzelwerte der zwei Versuchsdurchgänge als auch die jeweiligen Mittelwerte, sind in Tabelle 15 für *S. Typhimurium* DT120 (monoph.) dargestellt. Die Mittelwerte für die beimpften Substrate nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden lagen bei 0,8 bis 0,9 log₁₀-Stufen und nach Behandlung für achtzehn Stunden bei 3,0 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung, 4,6 log₁₀-Stufen in Klärschlamm und 5,6 log₁₀-Stufen in Gülle. Demgegenüber zeigten die Kontrollproben Reduktionswerte von -0,6 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung, 1,2 log₁₀-Stufen für Klärschlamm und 0,6 log₁₀-Stufen für Gülle (Tabelle 15).

Tabelle 14: Konzentrationen (KbE/ml) von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 50 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

S. Typhim. DT 120	Versuch	Start	50 °C für 4 h	50 °C für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	1,7x10 ⁸	6,2x10 ⁷	5,0x10 ⁵	7,4x10 ⁸
	2	n.d.	7,5x10 ⁶	4,3x10 ⁴	n.d.
	Mittelwert	1,7x10 ⁸	2,2x10 ⁷	1,5x10 ⁵	-
Klärschlamm	1	4,3x10 ⁸	9,3x10 ⁷	3,8x10 ⁵	2,3x10 ⁷
	2	n.d.	4,3x10 ⁷	2,3x10 ²	n.d.
	Mittelwert	4,3x10 ⁸	4,6x10 ⁷	9,4x10 ³	-
Gülle	1	4,3x10 ⁸	9,3x10 ⁷	9,3x10 ⁴	9,3x10 ⁷
	2	n.d.	2,3x10 ⁷	9,2	n.d.
	Mittelwert	4,3x10 ⁸	4,6x10 ⁷	9,3x10 ²	-

Tabelle 15: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) für 4 bzw. 18 Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

S. Typhim. DT120	Versuch	50 °C* für 4 h	50 °C* für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	0,4	2,5	-0,6
	2	1,4	3,6	n.d.
	Mittelwert	0,9	3,0	-
Klärschlamm	1	0,7	3,0	1,3
	2	1,0	6,3	n.d.
	Mittelwert	0,8	4,7	-
Gülle	1	0,7	3,7	0,7
	2	1,3	7,7	n.d.
	Mittelwert	1,0	5,7	-

Erhitzungsversuch bei 53 °C

Die Ergebnisse der Konzentrationen für den Nachweis von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) nach Erhitzung der Testproben auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden sind in Tabelle 16 in Form der Einzelwerte des ersten und zweiten Versuchsdurchgangs sowie als deren Mittelwerte dargestellt. Die Konzentrationen (Mittelwerte) in den beimpften Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 9,3x10⁷ KbE/ml und 1,7x10⁸ KbE/ml für die drei Substrate. Aus der Tabelle werden Konzentrationen zwischen 2,0x10³ KbE/ml und 4,3x10³ KbE/ml für die Testproben nach Erhitzung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier

Stunden ersichtlich. Nach achtzehnstündiger Erhitzung lagen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml in allen drei Substraten. Die Konzentrationen in den Kontrollproben bei 6 °C lagen im Bereich zwischen 2,3x10⁷ und 4,3x10⁸ KbE/ml (Tabelle 16).

Die Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C), im Vergleich zur Ausgangsprobe sind in Tabelle 17 als Einzelwerte sowie deren Mittelwerte dargestellt. Die mittleren Reduktionswerte lagen nach vier Stunden Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) zwischen 4,6 und 4,8 log₁₀-Stufen und nach achtzehn Stunden bei 7,9 und 8,2 log₁₀-Stufen in allen drei Substraten. In den Kontrollproben bei 6 °C blieben die Konzentrationen mehr oder weniger konstant (Tabelle 17).

Tabelle 16: Konzentrationen (KbE/ml) von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 53 °C (+/-2 °C) für 4 bzw. 18 Stunden, sowie in den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

S. Typhim. DT120	Versuch	Start	53 °C für 4 h	53 °C für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	2,3x10 ⁸	9,3x10 ¹	< 3,0	2,3x10 ⁸
	2	9,3x10 ⁷	4,3x10 ⁴	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,7x10 ⁸	2,0x10 ³	< 3,0	-
Klärschlamm	1	1,5x10 ⁸	4,3x10 ³	< 3,0	4,3x10 ⁸
	2	2,3x10 ⁸	4,3x10 ³	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,9x10 ⁸	4,4x10 ³	< 3,0	-
Gülle	1	9,3x10 ⁷	4,3x10 ⁴	< 3,0	9,3x10 ⁷
	2	9,3x10 ⁷	9,3x10 ¹	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	9,3x10 ⁷	2,3x10 ³	< 3,0	-

Tabelle 17: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 53 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

S. Typhim. DT120	Versuch	53 °C (+/-1 °C) für 4 h	53 °C (+/-1 °C) für 18 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	6,4	8,4	0
	2	3,3	8,0	n.d.
	Mittelwert	4,9	8,2	-
Klärschlamm	1	4,5	8,2	-0,5
	2	4,7	8,4	n.d.
	Mittelwert	4,6	8,3	-
Gülle	1	3,3	8,0	0
	2	6,0	8,0	n.d.
	Mittelwert	4,7	8,0	-

Erhitzungsversuch bei 60 °C (+/-2 °C):

Die Konzentrationen, sowohl die Einzelwerte des ersten, zweiten und dritten Versuchsdurchgangs als auch deren Mittelwerte, für den Nachweis von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den Erhitzungsversuchen bei 60 °C (+/-2 °C) sind in Tabelle 18 dargestellt. Dabei zeigt die Tabelle 18 die Konzentrationen in den Ausgangssubstraten vor der Erhitzung, in den Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, zwei Stunden bzw. vier Stunden, und in den Kontrollproben (6 °C). Die Mittelwerte der Konzentrationen in den Ausgangssubstraten lagen im Bereich zwischen 1,5x10⁸ KbE/ml und 2,1x10⁸ KbE/ml. Nach Erhitzung bei +60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde befanden sich die Konzentrationen bei 2,0x10³ KbE/ml in Kochsalzlösung, 1,3x10² KbE/ml in Klärschlamm und bei 2,2x10¹ KbE/ml in Gülle. Nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für zwei bzw. vier Stunden lagen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml in allen drei Substraten. Die Konzentrationen in den Kontrollproben lagen bei 2,3x10⁷ bis 4,3x10⁷ KbE/ml (Tabelle 18).

Tabelle 18: Konzentrationen (KbE/ml) von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie in den Kontrollproben (+6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

S. Typhim.	Versuch	Start	60 °C für 1h	60 °C für 2 h	60 °C für 4 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalz- lösung (0,9%)	1	4,3x10 ⁷	9,3x10 ³	< 3,0	< 3,0	4,3x10 ⁷
	2	9,3x10 ⁸	4,3x10 ³	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	2,3x10 ⁸	2,3x10 ²	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	2,1x10 ⁸	2,0x10 ³	< 3,0	< 3,0	-
Klär- schlamm	1	9,3x10 ⁷	4,3x10 ²	< 3,0	< 3,0	2,3x10 ⁷
	2	1,5x10 ⁸	2,3x10 ³	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	2,3x10 ⁸	< 3,0	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,5x10 ⁸	1,3x10 ²	< 3,0	< 3,0	-
Gülle	1	1,5x10 ⁸	2,3x10 ²	< 3,0	< 3,0	4,3x10 ⁷
	2	9,3x10 ⁷	2,3x10 ¹	< 3,0	< 3,0	n.d.
	3	4,3x10 ⁸	< 3,0	< 3,0	< 3,0	n.d.
	Mittelwert	1,8x10 ⁸	2,2x10 ¹	< 3,0	< 3,0	-

In Tabelle 19 sind die Reduktionswerte R (log₁₀), sowohl die Einzelwerte für die drei Versuchsdurchgänge als auch die jeweiligen Mittelwerte, für *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) gezeigt. Die Reduktionswerte R (log₁₀) in den Testproben nach Erhitzung auf 60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde lagen bei 5,0 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung, 6,1 log₁₀-Stufen für Klärschlamm und 7,0 log₁₀-Stufen für Gülle. Die mittleren Reduktionswerte nach zweistündiger Erhitzung lagen bei 8,2 bzw. 8,6 bzw. 8,3 log₁₀-Stufen für Klärschlamm bzw. Kochsalzlösung bzw. Gülle und nach vier Stunden 8,3 log₁₀-Stufen für Kochsalzlösung, 8,1 log₁₀-Stufen für Klärschlamm und 8,2 log₁₀-Stufen für Gülle. Für die Kontrollproben wurden Reduktionswerte zwischen 0 und 0,6 log₁₀-Stufen für die Substrate festgestellt. Die Tabelle 19 zeigt, dass bereits nach eine Stunde bei 60 °C (+/-2 °C) in allen Substraten eine Reduktion um 5 log₁₀-Stufen oder mehr erreicht wird. Nach zwei bzw. vier Stunden ist in allen Substraten eine Reduktion von mindestens 8 log₁₀-Stufen erreicht (Tabelle 19).

Erhitzungsversuch bei 70 °C

Aus Abbildung 3 geht hervor, dass in den Erhitzungsversuchen bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde in allen drei Wiederholungen die Konzentrationen für den Nachweis von *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) nach der Erhitzung unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KBE/ml lagen und Reduktionswerte von 8,1 log₁₀-Stufen in Klärschlamm und Gülle und 8,2 log₁₀-Stufen in Kochsalzlösung erreicht wurden.

Zusammenfassung

Die mittleren Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in Bezug auf die Ausgangskonzentrationen für die beimpften Substrate nach thermischer Behandlung bei 50 °C (+/-2 °C) bzw. 53 °C (+/-2 °C) für vier und achtzehn Stunden, bei 60 °C (+/-2 °C) für ein, zwei und vier Stunden und bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Bei 50 °C (+/-2 °C) für vier Stunden wurde nur eine geringe Reduktion von ca. 1 log₁₀-Stufe erreicht. Bei 50 °C (+/-2 °C) für 18 Stunden und 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden wurden vergleichbare Reduktionen von ca. 3 bis 5 log₁₀-Stufen nachgewiesen. Die Reduktionen bei +60 °C (+/-2 °C) für eine Stunde betragen 5 bis 8 log₁₀-Stufen. Bei allen anderen Behandlungen (53 °C für 18 h, 60 °C für 2 und 4 h, 70 °C für 1 h) Reduktionen von ca. 8 log₁₀-Stufen in allen Substraten erreicht (Abbildung 3).

Tabelle 19: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhim. DT120 (monoph.) in den Ausgangsproben, den Testproben nach Behandlung bei 60 °C (+/-2 °C) für vier bzw. achtzehn Stunden, sowie den Kontrollproben (6 °C). n.d.: nicht durchgeführt

S. Typhim. DT120	Versuch	60 °C für 1h	60 °C für 2 h	60 °C für 4 h	Kontrolle 6 °C
Kochsalzlösung (0,9%)	1	3,7	n.d.	7,6	0
	2	5,3	9,0	9,0	n.d.
	3	6,0	8,4	8,4	n.d.
	Mittelwert	5,0	8,7	8,3	-
Klärschlamm	1	5,3	n.d.	8,0	0,6
	2	4,8	8,2	8,2	n.d.
	3	8,4	8,4	8,4	n.d.
	Mittelwert	6,2	8,3	8,2	-
Gülle	1	5,8	n.d.	8,2	0,5
	2	6,6	8,0	8,0	n.d.
	3	8,6	8,6	8,6	n.d.
	Mittelwert	7,0	8,3	8,3	-

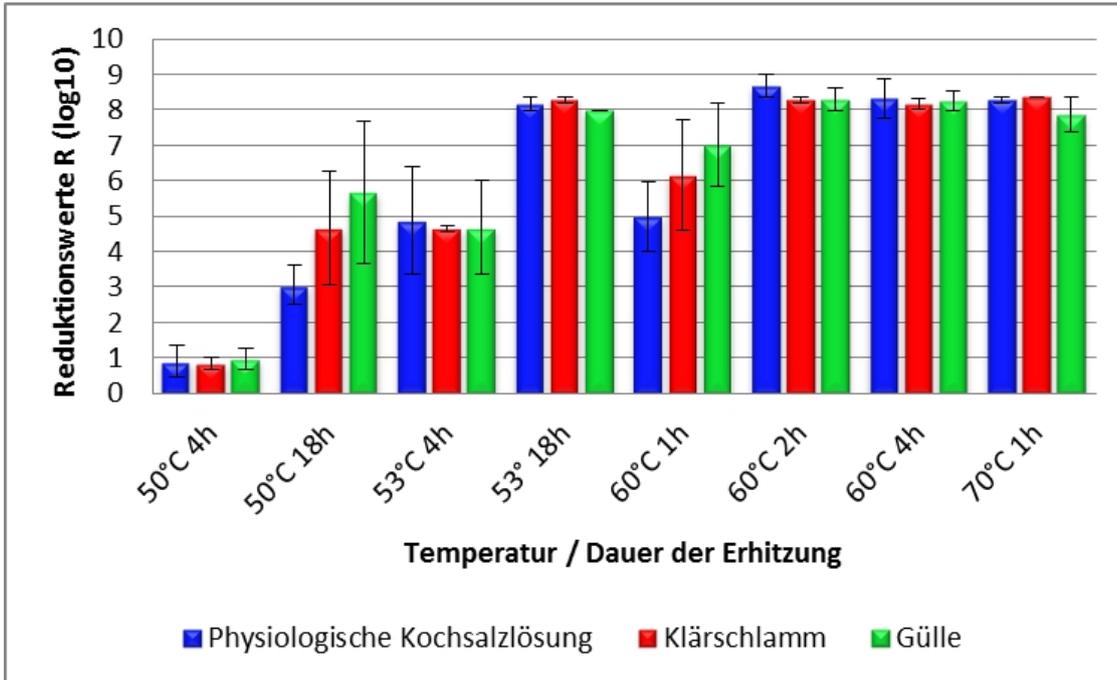


Abbildung 3: Mittlere Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120 (monophasische) in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen aus allen Versuchsdurchgängen.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Erhitzungsversuche mit den Vertretern der *Enterobacteriaceae*:

Die Tabelle 20 zeigt zusammenfassend die mittleren Reduktionswerte (log₁₀) für die untersuchten Erreger EAHEC O104:H4, *Escherichia coli* DSM 682 und die monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium in Klärschlamm, Gülle und physiologischer Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeit-Kombinationen. Die stärkste Reduktion wurde für *Escherichia coli* DSM 682 erhalten, gefolgt von *Salmonella* Serovar Typhimurium. Der Erreger EAHEC O104:H4 zeigte die geringste Reduktion.

Tabelle 20: Übersicht: Mittlere Reduktionswerte (log₁₀) für EAHEC, *Escherichia coli* DSM 682 und die monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120 in Klärschlamm, Gülle und Kochsalzlösung nach Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen.

		Klärschlamm			Gülle			Kochsalzlösung		
		EAHEC	E. coli	Salm.	EAHEC	E. coli	Salm.	EAHEC	E. coli	Salm.
50 °C	4h	0,3	0,2	0,8	0,5	0,5	0,9	0,6	1,7	0,9
	18h	3,2	6,9	4,6	5,4	5,8	5,6	3,4	6,3	3,0
53 °C	4h	1,4	6,5	4,6	1,3	7,7	4,6	2,2	5,7	4,8
	18h	8,4	8,2	8,2	8,5	8,3	7,9	8,1	8,7	8,1
60 °C	1h	3,5	6,7	6,1	5,7	7,5	7,0	5,2	6,1	5,6
	2h	6,1	7,9	8,2	8,1	8,1	8,3	7,1	8,0	8,6
	4h	8,5	7,9	8,1	8,5	8,1	8,2	9,0	8,0	8,3
70 °C	1h	8,1	8,0	8,1	8,1	8,4	8,1	8,2	7,9	8,2

4.1.3.3 Erhitzungsversuche mit thermoresistenten Parvoviren (Bovines Parvovirus, BPV)

Die Konzentrationen (Titer KID₅₀/ml) sowie die Reduktionswerte (log₁₀) für das bovine Parvovirus (BPV) in den Kontrollproben (6 °C) und nach der Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) in Klärschlamm und Gülle für die erste und zweite Wiederholung des Versuchs sind in Tabelle 21 dargestellt. Die Mittelwerte der Virustiter lagen in den Kontrollen bei 6,2 bzw. 6,5 log KID₅₀/ml und nach Erhitzung für eine Stunde bei 70 °C (+/-2 °C) im Klärschlamm bei 4,0 bzw. 5,1 log KID₅₀/ml und in Gülle bei 3,4 bzw. 5,0 log KID₅₀/ml. Die Reduktionswerte betragen 2,2 bzw. 1,3 log₁₀-Stufen in Klärschlamm und 2,8 bzw. 1,4 log₁₀-Stufen in der Gülle (Tabelle 21).

Die Ergebnisse für den Erhitzungsversuch bei 80 °C (+/-2 °C) für den Nachweis (Titer log KID₅₀/ml) sowie die Reduktionswerte (log₁₀) für das bovine Parvovirus (BPV) in den Kontrollproben (6 °C) und nach der Erhitzung in Klärschlamm und Gülle für die zwei Versuchswiederholungen sowie die Mittelwerte sind in Tabelle 22 dargestellt. Die Mittelwerte der Virustiter lagen in den Kontrollen bei 6,1 bzw. 6,5 log KID₅₀/ml und nach Erhitzung für eine Stunde bei 80 °C (+/-2 °C) im Klärschlamm bei 3,7 bzw. 4,1 log KID₅₀/ml und in Gülle bei 2,5 bzw. 3,3 log KID₅₀/ml. Die Reduktionswerte betragen 2,4 bzw. 2,3 log₁₀-Stufen im Klärschlamm und 3,6 bzw. 3,1 log₁₀-Stufen in der Gülle (Tabelle 22).

Tabelle 21: Konzentrationen (log Titer KID₅₀/ml) sowie Reduktionswerte R (log₁₀) für das bovine Parvovirus (BPV) in den Kontroll- (6 °C) und den Testproben in Klärschlamm und Gülle bei 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde.

BPV	Versuch	Kontrollen 4 °C		Klärschlamm 70 °C 1h		Gülle 70 °C 1 h	
		1.Wdh.	2.Wdh.	1.Wdh.	2.Wdh.	1.Wdh.	2.Wdh.
Virustiter	1	6,0	6,5	4,0	5,25	3,5	5,5
	2	6,5	6,5	4,0	5,25	3,75	4,75
	3	/	6,5	4,0	5,0	3,0	5,0
	Mittelwert	6,25	6,5	4,0	5,2	3,4	5,1
Reduktion (log ₁₀)		/	/	2,2	1,3	2,8	1,4

Tabelle 22: Konzentrationen (log Titer KID₅₀/ml) sowie Reduktionswerte R (log₁₀) für das bovine Parvovirus (BPV) in den Kontroll- (6 °C) und den Testproben in Klärschlamm und Gülle bei 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde.

BPV	Versuch	Kontrollen 4 °C		Klärschlamm 80 °C 1h		Gülle 80 °C 1 h	
		1.Wdh.	2.Wdh.	1.Wdh.	2.Wdh.	1.Wdh.	2.Wdh.
Virustiter	1	5,7	6,5	4,2	4,7	2,5	4,2
	2	5,7	6,5	3,7	4,0	2,7	2,2
	3	6,2	6,5	3,2	3,7	2,5	3,5
	4	7,0	/	/	/	/	/
	Mittelwert	6,1	6,5	3,7	4,1	2,5	3,3
Reduktion (log ₁₀)		/	/	2,4	2,3	3,6	3,1

Zusammenfassung der Erhitzungsversuche mit bovinem Parvovirus (BPV):

Die Ergebnisse der Erhitzungsversuche mit bovinem Parvovirus (BPV) in Klärschlamm und Gülle sind zusammenfassend für die Erhitzung bei 70 °C (+/-2 °C) und 80 °C (+/-2 °C) für jeweils eine Stunde als Virustiter und Reduktionswerte (dargestellt als Negativwert von log₁₀) in Abbildung 4 dargestellt. Die Reduktionswerte für BPV lagen im Klärschlamm nach Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde bei ca. 1,8 log₁₀-Stufen und bei 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde bei ca. 2,4 log₁₀-Stufen. In der Gülle zeigten sich Reduktionswerte von 2,1 log₁₀-Stufen bei 70 °C und 3,4 log₁₀-Stufen bei 80 °C nach einer Stunde Erhitzung (Abbildung 4). Damit war das bovine Parvovirus wie erwartet sehr viel hitzeresistenter als die getesteten *Enterobacteriaceen*.

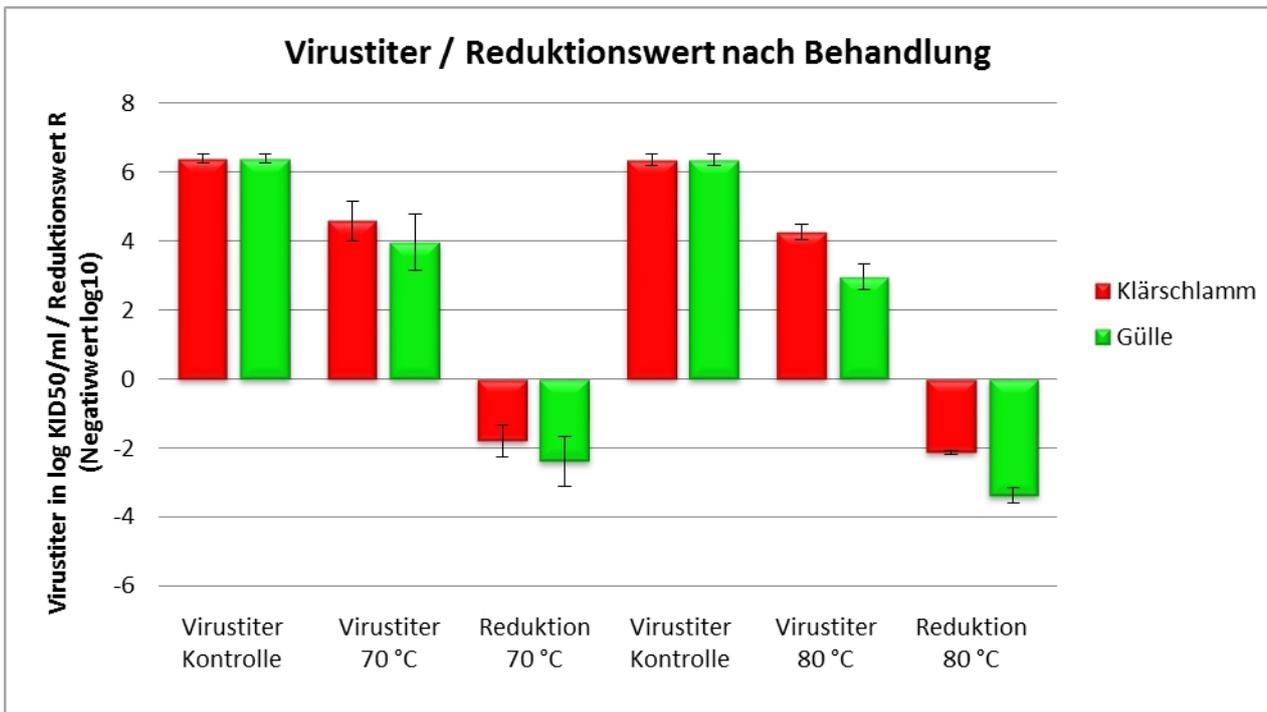


Abbildung 4: Nachweis (Virustiter in log KID₅₀/ml) von BPV und Reduktionswerte R (als Negativwert log₁₀) in den Kontrollproben sowie in Klärschlamm und Gülle nach Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) bzw. 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde.

4.1.3.4 Erhitzungsversuche mit Vertretern der Sporenbildner

Bacillus globigii

In Tabelle 23 sind die Konzentrationen für den Nachweis von *Bacillus globigii* in der Sporensuspension und den beimpften Substraten Klärschlamm und Gülle zu Versuchsbeginn ohne Behandlung und nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten und 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten dargestellt. Aus der Tabelle geht hervor, dass die mittleren Konzentrationen zu Beginn des Versuchs in der Sporensuspension bei 3,9x10⁹ KbE/ml, im Klärschlamm bei 3,2x10⁷ KbE/ml und in Gülle bei 4,6x10⁷ KbE/ml lagen. Nach Erhitzung auf 90 °C für eine Stunde bzw. 98 °C für 30 Minuten lagen die Konzentrationen bei 2,1x10⁹ KbE/ml bzw. 1,1x10⁹ KbE/ml in der Sporensuspension, bei 3,9x10⁷ KbE/ml bzw. 2,9x10⁷ KbE/ml im Klärschlamm und bei 6,8x10⁷ KbE/ml bzw. 6,2x10⁷ KbE/ml in der Gülle. Nach Erhitzung auf 110 °C für 30 Minuten bzw. auf 133 °C für 20 Minuten konnte kein Wachstum von *Bacillus globigii* sowohl in der Sporensuspension, als auch im Klärschlamm und in der Gülle nachgewiesen werden (Tabelle 23).

Tabelle 23: Konzentrationen (KbE/ml) von *Bacillus globigii* in der Sporensuspension und den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-1 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-1 °C) für 20 Minuten. n.d.: nicht durchgeführt

B. globigii	Versuch	Start	90 °C für 1h	98 °C 30 Min	110 °C 30 Min	133 °C 20 Min
Sporensuspension	1	1,4x10 ¹⁰	4,5x10 ⁹	n.d.	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	2	2,0x10 ⁹	1,4x10 ⁹	1,1x10 ⁹	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	3	2,0x10 ⁹	1,4x10 ⁹	1,1x10 ⁹	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	Mittelwert	3,9x10 ⁹	2,1x10 ⁹	1,1x10 ⁹	Kein Wachstum	Kein Wachstum
Klärschlamm	1	5,8x10 ⁷	4,8x10 ⁷	n.d.	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	2	1,8x10 ⁷	3,3x10 ⁷	4,1x10 ⁷	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	3	1,8x10 ⁷	3,6x10 ⁷	2,0x10 ⁷	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	Mittelwert	3,2x10 ⁷	3,9x10 ⁷	2,9x10 ⁷	Kein Wachstum	Kein Wachstum
Gülle	1	5,7x10 ⁷	5,4x10 ⁷	n.d.	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	2	3,7x10 ⁷	8,1x10 ⁷	5,7x10 ⁷	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	3	3,7x10 ⁷	7,2x10 ⁷	6,8x10 ⁷	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	Mittelwert	4,6x10 ⁷	6,8x10 ⁷	6,2x10 ⁷	Kein Wachstum	Kein Wachstum

Tabelle 24: Reduktionswerte (log₁₀) für *Bacillus globigii* in der Sporensuspension, den beimpften Ausgangssubstraten und in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten.

B. globigii	Versuch	90 °C für 1h	98 °C 30 Min	110 °C 30 Min	133 °C 20 Min
Sporensuspension	1	0,5	n.d.	10,2	10,2
	2	0,1	0,2	9,3	9,3
	3	0,1	0,2	9,3	9,3
	Mittelwert	0,2	0,5	9,5	9,5
Klärschlamm	1	0,0	n.d.	7,7	7,7
	2	-0,2	-0,3	7,2	7,2
	3	-0,3	-0,0	7,2	7,2
	Mittelwert	-0,1	-0,1	7,4	7,4
Gülle	1	0,0	n.d.	7,7	7,7
	2	-0,3	-0,1	7,5	7,5
	3	-0,2	-0,2	7,5	7,5
	Mittelwert	-0,2	-0,1	7,6	7,6

Die Reduktionswerte R (log₁₀) für *Bacillus globigii* sind in Tabelle 25 (Einzelwerte und Mittelwerte) dargestellt. Es zeigt sich, dass die Reduktionswerte für die Erhitzung bei 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde bzw.

98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten in der Sporensuspension bei 0,2 bzw. 0,3 log₁₀-Stufen, in Klärschlamm bei ca. -0,1 -Stufen und in Gülle bei -ca. 0,20 log₁₀-Stufen lagen. Nach Erhitzung auf 110 °C (+/-1 °C) für 30 Minuten bzw. 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten wird aus der Tabelle 22 und der Abbildung 4 eine Reduktion von 9,6 bzw. 7,4 bzw. 7,6 log₁₀-Stufen in der Sporensuspension bzw. im Klärschlamm bzw. in der Gülle ersichtlich (Tabelle 24).

Clostridium sporogenes

Die Konzentrationen für den Nachweis von *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension und den beimpften Substraten Klärschlamm und Gülle zu Versuchsbeginn ohne Behandlung und nach Erhitzung auf 90 °C für eine Stunde, 98 °C für 30 Minuten, 110 °C für 30 Minuten und 133 °C für 20 Minuten sind aus Tabelle 25 ersichtlich. Die Tabelle 25 zeigt zu Beginn des Versuchs mittlere Konzentrationen von 2,3x10⁷ KbE/ml in der Sporensuspension, von 1,0x10⁶ KbE/ml in Klärschlamm und 9,2x10⁵ KbE/ml in Gülle. Nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde bzw. 99 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten lagen die Konzentrationen bei 8,9x10⁶ KbE/ml bzw. 5,5x10⁶ KbE/ml in der Sporensuspension, bei 1,8x10⁵ KbE/ml bzw. 6,8x10⁴ KbE/ml im Klärschlamm und bei 2,3x10⁵ KbE/ml bzw. 2,0x10⁵ KbE/ml in der Gülle. Nach Erhitzung auf 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten bzw. auf 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten konnte *Clostridium sporogenes* nicht mehr in der Sporensuspension, im Klärschlamm und in der Gülle nachgewiesen werden (Tabelle 25). Aus Tabelle 26 und Abbildung 5 sind die Reduktionswerte R (log₁₀) (Einzelwerte und Mittelwerte) für *Clostridium sporogenes* ersichtlich. Es zeigt sich, dass die Reduktionswerte für die Erhitzung bei 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde bzw. 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten in der Sporensuspension bei 0,4 bzw. 0,7 log₁₀-Stufen, in Klärschlamm bei 0,6 bzw. 1,4 log₁₀-Stufen und in Gülle bei 0,6 bzw. 0,9 log₁₀-Stufen lagen. Nach Erhitzung auf 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten und 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten wird aus Tabelle 26 und der Abbildung 5 eine Reduktion von 7,3 bzw. 6,0 bzw. 5,9 log₁₀-Stufen in der Sporensuspension bzw. im Klärschlamm bzw. in der Gülle ersichtlich (Tabelle 26).

Tabelle 25: Konzentrationen (KbE/ml) von *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension und den beimpften Ausgangssubstraten zu Beginn des Versuchs, in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für eine Stunde, +98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-1 °C) für 20 Minuten. n.d.: nicht durchgeführt

C. sporogenes	Versuch	Start	90 °C für 1h	98 °C 30 Min	110 °C 30 Min	133 °C 20 Min
Sporensuspension	1	1,4x10 ⁷	1,1x10 ⁷	n.d.	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	2	3,0x10 ⁷	8,0x10 ⁶	5,5x10 ⁶	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	3	3,0x10 ⁷	8,0x10 ⁶	5,5x10 ⁶	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	Mittelwert	2,3x10 ⁷	8,9x10 ⁶	5,5x10 ⁶	Kein Wachstum	Kein Wachstum
Klärschlamm	1	1,7x10 ⁵	5,9x10 ⁴	n.d.	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	2	2,5x10 ⁶	2,6x10 ⁵	6,5x10 ⁴	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	3	2,5x10 ⁶	4,0x10 ⁵	7,0x10 ⁴	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	Mittelwert	1,0x10 ⁶	1,8x10 ⁵	6,8x10 ⁴	Kein Wachstum	Kein Wachstum
Gülle	1	1,0x10 ⁵	8,0x10 ⁴	n.d.	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	2	2,8x10 ⁶	4,0x10 ⁵	2,0x10 ⁵	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	3	2,8x10 ⁶	3,6x10 ⁵	2,0x10 ⁵	Kein Wachstum	Kein Wachstum
	Mittelwert	9,2x10 ⁵	2,3x10 ⁵	2,0x10 ⁵	Kein Wachstum	Kein Wachstum

Tabelle 26: Reduktionswerte (\log_{10}) von *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension und den beimpften Ausgangssubstraten in den Testproben nach Erhitzung auf 90 °C (+/-2 °C) für 1 Stunde, 98 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, 110 °C (+/-2 °C) für 30 Minuten, sowie 133 °C (+/-2 °C) für 20 Minuten. n.d.: nicht durchgeführt

C. sporogenes	Versuch	90 °C für 1h	98 °C 30 Min	110 °C 30 Min	133 °C 20 Min
Sporensuspension	1	0,1	n.d.	7,1	7,1
	2	0,5	0,7	7,4	7,4
	3	0,5	0,7	7,4	7,4
	Mittelwert	0,4	0,7	7,3	7,3
Klärschlamm	1	0,4	n.d.	5,2	5,2
	2	0,9	1,5	6,4	6,4
	3	0,8	1,5	6,4	6,4
	Mittelwert	0,6	1,4	6,0	6,0
Gülle	1	0,1	n.d.	5,0	5,0
	2	0,8	1,1	6,4	6,4
	3	0,8	1,1	6,4	6,4
	Mittelwert	0,6	0,9	5,9	5,9

In Abbildung 5 sind die Reduktionswerte für *Bacillus globigii* und *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension und den zwei Substraten Klärschlamm und Gülle nach Behandlung bei 90 °C für 60 Minuten, 98 °C für 30 Minuten, 110 °C für 30 Minuten und 133 °C für 20 Minuten zusammenfassend dargestellt (Abbildung 5). Erst ab einer Temperatur von 110 °C wurde eine nennenswerte Reduktion erreicht.

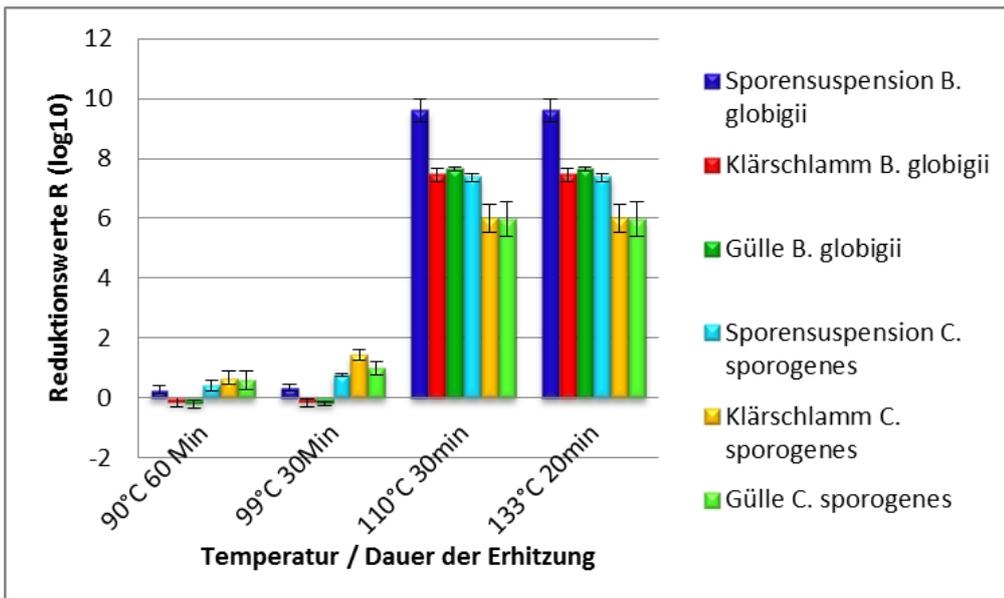


Abbildung 5: Reduktionswerte R (\log_{10}) für *Bacillus globigii* und *Clostridium sporogenes* in der Sporensuspension, im Klärschlamm und Gülle nach Erhitzung bei 90 °C (+/-2 °C), 98 °C (+/-2 °C), 110 °C (+/-2 °C) und 133 °C (+/-2 °C).

4.1.3.5 Lagerungsversuche

EAHEC O104:H4

Die Ergebnisse (Mittelwerte) für den Nachweis von EAHEC O104:H4 (Konzentrationen in KbE/ml) in den drei Substraten Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten bei der Lagerung bei 10 °C (+/-2 °C), sowie die Konzentrationen in den bei 6 °C (+/-2 °C) gelagerten Bakteriensuspensionen zu Versuchsbeginn an Tag 0, sowie nach zwei, vier, acht, zwölf, sechzehn, zwanzig, vierundzwanzig und sechsunddreißig Wochen Lagerungsdauer sind in Tabelle 28 aufgelistet. Die Konzentrationen für EAHEC O104:H4 blieben in der Bakteriensuspension (6 °C) über die gesamten sechsunddreißig Wochen Lagerungsdauer relativ konstant im Bereich zwischen $3,6 \times 10^8$ KbE/ml bis $1,7 \times 10^9$ KbE/ml. Im Klärschlamm lagen die Konzentrationen zu Beginn des Versuchs an Tag 0 bzw. nach zwei Wochen bei $9,3 \times 10^7$ KbE/ml bzw. $1,9 \times 10^8$ KbE/ml. Daran anschließend erfolgte ein Absinken der Konzentrationen von $2,9 \times 10^6$ KbE/ml nach vier Wochen über $5,9 \times 10^5$ KbE/ml nach zwölf Wochen, $7,3 \times 10^4$ KbE/ml nach vierundzwanzig Wochen und $3,1 \times 10^2$ KbE/ml nach sechsunddreißig Wochen. Für Gülle waren am Tag 0 Konzentrationen von $2,3 \times 10^8$ KbE/ml festzustellen und es kam bereits nach zwei Wochen zu einer Reduktion auf Werte von $2,2 \times 10^5$ KbE/ml und ein stetiges Absinken der Konzentrationen über $8,0 \times 10^3$ KbE/ml nach zwölf Wochen, $2,6 \times 10^1$ KbE/ml nach vierundzwanzig Wochen auf 7,0 KbE/ml nach sechsunddreißig Wochen. Im Gärrückstand lagen die Konzentrationen zu Beginn bei $4,3 \times 10^7$ KbE/g und blieben die ersten zwölf Wochen konstant bei Konzentrationen zwischen $1,5 \times 10^7$ KbE/g und $6,3 \times 10^7$ KbE/g. Nach sechzehn Wochen lagen die Konzentrationen bei $7,3 \times 10^5$ KbE/g, nach zwanzig Wochen bei $3,2 \times 10^3$ KbE/g, nach vierundzwanzig Wochen bei $9,3 \times 10^5$ und am Ende des Versuchs nach sechsunddreißig Wochen bei $1,4 \times 10^2$ KbE/g (Tabelle 27).

Tabelle 28 und Abbildung 6 zeigen die Reduktionswerte R (\log_{10}) bei der Lagerung der EAHEC-Bakteriensuspension bei 6 °C (+/-2 °C) und den beimpften Substraten bei 10 °C (+/-2 °C) nach zwei, vier, acht, zwölf, sechzehn, zwanzig, vierundzwanzig und sechsunddreißig Wochen. In der Bakteriensuspension zeigte sich über die gesamten sechsunddreißig Wochen der Lagerung nur eine sehr geringe Reduktion von ca. einer halben \log_{10} -Stufe. In den Gärprodukten ergab sich eine stärkere Reduktion von 1,8 \log_{10} -Stufen nach sechzehn Wochen, und über 5 \log_{10} -Stufen am Ende des Versuchs nach sechsunddreißig Wochen. Im Klärschlamm wurde eine schnellere Reduktion von 1,5 \log_{10} -Stufen nach vier Wochen und über 5 \log_{10} -Stufen nach sechsunddreißig Wochen erreicht. In Gülle zeigte sich die höchste Reduktion mit 3 \log_{10} -Stufen bereits nach zwei Wochen und von über 7 \log_{10} -Stufen nach sechsunddreißig Wochen. (Tabelle 28 und Abbildung 6).

Tabelle 27: Konzentrationen (KbE/ml bzw. KbE/g) für den Nachweis von EAHEC O104:H4 in der Bakteriensuspension (+6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten an Tag 0 und nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei +10 °C (+/-2 °C).

	Tag 0	2 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	16 Wo.	20 Wo.	24 Wo.	36 Wo.
Bakteriensuspension	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$8,8 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$
Klärschlamm	$9,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$2,6 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^2$
Gülle	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$7,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$2,6 \times 10^1$	7,0
Gärrückstand	$4,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$7,3 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	$9,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^2$

Tabelle 28: Reduktionswerte R (log₁₀) für EAHEC in der Bakteriensuspension (bei 6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).

	2 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	16 Wo.	20 Wo.	24 Wo.	36 Wo.
Bakteriensuspension	0	-0,1	-0,03	0,07	0	0,2	0,2	0,6
Klärschlamm	-0,3	1,5	1,9	2,2	2,9	3,1	3,1	5,4
Gülle	3,0	3,5	4,8	4,4	5,5	5,8	5,9	7,5
Gärrückstand		-0,1	0,1	0,4	1,7	4,1	1,6	5,4

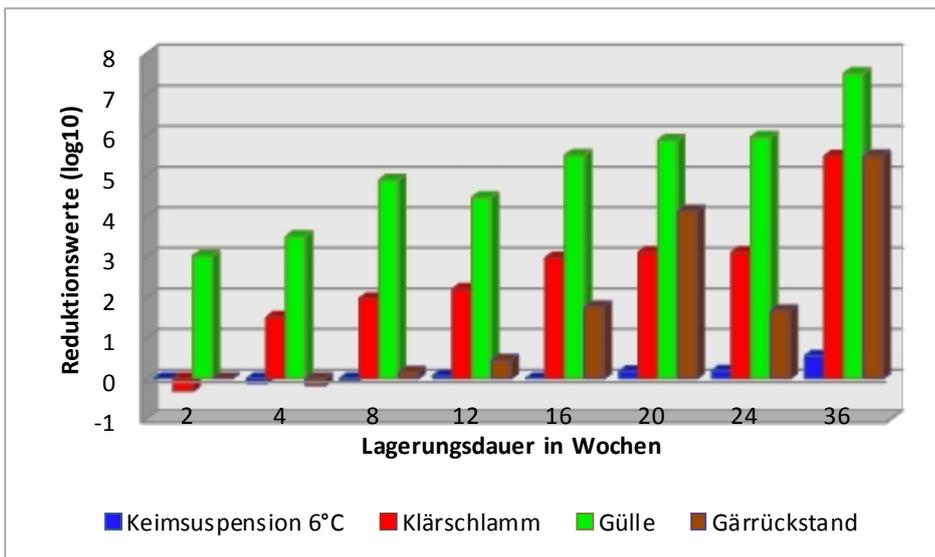


Abbildung 6: Reduktionswerte R (log₁₀) für EAHEC in der Bakteriensuspension (bei 6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).

Monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120

Die Tabelle 29 zeigt die Konzentrationen in KbE/ml (Mittelwerte) für den Nachweis von *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in den Substraten Klärschlamm, Gülle und Gärresten bei der Lagerung bei 10 °C (+/-2 °C), sowie in den bei 4 °C gelagerten Bakteriensuspensionen zu Versuchsbeginn an Tag 0, sowie nach zwei, vier, acht, zwölf, sechzehn, zwanzig, vierundzwanzig und sechsunddreißig Wochen Lagerungsdauer. In der Bakteriensuspension blieben die Konzentrationen über den gesamten Zeitraum der Lagerung von sechsunddreißig Wochen relativ konstant und schwankten im Bereich zwischen $1,2 \times 10^8$ KbE/ml und $3,5 \times 10^9$ KbE/ml. Im Klärschlamm lagen die Konzentrationen zu Beginn des Versuchs an Tag 0 bei $9,3 \times 10^7$ KbE/ml bzw. nach zwei Wochen bei $1,7 \times 10^7$ KbE/ml bzw. nach vier Wochen bei $1,5 \times 10^7$ KbE/ml. Nach acht bzw. zwölf Wochen zeigt die Tabelle Konzentrationen von $6,3 \times 10^6$ KbE/ml bzw. $1,3 \times 10^6$ KbE/ml. Anschließend war ein Absinken der Konzentrationen auf Konzentrationen von $1,9 \times 10^5$ KbE/ml nach sechzehn Wochen, $1,1 \times 10^4$ KbE/ml nach zwanzig Wochen, $2,0 \times 10^4$ KbE/ml nach vierundzwanzig Wochen und $1,4 \times 10^1$ KbE/ml nach sechsunddreißig Wochen ersichtlich. Für Gülle lagen zu Versuchsbeginn Konzentrationen von $1,8 \times 10^8$ KbE/ml vor und es war eine stete Abnahme der Konzentrationen während der Lagerung zu beobachten. Die Konzentrationen sanken über $5,9 \times 10^7$ KbE/ml nach zwei Wochen, $6,3 \times 10^6$ KbE/ml bzw.

3,2x10⁶ KbE/ml nach vier bzw. acht Wochen, 2,3x10⁵ KbE/ml bzw. 3,2x10⁵ KbE/ml nach zwölf bzw. sechzehn Wochen, 1,2x10⁴ KbE/ml bzw. 1,4x10⁴ KbE/ml nach zwanzig bzw. vierundzwanzig Wochen auf 2,3x10¹ KbE/ml nach sechsunddreißig Wochen zu sehen. In den Gärprodukten wurden zu Versuchsstart Konzentrationen von 4,6x10⁸ KbE/g und nach vierzehn Tagen von 1,3x10⁸ KbE/ml festgestellt. Nach vier bzw. acht Wochen lagen die Konzentrationen bei 2,0x10⁷ KbE/g bzw. 2,3x10⁷ KbE/g. Danach sanken die Konzentrationen auf 1,5x10⁵ KbE/g nach zwölf Wochen, 2,5x10⁴ KbE/g nach sechzehn Wochen, 3,2x10³ KbE/g nach zwanzig Wochen, 2,3x10¹ KbE/g nach vierundzwanzig Wochen und nach 36 Wochen lagen sie unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/g (Tabelle 29).

Tabelle 29: Konzentrationen (KbE/ml bzw. g) für den Nachweis von *Salmonella* Typhimurium DT120 (monoph.) in der Bakterien-suspension (6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten an Tag 0, nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).

	Tag 0	2 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	16 Wo.	20 Wo.	24 Wo.	36 Wo.
Bakteriensuspension	1,9x10 ⁹	1,9x10 ⁹	3,5x10 ⁹	1,2x10 ⁹	1,1x10 ⁹	1,4x10 ⁹	1,2x10 ⁸	9,3x10 ⁸	3,9x10 ⁸
Klärschlamm	9,3x10 ⁷	1,7x10 ⁷	1,5x10 ⁷	6,3x10 ⁶	1,3x10 ⁶	1,9x10 ⁵	1,1x10 ⁴	2,0x10 ⁴	1,4x10 ¹
Gülle	1,8x10 ⁸	5,9x10 ⁷	6,3x10 ⁶	3,2x10 ⁶	2,3x10 ⁵	3,2x10 ⁵	1,2x10 ⁴	1,4x10 ⁴	2,3x10 ¹
Gärrückstand	4,6x10 ⁸	1,3x10 ⁸	2,0x10 ⁷	2,3x10 ⁷	1,2x10 ⁵	2,5x10 ⁴	3,2x10 ³	2,3x10 ¹	< 3,0

Die Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) bei der Lagerung in der Bakteriensuspension bei 6 °C (+/-2 °C) und den beimpften Substraten bei 10 °C (+/-2 °C) nach zwei, vier, acht, zwölf, sechzehn, zwanzig, vierundzwanzig und sechsunddreißig Wochen Lagerungsdauer sind in Tabelle 30 und Abbildung 7 aufgezeigt. In der Bakteriensuspension zeigte sich über die gesamten sechsunddreißig Wochen der Lagerung eine geringe Reduktion von 0,7 log₁₀-Stufen. Im Klärschlamm wird eine höhere Reduktion von 0,8 log₁₀-Stufen nach vier Wochen und fast 7 log₁₀-Stufen nach sechsunddreißig Wochen erreicht. In Gülle zeigte sich eine etwas schnellere Reduktion von 1,5 log₁₀-Stufen nach vier Wochen und ebenfalls fast 7 log₁₀-Stufen nach sechsunddreißig Wochen. In den Gärresten ergab sich die höchste Reduktion mit ca. 1,5 log₁₀-Stufen nach 4 Wochen Lagerungsdauer über 8 log₁₀-Stufen am Versuchsende nach sechsunddreißig Wochen (Tabelle 30 und Abbildung 7).

Tabelle 30: Reduktionswerte R (log¹⁰) für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in der Bakteriensuspension (6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).

	2 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	16 Wo.	20 Wo.	24 Wo.	36 Wo.
Bakteriensuspension	0	-0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,7
Klärschlamm	0,7	0,7	1,1	1,8	2,6	3,9	3,6	6,8
Gülle	0,4	1,4	1,7	2,8	2,7	4,1	4,1	6,8
Gärrückstand	0,5	1,3	1,3	3,5	4,2	5,1	7,3	8,6

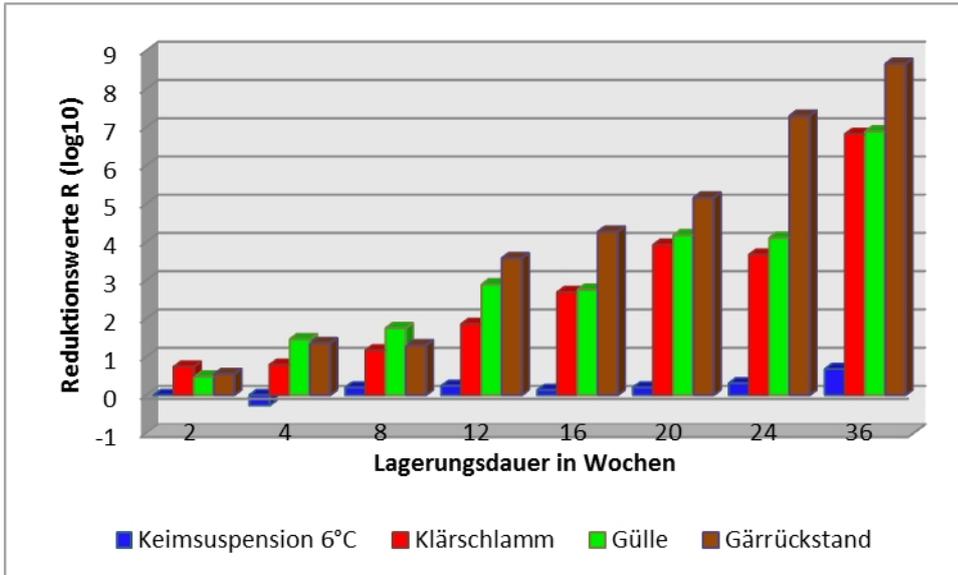


Abbildung 7: Reduktionswerte R (log₁₀) für *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) in der Bakteriensuspension (6 °C) und in Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).

Bacillus globigii

Die Konzentrationen (KbE/ml bzw. KbE/g) für den Nachweis von *Bacillus globigii* im Klärschlamm, in der Gülle und den Gärresten während der Lagerung bei 10 °C (+/-2 °C), sowie in der bei 6 °C (+/-2 °C) gelagerten Sporensuspension, beim Versuchsstart an Tag 0, sowie nach zwei, vier, acht, zwölf, sechzehn, zwanzig, vierundzwanzig und sechsunddreißig Wochen Lagerungsdauer sind aus Tabelle 31 zusehen. Die Tabelle zeigt, dass die Konzentrationen in der Sporensuspension über den gesamten Versuchszeitraum von sechsunddreißig Wochen relativ konstant blieben und zwischen 3,8x10⁹ KbE/g und 1,2x10¹⁰ KbE/g schwankten. In den Substraten stellte sich die Situation ähnlich dar, die Konzentrationen lagen im Klärschlamm zwischen 3,1x10⁷ KbE/g und 1,2x10⁸ KbE/g, in der Gülle zwischen 3,6x10⁷ KbE/g und 1,3x10⁸ KbE/g, und in den Gärprodukten zwischen 7,4x10⁷ KbE/g und 1,4x10⁸ KbE/g (Tabelle 31). Die Reduktionswerte R (log₁₀) für *Bacillus globigii* in den Lagerungsversuchen gehen aus Tabelle 32 hervor.

Tabelle 31: Konzentrationen (KbE/ml bzw. g) für den Nachweis von *Bacillus globigii* in der Bakteriensuspension (+6 °C) und im Klärschlamm, in Gülle und Gärprodukten an Tag 0 und nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei +10 °C (+/-2 °C).

	Tag 0	2 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	16 Wo.	20 Wo.	24 Wo.	36 Wo.
Sporensuspension	4,5x10 ⁹	1,2x10 ¹⁰	7,5x10 ⁹	4,2x10 ⁹	8,0x10 ⁹	7,5x10 ⁹	1,0x10 ¹⁰	3,8x10 ⁹	5,7x10 ⁹
Klärschlamm	8,5x10 ⁷	3,1x10 ⁷	5,9x10 ⁷	4,9x10 ⁷	5,0x10 ⁷	7,1x10 ⁷	1,2x10 ⁸	3,3x10 ⁷	3,4x10 ⁷
Gülle	8,3x10 ⁷	3,6x10 ⁷	1,3x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,0x10 ⁸	1,3x10 ⁸	1,1x10 ⁸	6,3x10 ⁷	1,0x10 ⁸
Gärrückstand	7,4x10 ⁷	1,0x10 ⁸	1,4x10 ⁸	8,6x10 ⁷	1,2x10 ⁸	1,2x10 ⁸	1,4x10 ⁸	7,7x10 ⁷	9,0x10 ⁷

Die Konzentrationen von *Bacillus globigii* waren in allen Substraten sowie in der Sporensuspension über die sechsunddreißig Wochen Versuchsdauer relativ konstant (Tabelle 31) d.h. es erfolgte keine Reduktion von *Bacillus globigii* bei der Lagerung (Tabelle 32).

Tabelle 32: Reduktionswerte R (\log_{10}) *Bacillus globigii* in der Bakteriensuspension (6 °C) und im Klärschlamm, in Gülle und Gärprodukten nach 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 und 36 Wochen Lagerungszeit bei 10 °C (+/-2 °C).

	2 Wo.	4 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	16 Wo.	20 Wo.	24 Wo.	36 Wo.
Bakteriensuspension	-0,4	-0,2	0,03	-0,2	-0,2	-0,3	0,1	-0,0
Klärschlamm	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	-0,1	0,4	0,4
Gülle	0,3	-0,2	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,1	-0,1
Gärrückstand	-0,1	-0,2	-0,0	-0,2	-0,2	-0,2	-0,02	-0,1

4.1.3.6 Versuche an der Hochdrucktemperatur-Pelletierungsanlage (HTP-Anlage)

In Vorversuchen wurde einerseits die Tenazität der, aus arbeitsschutztechnischen Gründen, verwendeten Erreger *Escherichia coli* K12 und des Impfstammes *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral im Vergleich zu den in den übrigen Versuchen verwendeten Erreger *Escherichia coli* DSM 682 und *Salmonella* Typhimurium DT120 (monophasisch) gegenüber Temperatureinwirkungen und andererseits der Einfluss der verwendeten Holzspäne auf die Überlebensfähigkeit der Erreger untersucht. In den Versuchen hat sich gezeigt, dass die nicht pathogenen bzw. attenuierten Erreger *Escherichia coli* K12 und der Impfstamm *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral repräsentativ für die in den übrigen Versuchen untersuchten Erreger verwendet werden können. In den Vorversuchen ist jedoch ein negativer Einfluss der Holzspäne auf das Überleben der vegetativen Keime (*Escherichia coli* K12 und *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral) sichtbar. Auf die Sporen von *Bacillus globigii* ist kein negativer Einfluss auf die Überlebensfähigkeit feststellbar. Die Ergebnisse der Vorversuche sind nicht im Detail dargestellt.

Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde der Einfluss des Pelletierungsprozesses auf die Überlebensfähigkeit der untersuchten Erreger in einer Versuchsanlage der Angaben der Hochschule für Forstwirtschaft Rottenburg untersucht. Die Ergebnisse, Einzelwerte und deren Mittelwerte, für den Nachweis (Konzentrationen in KbE/ml bzw. KbE/g) der verwendeten Erreger *Escherichia coli* K12, *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral und der als biologischer Tracer verwendeten Sporen von *Bacillus globigii* sind in Tabelle 34 gezeigt.

Die mittleren Konzentrationen für *Escherichia coli* K12 bzw. *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral in den beimpften Holzspänen lagen zu Beginn des Versuchs bei $3,2 \times 10^4$ KbE/ml bzw. $5,3 \times 10^4$ KbE/ml und nach dem Versuch bei $4,6 \times 10^1$ KbE/ml bzw. $3,1 \times 10^2$ KbE/ml. In den Pellets und den Staub-Pelletgemischproben waren die Konzentrationen für beide Erreger nach dem Pelletierungsprozess unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KbE/ml. Im Gegensatz dazu lagen die Konzentrationen für *Bacillus globigii* bei $1,0 \times 10^6$ KbE/ml in den beimpften Holzspänen zu Beginn des Versuchs und bei $9,3 \times 10^5$ KbE/ml am Ende des Versuchs. Die Konzentrationen für *Bacillus globigii* lagen in den Pellets bei mittleren Konzentrationen von $3,6 \times 10^4$ KbE/ml und in den Staub-Pelletgemischproben bei mittleren Konzentrationen von $1,8 \times 10^5$ KbE/ml nach der Pelletierung (Tabelle 33).

Tabelle 33: Konzentrationen (KbE/ml) von *Escherichia coli*K12, *Salmonella*Typhimurium Zoosaloral und *Bacillus globigii* in der Keim- bzw. Sporensuspension, den beimpften Holzspänen zu Beginn des Versuchs, in den Pellets, dem Staub-Pellet-Gemisch und in den Holzspänen am Ende des Versuchs in der Hochdrucktemperatur-Pelletierungsanlage. n.d.: nicht durchgeführt

	Versuch	Suspension	Holzspäne Start	Pellets	Staub / Pellet	Holzspäne Ende
E. coli K12	1	1,8x10 ⁸	2,3x10 ⁴	< 3,0	< 3,0	9,3x10 ¹
	2	4,3x10 ⁸	4,3x10 ⁴	< 3,0	< 3,0	2,3x10 ¹
	Mittelwert	2,8x10 ⁸	3,2x10 ⁴	< 3,0	< 3,0	4,6x10 ¹
S. Zoosaloral	1	2,5x10 ⁸	6,4x10 ⁴	< 3,0	< 3,0	2,3x10 ³
	2	9,3x10 ⁸	4,3x10 ⁴	< 3,0	< 3,0	4,3x10 ¹
	Mittelwert	4,8x10 ⁸	5,3x10 ⁴	< 3,0	< 3,0	3,1x10 ²
B. globigii	1	4,0x10 ⁸	9,9x10 ⁵	2,3x10 ⁴	1,6x10 ⁵	7,8x10 ⁵
	2		1,0x10 ⁶	9,2x10 ⁴	2,1x10 ⁵	1,1x10 ⁶
	3		n.d.	2,8x10 ⁴	n.d.	n.d.
	4		n.d.	3,9x10 ⁴	n.d.	n.d.
	5		n.d.	2,7x10 ⁴	n.d.	n.d.
	Mittelwert			1,0x10 ⁶	3,6x10 ⁴	1,8x10 ⁵

Tabelle 34: Reduktionswerte (log₁₀) für *Escherichia coli*K12, *Salmonella*Typhimurium Zoosaloral und *Bacillus globigii* in den Pellets, dem Staub-Pellet-Gemisch nach der Pelletierung und in den unbehandelten Holzspänen (beimpft) am Ende des Versuchs. n.d.: nicht durchgeführt

	Versuch	Pellets	Staub / Pellet	Holzspäne Ende
<i>Escherichia coli</i> K12	1	4,3	4,3	2,3
	2	4,6	4,6	3,2
	MW	4,5	4,5	2,8
<i>S. Typhimurium Zoosaloral</i>	1	4,8	4,8	1,4
	2	4,6	4,3	3,0
	MW	4,7	4,7	2,2
<i>Bacillus globigii</i>	1	1,6	0,8	0,1
	2	1,0	0,6	-0,04
	3	1,5	n.d.	n.d.
	4	1,4	n.d.	n.d.
	5	1,5	n.d.	n.d.
	MW	1,4	0,7	0,03

Die Reduktionswerte R (\log_{10}) für die untersuchten Erreger in den Pellets, den Staubgemischproben, sowie den beimpften Holzspänen (Kontrolle) nach der Pelletierung sind in Tabelle 35 und Abbildung 8 dargestellt. *Escherichia coli* K12 bzw. *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral wurden für in den Pellets sowie den Staubgemischproben um 4 bis 5 \log_{10} -Stufen reduziert. In den beimpften Holzspänen, die nicht dem Pelletierungsprozess ausgesetzt wurden, fand bereits eine Reduktion um 2,8 bzw. 2,2 \log_{10} -Stufen für *Escherichia coli* K12 bzw. *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral während der Versuchslaufzeit statt. Für *Bacillus globigii* wurde eine geringere Reduktion von 1,4 bzw. 0,7 \log_{10} -Stufen in den Pellets bzw. den Pellet-Staubgemischproben erreicht. In den beimpften Holzspänen wurde keine Reduktion am Ende des Versuchs festgestellt (Tabelle 34 und Abbildung 8).

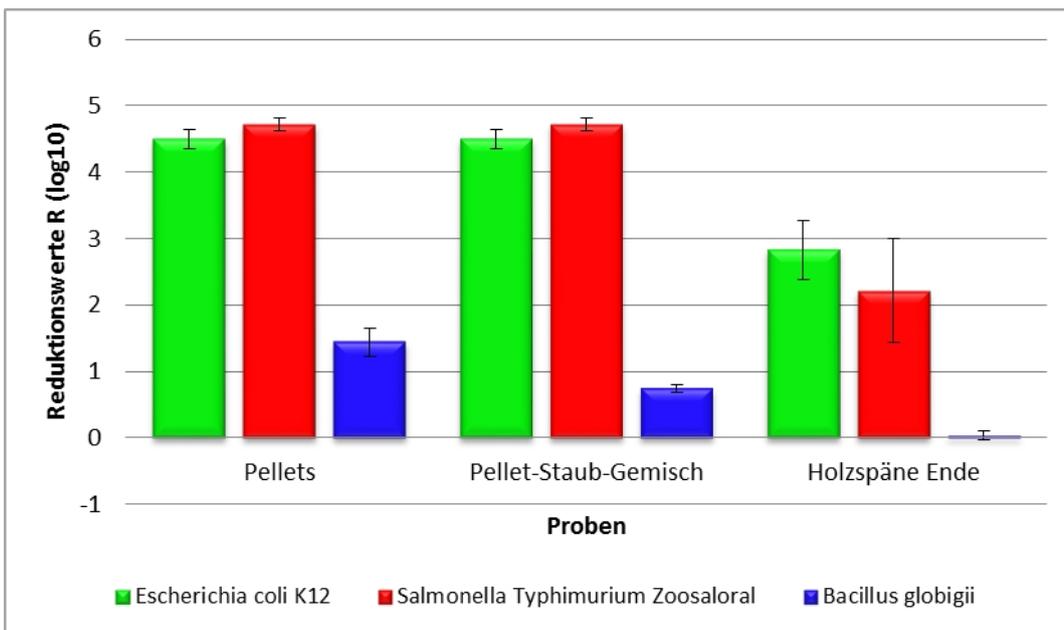


Abbildung 8: Reduktionswerte R (\log_{10}) *Escherichia coli* K12, *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral und *Bacillus globigii* in den Pellets, dem Staub-Pellet-Gemisch nach der Pelletierung und in den unbehandelten Holzspänen (beimpft) am Ende des Versuchs.

4.1.4 Diskussion

4.1.4.1 Auswahl der Erreger

Die Durchführung der Versuche war laut Projektantrag anhand der tier- bzw. humanpathogene *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, der humanpathogenen EAHEC-Serovar O:104:H4 und EHEC-Serovar O:157:H7 sowie thermoresistenten Parvoviren geplant.

Hinsichtlich der verwendeten Erreger ergaben sich im Bereich der Seuchenhygiene Abweichungen. Die Abweichungen im Bereich der Sporenbildner (Gattung *Clostridium*) beruhten darauf, dass das Labor, das bei der Produktion entsprechender Sporensuspensionen und der anschließenden Diagnostik Unterstützung zugesagt hatte, schlussendlich leider nicht in der Lage war, die entsprechenden Leistungen zu erbringen. Aus diesem Grund gab es auch gewisse Verzögerungen bei der Versuchsdurchführung. Als Alternative dazu wurden dann Endosporen von *Clostridium sporogenes*, als Repräsentant der Gattung *Clostridium* (anaerobe Sporenbildner), angewandt und zusätzlich als aerob wachsender Sporenbildner *Bacillus globigii*, repräsentativ für die Gattung *Bacillus*, verwendet. *Clostridium sporogenes* ist ein nicht-toxischer Stellvertreter für proteolytische *Clostridium botulinum*-Stämme, der in der Überprüfung (Validierung) thermischer Prozesse

se in der Lebensmittelproduktion, der Herleitung von Temperatur-Zeitverläufen und als Modellorganismus für proteolytische *Clostridium botulinum*-Stämme Verwendung findet (Brown et al., 2012; Bradbury et al., 2012; Basaran-Akgul et al., 2013). Bei *Bacillus globigii* handelt es sich um einen für den Menschen nicht-pathogenen Vertreter der Gattung *Bacillus*, u.a. als Stellvertreter für *B. anthracis* (Hosni et al., 2009), der in der Desinfektionsmittelprüfung verwendet wird. Der Sporenbildner *Bacillus globigii* ist u.a. als „biologischer Tracer“ zur Bestimmung der Mindestverweilzeit in Biogasanlagen in der BioAbfV (2012) definiert und findet zudem Verwendung in der Desinfektionsmittelprüfung. Neben dem enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC)-Stamm O104:H4 aus dem Ausbruchsgeschehen im Mai/Juni 2011 in Deutschland und Frankreich wurde anstelle des EHEC-Stammes O157:H7 eine monophasische Variante der Serovar Typhimurium DT120 aus der Gattung *Salmonella* untersucht. Hierbei handelt es sich um einen human- und tierpathogenen klassischen Infektionserreger, der nach wie vor eine große Bedeutung hat. Nach Angaben verschiedener Autoren traten in zunehmendem Maße monophasische *Salmonella* Serovare, insbesondere mit der Antigenformel O4, [5],12:i:- sowie Multiresistenzen, innerhalb der letzten 10 Jahre in Europa und weltweit auf (EFSA, 2009; Hopkins et al., 2012; Trüpschuch, 2013) und waren verantwortlich für verschiedene Ausbrüche von Lebensmittelinfektionen. Aufgrund ihrer relativ hohen Tenazität, dem wochen- bis monatelangen Überleben in der Umwelt, und nicht zuletzt wegen ihres Vorkommens in Abwasser und Klärschlamm, sind sie für die Untersuchungen von großem Interesse. Sahlström (2003) berichtet von Salmonellen-Nachweisen in über 50% behandelte Klärschlämme in Schweden.

4.1.4.2 Bewertung der durchgeführten Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden in Form von Tenazitätsversuchen hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der oben angeführten Erreger während der Erhitzung bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen und der Langzeitlagerung von Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten durchgeführt. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zum Einfluss der Hochdrucktemperatur-Pelletierung (HTP) in einer Pelletierungsanlage der Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg auf das Überleben der Erreger. Die Untersuchungen dienen dazu Daten und Informationen über die Tenazität der verschiedenen Erreger im Klärschlamm zu sammeln um eine Risikobewertung der Klärschlammverwertung aus Sicht der Seuchenhygiene sowie die Eignung des Hochdrucktemperatur-Pelletierungsprozess als hygienisierende Behandlung im Sinne des Anhang 2 der AbfklärV (2010) zur Novellierung der derzeit gültigen Klärschlammverordnung (AbfklärV, 1992) machen zu können. Wesentliche Neuerungen werden die strengeren zulässigen Grenzwerte für Schwermetalle und organische Schadstoffe sowie die Einführung von möglichen Grenzwerten für die seuchenhygienisch relevanten Salmonellen sein. Diese Maßnahmen sollen die Schadstoffanreicherung im Boden begrenzen und die von der Klärschlammdüngung ausgehenden seuchenhygienischen Risiken minimieren. Demzufolge dürfen nur noch Klärschlämme abgegeben oder ausgebracht werden, die einer hygienisierenden Behandlung unterzogen wurden und bei denen in 50 g Nasssubstanz keine Salmonellen (*Salmonella* spp.) nachweisbar sind. Die Behandlungsverfahren und entsprechenden Kriterien, die zur Erzielung der seuchenhygienischen Unbedenklichkeit des Endproduktes führen, werden im Anhang 2 AbfklärV (2010) vorgegeben.

In der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (Anonym, 2011) zur Durchführung der Verordnung (EU) Nr. 1069/2009 mit Hygienevorschriften für tierische Nebenprodukte, die nicht für den menschlichen Verzehr geeignet sind, werden aus Sicht der Seuchenhygiene im Rahmen einer direkten Prozessprüfung Anforderungen an die „hygienisierende Wirksamkeit“ der biotechnologischen Behandlungsmöglichkeiten gestellt und dabei eine Mindestreduktion der verwendeten Testkeime gefordert. *Salmonella* Senftenberg (W775, H₂S negativ) bzw. *Enterococcus faecalis* müssen um fünf log₁₀-Stufen reduziert werden. Des Weiteren sieht die Verordnung (EU) Nr. 142/2011 die Verwendung von thermoresistenten Viren, z.B. thermoresistenten Parvoviren, sowie eine Reduktion des Infektiositätstiters um drei log₁₀-Stufen vor, wenn sie als relevante Gefahr ermittelt werden.

In der Bioabfallverordnung (BioAbfVO) (Anonym, 2012), die für Bioabfälle gilt, wird zur Validierung von Aerob- und Anaerobanlagen (Kompostierungs- und Biogasanlagen) das Einbringen von Testkeimen (*Salmonella* Senftenberg W₇₇₅, H₂S negativ) und deren Inaktivierung gefordert. Des Weiteren besteht die Forderung, dass im fertigen Endprodukt in 50 g Probenmaterial keine Salmonellen nachweisbar sein dürfen

4.1.4.3 Bewertung der Ergebnisse der Erhitzungsversuche

Die Untersuchungen zur Tenazität der Erreger während der Erhitzung wurden als separate Versuche für die drei, anhand der zu erwartenden Tenazität der Erreger, festgelegten Versuchsgruppen bei unterschiedlichen Temperatur-/Zeitkombinationen vergleichend in den Substraten Klärschlamm und Gülle, sowie in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt (siehe Punkt 4.2.2.1).

Legt man in den vorliegenden Untersuchungen die Forderung einer Reduktion der Erreger um fünf log₁₀-Stufen zugrunde, wie sie in der Verordnung (EU) Nr. 142/2011 (Anonym, 2011) definiert ist, ist diese bei den untersuchten Erregern aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, dem enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4-Stamm, dem *Escherichia coli* DSM(682)-Stamm und der monophasischen Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120, bei den Temperatur-/Zeit-Kombinationen 53 °C (+/-2 °C) für achtzehn Stunden, 60 °C (+/-2 °C) für ein bzw. zwei Stunden und 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde in allen Substraten erfüllt. Einer Forderung bezüglich einer Inaktivierung der Erreger bis unter die Nachweisgrenze von 0,3 KbE/ml bei Ausgangskonzentrationen im Bereich von 10⁸ bis 10⁹ KbE/ml werden die Temperatur-/Zeit-Kombinationen 53 °C (+/-2 °C) für achtzehn Stunden, 60 °C (+/-2 °C) für zwei Stunden und 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde in allen getesteten Substraten gerecht (siehe Tabelle 20 und Abbildungen 1, 2 und 3). Die Versuche zeigen ebenfalls einen gewissen Unterschied in der Tenazität zwischen dem enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4 und dem *Escherichia coli* DSM-Stamm 682 (bzw. nativ vorhandener *E. coli*), wobei sich der EAHEC-Stamm O104:H4 als widerstandsfähiger erwiesen hat. Für *Escherichia coli* konnte eine Reduktion um fünf log₁₀-Stufen bereits bei 50 °C (+/-2 °C) für achtzehn Stunden und bei 53 °C (+/-2 °C) für vier Stunden erreicht werden (siehe Abbildung 2).

Diese Feststellung steht in Übereinstimmung mit den Aussagen von Paluszak et al. (2003), die dargelegt haben, dass enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) im Vergleich zu *Escherichia coli* im Allgemeinen als sehr resistent gegenüber Stressfaktoren (insbesondere niedriger pH-Werte) gelten und wesentlich widerstandsfähiger gegenüber geringer Feuchtigkeit sind. Dazu im Kontrast stehen die Ergebnisse bei Czajkowska et al. (2008) in denen der, aus Umweltmaterial isolierte, *Escherichia coli*-Stamm längere Überlebenszeiten als der *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) gezeigt hat. Nach Appel et al. (2011) und Beutin et al. (2011) kann der Erregerstamm O104:H4 unter extrem widrigen Umweltbedingungen überleben. So gibt es z.B. Hinweise darauf, dass der Erreger O157:H7 eine hohe Säureresistenz besitzt und bei pH 1,5 überlebt. Schlundt et al. (2004) haben postuliert, dass EHEC in gesäuerten Lebensmitteln bis zu pH 4,4 wachsen können.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Mitscherlich und Marth (1984) überein, die angeben, dass *Salmonella* ssp., nach einer Pasteurisierung von Klärschlamm bei 70 °C für mindestens fünf Minuten, nicht mehr nachweisbar sind. Hoferer (2001) stellte in seinen Versuchen eine etwas schnellere Inaktivierung der Erreger EHEC und *Salmonella* Senftenberg als in den vorliegenden Untersuchungen fest. Er gibt für EHEC in seinen Versuchen im Wasserbad bei 50 °C D-Werte von 1,5 Stunden (reine Suspension) an, im Vergleich zu den Werten aus den Versuchen in der Biogasanlage bei der Kofermentation von Speiseresten mit Schweinegülle bzw. Rindergülle von 0,4 bzw. 0,4 Stunden. In den Versuchen bei 55 °C erhält er im Wasserbad D-Werte von 0,3 Stunden (reine Suspension) und in der Biogasanlage von 0,03 bzw. 0,08 Stunden. In den entsprechenden Untersuchungen für *Salmonella* Senftenberg, gibt er in seinen Versuchen im Wasserbad bei 50 °C D-Werte von 1,7 Stunden und in Rindergülle bzw. Schweinegülle D-Werte von 0,6 bzw. 0,5 Stunden an. Bei 55 °C ergeben sich D-Werte von 0,4 Stunden, im Vergleich zu den Untersuchungen in der Biogasanlage von 0,06 bzw. 0,1 Stunden in Schweinegülle bzw. Rindergülle. In seinen Untersu-

chungen wird deutlich, dass eine wesentlich schnellere Inaktivierung in den Versuchen in der Biogasanlage als in denen im Wasserbad stattfindet. Beim Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen muss berücksichtigt werden, dass Unterschiede im Versuchsaufbau hinsichtlich der verwendeten Substrate, der Temperaturen, der Einwirkungszeit und insbesondere der Versuchsbedingungen (im Wasserbad bzw. in der Biogasanlage) bestehen. Zudem handelt es sich bei Hoferer (2001) um Studien zur Absterbekinetik mit errechneten D-Werten, die sich nur bedingt mit den vorliegenden Untersuchungen, in denen festgelegte Temperatur-Zeit-Kombinationen getestet und Reduktionswerte ermittelt wurden, vergleichen lassen.

In den Versuchen zur Inaktivierung thermoresistenter Parvoviren wurde das bovine Parvovirus (BPV) Stamm Haden verwendet und die Versuche mittels Sandwich-Keimträgern in den Substraten Klärschlamm und Gülle bei 70 °C (+/-2 °C) und 80 °C (+/-2 °C) durchgeführt (siehe Punkt 5.2.2.1).

Die Erhitzungsversuche der thermoresistenten bovinen Parvoviren (BPV) ergaben bei Erhitzung auf 70 °C (+/-2 °C) für eine Stunde mittlere Reduktionswerte des Infektiositätstiters (KID₅₀) im Bereich von 1,8 bzw. 2,1 log₁₀-Stufen im Klärschlamm bzw. der Gülle (Tabelle 21 und Abbildung 4). Nach Erhitzung auf 80 °C (+/-2 °C) für eine Stunde war eine Verminderung des Infektiositätstiters (KID₅₀) um 2,4 bzw. 3,4 log₁₀-Stufen für Klärschlamm bzw. Gülle in den Untersuchungen ersichtlich (Tabelle 22 und Abbildung 4). In den Versuchen zeigte sich eine etwas stärkere Verminderung des Infektiositätstiters (KID₅₀) in der Gülle gegenüber dem Klärschlamm.

Die vorliegenden Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Spillmann et al. (1987), die mittels Sandwich-Keimträger-Versuchen für BPV innerhalb von 30 Minuten bei 70 °C eine Reduktion um 0,72log₁₀-Stufen in Klärschlamm nachweisen konnten. Vergleichbare Ergebnisse nach Erhitzung auf 80 °C mit einer etwas schnelleren Reduktion gibt Hoferer (2001) für Untersuchungen von Bräuninger et al. (1994) an, die eine Reduktion um 4 log₁₀-Stufen innerhalb von 99 Minuten (D-Wert = 23,6 Min.) in Wasser nachweisen und von Srivastava und Lund (1979), die eine Reduktion um ca. 4 log₁₀-Stufen (D-Wert von 16 Minuten) innerhalb einer Stunde in Hank's Medium angeben. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen stellen Monteith et al. (1986) in ihren Versuchen für das BPV keine Inaktivierung während der Erhitzung kontaminierter Rindergülle auf 70 °C für 30 Minuten fest. Eine geringere Reduktion stellen ebenfalls Srivastava und Lund (1979) nach Angaben bei Hoferer (2001) fest, die eine Reduktion um eine log₁₀-Stufe (D-Wert von 72 Minuten) innerhalb von 72 Minuten in Hank's Medium angeben. Beim Vergleich sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um ein Nährmedium handelte und die Methodik nicht ersichtlich ist. Einen schnellere Inaktivierung gibt Hoferer (2001) aus Untersuchungen von Bräuninger et al. (1994) an, die eine Reduktion um 4 log₁₀-Stufen innerhalb von 24 Minuten (D-Wert = 7,5 Minuten) in destilliertem Wasser (Aqua dest.) feststellen. In den Untersuchungen von Hoferer (2001) weist er für das bovine Parvovirus (BPV) bei Erhitzung auf 55 °C im Wasserbad D-Werte von 20,4 Stunden und in den Keimträgern in der Biogasanlage für Schweinegülle D-Werte von 6,1 (Volumenkeimträger) bzw. 5,4 (Sandwichkeimträger) und für Rindergülle von 7,8 (Volumenkeimträger) bzw. 4,6 (Sandwichkeimträger) nach. In den Untersuchungen von Sauerbrei et al. (2009) stellt sich das bovine Parvovirus (BPV) Stamm Haden als sehr resistent gegenüber trockener Hitze dar, nach Erhitzung auf 95 °C für zwei Stunden ist eine Reduktion von circa 1 log₁₀-Stufe feststellbar. Sie postulieren, dass Parvoviren generell gegenüber trockener Hitze eine höhere Resistenz als gegenüber feuchter Hitze aufweisen.

Die Versuche hinsichtlich der Inaktivierung bakterieller (Endo-) Sporen während der Erhitzung wurden mit Sporen des aeroben Sporenbildners *Bacillus globigii* und des anaeroben Sporenbildners *Clostridium sporogenes* bei Temperaturen von 90 °C (+/-2 °C), 98 °C (+/-2 °C), 110 °C und 133 °C in Klärschlamm, Gülle und in der Sporensuspension durchgeführt (siehe Punkt 5.2.2.1).

In den vorliegenden Untersuchungen war bei 90 °C (+/-2 °C) bzw. 98 °C (+/-2 °C) keine bzw. nur eine geringe Reduktion der Konzentrationen um 0,5 log₁₀-Stufen nachweisbar. Demgegenüber lagen die Konzentrationen nach der Behandlung bei 110 °C für 30 Minuten und 133 °C für 20 Minuten unterhalb der Nachweisgrenze und somit sind keine lebenden Erreger mehr nachweisbar (Tabelle 24 und 26). Somit ge-

währleisten die beiden Temperatur- / Zeit-Kombinationen eine Reduktion um ca. neun bzw. sieben \log_{10} -Stufen für *Bacillus globigii* (Tabelle 25 Abbildung 5) bzw. *Clostridium sporogenes* (Tabelle 27 und Abbildung 5).

Die Ergebnisse entsprechen in etwa den Ergebnissen der Untersuchungen von Basaran-Akgul et al. (2013), in denen für die Inaktivierung der Sporen bei Erhitzung auf 115,6 °C bzw. 118,3 °C bzw. 121,1 °C D-Werte von 2,6 bzw. 1,1 bzw. 0,54 Minuten in Phosphatpuffer angegeben werden. Mitscherlich und Marth (1984) geben Absterbezeiten von Sporen von *Bacillus anthracis* unter Verwendung feuchter Hitze bei 90 °C von 15 bis 45 Minuten, bei 95 °C von 10 bis 25 Minuten, bei 100 °C von 2 bis 15 bzw. unter 5 bis 10 Minuten und bei 120 °C im Autoklaven von 10 Minuten an. Für trockene Hitze geben sie bei 140 °C bzw. 150 °C Absterbezeiten von drei bzw. einer Stunde an. Reddy et al. (2013) untersuchten in ihren Versuchen den Einfluss der Kombination von hohem Druck und hoher Temperatur auf die Inaktivierung von Sporen von *Clostridium botulinum* Typ A und Typ B-Stämmen sowie von *Clostridium sporogenes*. Bei der Behandlung bei 700 MPa bei 105 °C für 2, 4 und 6 Minuten erhalten sie D-Werte von 0,5 bis 2,2 Minuten für die unterschiedlichen *C. botulinum*-Stämme und von 1,4 Minuten für *C. sporogenes*. Die D-Werte für *C. sporogenes* bei 600 bzw. 700 bzw. 750 MPa bei 105 °C liegen bei 2,3 bzw. 1,4 bzw. 1,2 Minuten. Es erfolgte aber innerhalb der sechsminütigen Behandlung keine vollständige Inaktivierung ausgehend von Konzentrationen von 7,6 log und eine Reduktion um 5,6 \log_{10} -Stufen. Byun et al. (2011) wiesen in ihren Untersuchungen für *C. sporogenes* D-Werte von 1071,5 bei 90 °C bzw. 110,1 bei 100 °C bzw. 5,2 bei 113 °C bzw. 4,1 bei 115 °C bzw. 1,8 bei 118 °C bzw. 0,9 Minuten bei 121 °C nach. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungen sind nur bedingt mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichbar, da z.T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Versuchsaufbaus bestehen. Dabei bestehen u.a. Unterschiede in Bezug auf einwirkende Temperatur und Druck.

4.1.4.4 Bewertung der Ergebnisse der Lagerungsversuche:

Die Untersuchungen zur Inaktivierung des enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4-Stamms, der monophasischen Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium sowie der Sporen von *Bacillus globigii* während der Langzeitlagerung bei konstanten Temperaturen von 10 °C (+/-2 °C) wurden vergleichend in den Substraten Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten über einen Zeitraum von sechsunddreißig Wochen durchgeführt (siehe Punkt 5.2.2.2).

In den Lagerungsversuchen zur Tenazität der untersuchten Bakterien und Sporen während der Langzeitlagerung von Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten bei 10 °C (+/-2 °C) zeigte sich eine relativ lange Überlebensfähigkeit der Erreger. Aus den Ergebnissen der Versuche mit der enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4 sind gewisse Unterschiede hinsichtlich der Substrate zu erkennen. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich im Klärschlamm eine relativ konstante Reduktion des Erregers um ca. 0,5 \log_{10} -Stufen innerhalb von vier Wochen und eine Reduktion um fünf \log_{10} -Stufen wurde erst nach sechsunddreißig Wochen erreicht. Im Vergleich dazu erfolgte in Gülle bereits innerhalb der ersten vier Wochen eine starke Abnahme um 3,5 \log_{10} -Stufen und bereits nach sechzehn Wochen konnte eine Reduktion um fünf \log_{10} -Stufen nachgewiesen werden. In den Gärprodukten blieben die Konzentrationen zunächst relativ konstant und eine Reduktion von ca. 0,5 \log_{10} -Stufen war in den ersten zwölf Wochen zu beobachten. Eine Reduktion um fünf \log_{10} -Stufen wurde wie im Klärschlamm erst nach sechsunddreißig Wochen Lagerung nachweisbar (siehe Tabelle 28 und 29, sowie Abbildung 6). Für die monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120 konnte eine relativ konstante Reduktion des Erregers in allen drei Substraten über den gesamten Zeitraum der Lagerung festgestellt werden. Im Klärschlamm und in der Gülle war eine Reduktion von fünf \log_{10} -Stufen erst nach sechsunddreißigwöchiger Lagerung nachweisbar, in den Gärprodukten hingegen bereits nach zwanzig Wochen und nach sechsunddreißig Wochen unterhalb der Nachweisgrenze von 3,0 KBE/g (siehe Tabelle 30 und 31, und Abbildung 7). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Konzentrationen für *Bacillus globigii* über die gesamten sechsunddreißig Wochen Lagerung bei 10 °C (+/-2 °C) relativ konstant waren und um maximal 0,5 \log_{10} -Stufen schwankten,

und die Lagerung demnach keine Auswirkungen auf die Reduktion bzw. Inaktivierung der Sporen des aeroben Sporenbildners *Bacillus globigii* hatte (siehe Tabelle 32 und 33).

Tenazitätsstudien für die enteroaggregative hämorrhagische *Escherichia coli* (EAHEC) O104:H4 Serovar zur Langzeitlagerung von Klärschlamm, Gülle und Gärprodukten wurden während der Literaturrecherche nicht gefunden. Vergleichbare Untersuchungen zum Überleben bzw. der Inaktivierung von *Escherichia coli* O157:H7 während der Langzeitlagerung von Klärschlamm und Rindergülle bei 10 °C sind von Avery et al. (2005) durchgeführt worden, deren Ergebnisse etwas kürzeren Überlebenszeiten im Vergleich zu den im Projekt erhaltenen Ergebnissen ergeben haben. Sie stellen ein Überleben der *Escherichia coli* O157:H7 Serovar in organischen Abfällen, u.a. Abwasser, Klärschlamm, Schlachthofabfällen und Rindergülle, über mindestens zwei Monate in 21 der 27 Proben, dabei in sieben von acht der Abwasser- und in drei von fünf Klärschlammproben, fest. Dabei ist die Abnahme in unbehandelten flüssigen Abwässern größer als in behandelten Abwässern. Sie stellen ebenfalls in Gülle eine schnellere Inaktivierung von EHEC fest, mit einer Reduktion um zwei log-Stufen (mittlere T_{99} -Werte) innerhalb von 12 +/- 4 Tagen. Czajkowska et al. (2008) weisen in ihren Untersuchungen ebenfalls Überlebenszeiten für *Escherichia coli* O157:H7 und einen *Escherichia coli*-Stamm aus der Umwelt (bei Ausgangskonzentrationen von 10^8 KBE/ml) im Klärschlamm von 21-28 Tagen bei 24 °C und von 65-78 Tagen bei 6 °C nach. Himathongkham et al. (1999) stellten in ihren Untersuchungen in frischer Gülle und insbesondere in alter Gülle für EHEC O157:H7 (D-Werte von 3,18 bei 37 °C, 14,75 bei 20 °C und 21,51 (38,76) Tagen bei 4 °C) bei niedrigen Temperaturen (4 °C, 20 °C) D-Werte von ca. 15 bis zu 39 Tagen fest. Dies entspricht bei entsprechend hohen Ausgangskonzentrationen einem Überleben der Erreger über mehrere Monate bei niedrigeren Temperaturen. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen stellen Nicholson et al. (2005) etwas kürzere Überlebenszeiten für *Escherichia coli* O157:H7 in Rindergülle und Abwasser von bis zu 3 Monaten bei Temperaturen unter 20 °C fest. Skowron et al. (2013) stellen in ihren Untersuchungen Überlebenszeiten von ca. 75 bis 200 Tagen für *Escherichia coli* in Rindergülle (TS-Gehalt 2, 6 und 14%) während der Lagerung bei 4 °C und 20 °C fest. Die z.T. kürzeren Überlebenszeiten in den Studien im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen sind vorsichtig zu beurteilen. Beim Vergleich der Studien muss berücksichtigt werden, dass Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Erreger, der Herkunft der Substrate sowie des Versuchsaufbaus bestehen. Avery et al. (2005) stellen bereits in ihren Untersuchungen fest, dass sich die Abfälle gleicher Herkunft bezüglich der Persistenz von *Escherichia coli* O157 deutlich unterscheiden. Im Versuchsaufbau liegen die Unterschiede u.a. bei abweichenden Untersuchungsterminen und Lagerungstemperaturen. Insbesondere die Lagerungstemperatur (Himathongkham et al., 1999) und der pH-Wert der Substrate sind wichtige Faktoren in Hinblick auf die Überlebenszeiten von Erregern.

Die festgestellten langen Überlebenszeiten für die monophasische Variante der *Salmonella* Serovar Typhimurium DT120 sind in Übereinstimmung mit Angaben von Mitscherlich und Marth (1984), die ein temperaturabhängiges Überleben von Salmonellen in Klärschlamm von max. 344 Tagen bei 10 - 18 °C und weniger als 10 Tagen bei 30 - 34 °C feststellen. Etwas geringere Überlebenszeiten im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen stellt Haible (1989) in ihren Untersuchungen fest. Sie kann Salmonellen während der Langzeitlagerung von Klärschlamm maximal fünf Monate (ca. 150 Tage) lang nachweisen, und Untersuchungen an halbertechnischen Anlagen ergaben eine Reduktion um sieben Zehnerpotenzen innerhalb der fünf Monate. Nicholson et al. (2005) berichten, dass *Salmonella* ssp. in Rindergülle und Abwasser bei Temperaturen unter 20 °C bis zu drei Monate überleben können. Himathongkham et al. 1999 stellten in ihren Untersuchungen in frischer Gülle, insbesondere in alter Gülle, *Salmonella* Typhimurium (D-Werte von 3,1 bzw. 2,3 bei 37 °C, 14,7 bzw. 12,6 bei 20 °C und 21,5 bzw. 16,4 (65,7) Tagen bei 4 °C). Dies entspricht bei höheren Ausgangskonzentrationen auch einem Überleben über mehrere Wochen bis Monate bei niedrigeren Temperaturen. Philipp et al. (1992) stellten in ihren Untersuchungen bereits Überlebenszeiten in Mischgülle (2/3 Rindergülle + 1/3 Schweinegülle) bei schwankenden Temperaturen von bis zu 106 Tagen für *S. Derby* und *S. Schleißheim* fest (bei Ausgangskonzentrationen von 10^5 bzw. 10^7 KBE/ml). Mitscherlich und Marth (1984) beschreiben ein Überleben von Salmonellen in Gülle von mehr als 77 Tagen, und ein Wachstum in Temperaturbereichen zwischen 6 °C und 47 °C. Niedrigere Überlebenszeiten für *Salmonella*

Typhimurium stellen Mannion et al. (2007) in Schweinegülle fest bei denen ein Überleben von 58 bzw. 24 Tagen im Winter und 34 bzw. 19 Tagen im Sommer bei Ausgangskonzentrationen von 10^5 bzw. 10^2 KbE/ml nachweisbar waren. Skowron et al. (2013) stellen in ihren Untersuchungen Überlebenszeiten von ca. 82 bis 220 Tagen für *S. Dublin* und ca. 75 bis 200 Tagen für *E. coli* in Rindergülle (TS-Gehalt 2, 6 und 14%) während der Lagerung bei 4 °C und 20 °C fest.

Avery et al. (2005) weisen ebenfalls darauf hin, dass die Nachweisbarkeit grundsätzlich sehr starken Schwankungen auch innerhalb eines Substrates der gleichen Herkunft unterworfen ist.

Schlussfolgern lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen sowie Untersuchungen anderer Autoren (Avery et al. (2005); Himathongkham et al. (1999, 2000); Mannion et al. 2007) dass eine Reduktion der Konzentrationen hinsichtlich der Erreger EAHEC und *Salmonella* durch eine Langzeitlagerung gewährleistet werden kann, eine vollständige Inaktivierung pathogener Erreger aber nicht zu garantieren ist. Für eine Reduktion um mehr als fünf \log_{10} -Stufen, wie sie z.B. als Forderung für biotechnologische Behandlungsmöglichkeiten in der Verordnung (EU) 142/2011 (Anonym, 2011) über Hygieneanforderungen für tierische Nebenprodukte, die nicht für den menschlichen Verzehr geeignet sind, gefordert wird, oder einer Inaktivierung eingebrachter Testkeime wie in der Prozessprüfung laut Bioabfallverordnung (BioAbfV, 2012) vorgesehen, sollten entsprechend lange Lagerungszeiten eingehalten und demnach ausreichende Lagerungsmöglichkeiten vorhanden sein. Himathongkham et al. (1999) errechnet für Rindermist bzw. Rindergülle in ihren Untersuchungen temperaturabhängig eine Lagerung für mindestens 105 Tage bei 4 °C oder 45 Tage bei 37 °C und für Geflügelgülle von 6 Wochen bei 20 °C. Grundsätzlich wird die Inaktivierung von mehreren Faktoren beeinflusst, darunter spielen die Ausgangskonzentrationen, die Temperatur, der pH-Wert, der Ammoniakgehalt sowie die Zeit und antagonistische Wirkungen der Begleitflora eine entscheidende Rolle. Die größte Bedeutung dürften hinsichtlich der Langzeitlagerung der Temperatur und der Dauer beigemessen werden.

Auf die Inaktivierung der Sporen des aeroben Sporenbildners *Bacillus globigii* hatte die Lagerung keine Auswirkungen, die Konzentrationen waren über die gesamten 36 Wochen relativ konstant und schwankten um maximal 0,5 \log_{10} -Stufen (siehe Tabelle 32 und 33). Bei den bakteriellen Sporen handelt es sich um sehr umweltresistente Dauerformen, die jahre- bis jahrzehntelang in der Umwelt überleben Mitscherlich und Marth (1984) geben für Sporen von *Bacillus anthracis* in Bodenproben Überlebenszeiten von 9 bis 60 Jahren an. Des Weiteren wird aufgeführt, dass diese Sporen bei Aufbewahrung im Labor bei diffusem Licht 22 Jahre überlebensfähig bleiben. In Gülle konnten sie, nach drei tägiger Sporulation, mindestens 150 Tage bei Temperaturen von 18 °C bzw. 37 °C überdauern und in Kotproben von an Anthrax gestorbenen Schweinen 1 bis 75 Tage bei Temperaturen von 25-30 °C. Für Klärschlamm geben Mitscherlich und Math (1984) Überlebenszeiten der vegetativen Keime von mindestens 35 Tagen bei Raumtemperatur an.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Studien nur bedingt möglich ist, aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen hinsichtlich der Substrate, Temperatur, Lagerungsbedingungen, Ausgangskonzentrationen usw., sowie verschiedener Nachweismethoden.

4.1.4.5 Bewertung der Versuche an der Hochdrucktemperatur-Pelletierungsanlage (HTP-Anlage)

Die Versuche in einer Hochdrucktemperatur-Pelletierungsanlage (HTP-Anlage) zum Einfluss der Hochdrucktemperaturpelletierung auf die Überlebensfähigkeit der Erreger mussten aufgrund arbeitstechnischer sowie arbeitsschutzrechtlicher Gründe anstatt mit Klärschlamm als Substrat mit Holzspänen durchgeführt werden (siehe Punkt 4.2.2.3).

In den Vorversuchen wurde deutlich, dass bereits die Holzspäne sowie deren Trocknung nach Beimpfung inaktivierend auf die Testkeime *Escherichia coli* K12 und *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral wirken, jedoch keinerlei Wirkung auf die Sporen von *Bacillus globigii* hatten. Die Sporen von *Bacillus globigii* waren somit sehr gut geeignet um als biologischer Tracer, sowie als Vertreter sporenbildender Bakterien verwen-

det zu werden. Aus den oben genannten Gründen musste das Beimpfen der Holzspäne vor Ort, möglichst unmittelbar vor Beginn der Pelletierung, erfolgen.

In den Versuchen zeigte sich, dass eine vollständige Inaktivierung bzw. eine Reduktion um 4,5 bzw. 4,7 \log_{10} -Stufen der Bakterien *E. coli* K12 bzw. *S. Zoosalaral* während der Pelletierung erreicht wurde, die Konzentrationen in den unbehandelten beimpften Holzspänen jedoch ebenfalls über die Versuchslaufzeit um 2,8 bzw. 2,2 \log_{10} -Stufen absanken. Hinsichtlich der Sporen von *Bacillus globigii* konnte eine Reduktion um ca. 1,5 \log_{10} -Stufen in den Pellets, 0,7 \log_{10} -Stufen im Staub-Pellet-Gemisch im Vergleich zu den beimpften Holzspänen zu Beginn und am Ende des Versuchs erreicht werden (siehe Tabelle 34 und Abbildung 8). Die Ergebnisse deuten an, dass durch die erzeugten Presskanaldrücke von bis zu 250 MPa (= 2500 bar) sowie die dabei erreichten Temperaturen zwischen 90 °C und 150 °C, eine Inaktivierung von *Salmonella* ssp. und *Escherichia coli*, inklusive des enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4, um 2 bis 3 \log_{10} -Stufen erreicht wurde. Die Konzentration von *Bacillus globigii* war in den Pellets etwas niedriger als im Staub-Pellet-Gemisch. Dies deutet auf eine gewisse Inaktivierung (ca. 0,7 \log_{10} -Stufen) von *Bacillus globigii* während des Pelletierens hin. Weitere Untersuchungen zur Beurteilung dieser weitergehenden Klärschlammbehandlung hinsichtlich der Inaktivierung bakterieller Sporen sind notwendig. In den im Projekt durchgeführten Erhitzungsversuchen zeigten sich die getesteten Clostridien als hitzeresistenter als *Bacillus globigii*, so dass keine Aussage zum Verhalten von Clostridien während des Pelletierens abgeleitet werden kann. Vergleichbare Untersuchungen zur Inaktivierung von Krankheitserregern während des Pelletierens wurden während der Literaturrecherche nicht gefunden.

4.2 Phytohygiene

4.2.1 Einleitung

Widerstandsfähige Schadorganismen von Pflanzen können insbesondere bei der industriellen Verarbeitung landwirtschaftlicher bzw. gartenbaulicher Erzeugnisse vor allem in Wasch- und Sortieranlagen in größeren Mengen anfallen und ins Abwasser gelangen. Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit solcher Organismen sind bisher nur in begrenztem Maße durchgeführt worden. Daher liegen nur für wenige Schadorganismen von Pflanzen bzw. Unkräutern wissenschaftliche Daten vor, wonach diese im Klärschlamm überdauern. Das Verhalten vieler anderer relevanter Schadorganismen muss erst noch untersucht werden. Bei dem derzeitigen Kenntnisstand muss von einem grundsätzlichen Hygienierisiko für die Pflanzengesundheit ausgegangen werden, wenn Klärschlämme auf landwirtschaftlich genutzten Flächen ohne vorherige Hygienisierung ausgebracht werden. Der Forschungsbericht „Anforderungen an die Novellierung der Klärschlammverordnung unter besonderer Berücksichtigung von Hygieneparametern“ (Klages et al., 2009) gibt an, mit welchen Schaderregern der Phyto- und Seuchenhygiene in Klärschlämmen zu rechnen ist. Es wird hervorgehoben, dass Quarantäneschadorganismen (QSO) für die Phytohygiene von besonderer Bedeutung sind, da diese in der Regel nicht durch Pflanzenschutzmaßnahmen eingedämmt werden können.

Die im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Untersuchungen zur Phytohygiene beschränkten sich auf den Erreger des Kartoffelkrebses (*Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) Percival). Dieser pflanzenpathogene Quarantäneschadorganismus ist für seine außerordentliche Überlebensfähigkeit bekannt und kann somit eine Art Referenzstatus für andere persistente phytopathogene Organismen einnehmen.

Der obligat biotrophe Pilz ist einer der bedeutendsten Schadorganismen im Kartoffelanbau (Langerfeld, 1984). Eine Bekämpfung ist derzeit nur über phytosanitäre Maßnahmen möglich (Niepold & Stachewicz, 2004). Die European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) listet ihn als Pathogen, das in Europa in lokal begrenzten Gebieten vorkommt, dessen Einschleppung und Verbreitung in allen Mitgliedsstaaten aber verboten ist (EPPO, 2013). In der Europäischen Union ist *S. endobioticum* als Quarantä-

neschadorganismus in Anhang I A II der Richtlinie 2000/29/EG gelistet. Damit unterliegt *S. endobioticum* amtlichen Kontrollmaßnahmen. Wird der Erreger in einem Kartoffelbestand nachgewiesen, führt das zu einer umfangreichen Reglementierung. So ist der Anbau von Kartoffeln im Befallsgebiet, bis zur Flächenfreigabe durch die dafür zuständige Behörde, untersagt. Auf Grund der von *S. endobioticum* ausgebildeten persistenten Dauersori bleiben nachgewiesene Befallsflächen für Jahrzehnte für den Kartoffelanbau gesperrt. Die Freigabe ehemaliger Befallsflächen ist im EPPO Standard PM 3/59 (2) (OEPP/EPPO, 1999) geregelt. Demnach können Befallsflächen frühestens nach 20 Jahren freigegeben werden. Voraussetzung ist allerdings, dass bei der Bodenuntersuchung keine Dauersori mehr nachgewiesen werden können. Des Weiteren ist ein 300 m breiter Sicherheitsstreifen um die Befallsfläche anzulegen, in dem nur Kartoffelsorten angebaut werden dürfen, die gegen den diagnostizierten Pathotyp resistent sind. Ein nachgewiesener Befall kann für kleinere, auf den Anbau von Kartoffeln spezialisierte Betriebe durchaus existenzbedrohende Auswirkungen haben. Aber auch Großbetriebe, die in der Regel als Zulieferer der kartoffelverarbeitenden Industrie fungieren, haben bei Nachweis eines Befallsherdes mit hohen Einbußen zu rechnen. Laut Richtlinie 69/464/EWG Artikel 2 (2)³ des Rates der Europäischen Union gilt eine Fläche als befallen, wenn mindestens eine Pflanze/Knolle Symptome eines Befalles mit *S. endobioticum* aufweist. Lässt sich die Herkunft befallener Pflanzenteile nicht mehr feststellen, muss die gesamte Partie, in der diese Pflanzenteile gefunden wurden, vernichtet werden (Artikel 3, Richtlinie 69/464/EWG).

Ein Eintrag von *S. endobioticum* in den Prozess der Abwasserreinigung kann nicht ausgeschlossen werden. Der Erreger kann mit Anhangerde an Kartoffeln verbracht werden und über Reinigungs- und Waschprozesse in Resterden und Abwasser gelangen (Steinmöller et al., 2012). Da die Verwertung von Klärschlämmen als Düngemittel in der Landwirtschaft v.a. im Hinblick auf die schwindenden Phosphorreserven angestrebt wird, ist es notwendig die hygienisierende Wirkung von Klärschlammbehandlungsverfahren auf den Quarantäneerreger *S. endobioticum* zu untersuchen. Zu prüfen ist dabei deren Wirkung auf die persistenten Dauersori, die dieser Erreger im Verlauf seiner Entwicklung bildet und mit denen er in der Lage ist, auch ohne Wirt jahrzehntelang im Boden zu überdauern und neue Infektionen hervorzurufen.

4.2.2 Methodvalidierung

Für die Untersuchungen mit *S. endobioticum* standen nur bedingt etablierte, standardisierte Methoden zur Verfügung, da dieser Schadorganismus eher selten Gegenstand von Forschungsvorhaben ist. Im Vorfeld der Untersuchungen mussten folgende Aspekte geklärt werden:

- 1) Welches Material ist für die Kontamination von Klärschlamm geeignet, wenn eine quantitative Ergebnisauswertung angestrebt wird?
- 2) Ist eine möglichst verlustfreie Rückisolierung der Dauersori aus Klärschlamm möglich?
- 3) Wie hat die Bonitur (Bewertung des Zustandes der Dauersori) zu erfolgen?
- 4) Wie kann die Vitalität der Dauersori vor und nach der Behandlung überprüft werden?

4.2.2.1 Das Ausgangsmaterial

Bereitstellung des Trägermaterials (Klärschlamm, Klärschlamm pellets)

Die Bereitstellung des Klärschlammes erfolgte während des gesamten Versuchszeitraumes durch das Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim. Die Untersuchungen wurden mit Klärschläm-

³ Richtlinie 69/464/EWG zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses, Rat der Europäischen Gemeinschaften, Stand 8. Dezember 1969 http://pflanzengesundheit.jki.bund.de/dokumente/upload/06efd_rl1969-464-kons.pdf

men aus den Klärwerken Plieningen-Kemnat (Plie), Mühlhausen bei Stuttgart (MH), Möhringen (MR), und der Universität Stuttgart (Uni) durchgeführt.

Bereitstellung des Erregers

Die Kenntnis über die Erregerkonzentration im zu untersuchenden Medium ist Grundvoraussetzung für quantitative Aussagen zur reduzierenden Wirkung von Behandlungsmethoden. Das Anreichern von Mikroorganismen auf Nährmedien ist eine gängige Methode, um diese in ausreichender Menge und vor allem in bekannter Konzentration für Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Da *S. endobioticum* ein obligat biotropher Erreger ist, konnte diese Methode nicht angewendet werden. Für die Untersuchungen sollten Dauersori als Ausgangsmaterial verwendet werden. Das bedeutete, dass die in den Gewebewucherungen fest eingebundenen Dauersori aus dem Gewebe isoliert werden mussten. Das ist über die Herstellung von sogenanntem Krebskompost möglich.

Dauersori aus verrotteten Krebswucherungen (Krebskompost)

Krebskompost, ein mit Dauersori kontaminierter Quarzsand, wird am Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland (JKI) als Inokulum für die Erzeugung von Gewebewucherungen benötigt und regelmäßig über eine geführte Rotte der Gewebewucherungen hergestellt. Er besitzt eine bekannte Menge an Dauersori, die bestimmt wird, indem eine Isolierung der Dauersori aus 40 g Krebskompost durchgeführt wird. Anschließend werden die Dauersori am Durchlichtmikroskop gezählt, wobei die Konzentration der Dauersori dem Mittelwert aus drei Wiederholungen entspricht. Eine direkte Verwendung des Krebskompostes als Inokulum bzw. als Kontaminationsmaterial für die Untersuchungen mit Klärschlamm sollte also möglich sein. Allerdings wurde auf Grund des Herstellungsverfahrens vermutet, dass ein Teil der Dauersori in nicht vollständig aufgeschlossenen Gewebeteilen gebunden bleibt. Werden Behandlungsverfahren geprüft, bei denen mit einer Zersetzung oder einem anderweitigen Aufschluss organischen Materials zu rechnen ist, werden diese Dauersori freigelegt, was zu einer Ergebnisverfälschung führt. Durch mehrfache Isolierung von Dauersori aus ein und demselben Material konnte diese Annahme bestätigt werden. In Anhang I sind die Einzelheiten des Untersuchungsprotokolls aufgeführt. Für das Zählen der Dauersori wurden 25 µl Sporensuspension auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckgläschen (22 x 22 mm) abgedeckt und am Durchlichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Je Wiederholung und Isolation wurden 10 Zählungen durchgeführt. Über den Mittelwert wurde dann auf die Anzahl Dauersori in 35 ml Sporensuspension geschlossen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 dargestellt und zeigen, dass auch bei der Durchführung einer dritten Isolierung noch Dauersori aus dem Krebskompost herausgelöst werden konnten, wodurch die oben genannte Annahme bestätigt wird. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Anzahl isolierter Dauersori innerhalb der Wiederholungen stark variiert. Das trifft vor allem auf die erste Wiederholung zu. Für eine quantitative Ergebnishebung ist Krebskompost somit nicht geeignet.

Tabelle 35: Anzahl Dauersori in 35 ml Sporensuspension bei nacheinander durchgeführten Isolierungen aus ein und demselben Ausgangsmaterial (40 g Krebskompost)

		1. Wiederholung (40 g Krebskompost)	2. Wiederholung (40 g Krebskompost)	3. Wiederholung (40 g Krebskompost)
Gezählte Dauersori in 35 ml Sporensuspension	1. Isolierung	123.433	61.180	47.880
	2. Isolierung	8.867	14.000	13.300
	3. Isolierung	7.467	5.040	5.600

Isolierte Dauersori

Als Alternative für die Kontamination von Klärschlamm wurde die Verwendung von Dauersori, die aus Krebskompost isoliert wurden und dann in Form einer Sporensuspension vorliegen, geprüft. Die Sporensuspension enthält dann nur frei vorliegende Dauersori und einen verschwindend geringen Anteil an Fremdstoffen, die gut von den Dauersori unterschieden werden können. Dadurch wird es möglich, die Konzentration der Dauersori im Vorfeld der Untersuchungen, durch stichprobenartiges Auszählen der Sporensuspension, zu erfassen. Die Erfahrungen beim Auszählen der Suspension haben jedoch gezeigt, dass die mit der Pipette aufgenommene Menge Dauersori stark variieren kann. Hinzu kommt, dass sich durch das Einpipettieren der Sporensuspension der Wassergehalt des Klärschlammes erhöht, wodurch sich die Wirkung der Behandlungsmethode verändern könnte. Das ist vor allem bei thermischen Behandlungsverfahren von Bedeutung, da Wasser hier als Wärmeüberträger fungiert. Deshalb wurde geprüft, ob es möglich ist, die aus dem Krebskompost isolierten Dauersori ohne Vitalitätsverlust zu trocknen. Durch eine Gewichtsbestimmung wäre es dann möglich, die Dauersori in die zu untersuchenden Klärschlämme einzuwiegen. Abbildung 9 zeigt die möglichen Ausgangsmaterialien.

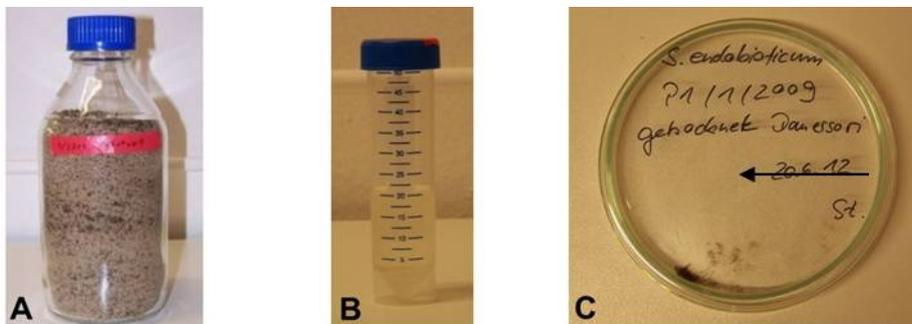


Abbildung 9: mögliche Ausgangsmaterialien für die Untersuchungen mit dem Erreger *Synchytrium endobioticum*,
 (A) Duran-Flasche mit Krebskompost
 (B) Zentrifugenröhrchen mit Dauersori-Suspension
 (C) Glaspetrischale mit aus Krebskompost isolierten und anschließend getrockneten Dauersori

Trocknung der Dauersori

Für die Trocknung der Dauersori wurde die Sporensuspension für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, damit sich die Sori am Boden des Zentrifugenröhrchens absetzen. Anschließend wurde die Flüssigkeitsmenge durch vorsichtiges Abpipettieren auf 5 ml reduziert. Diese 5 ml wurden vollständig in eine Glaspetrischale überführt, über Nacht in einem Trockenschrank bei ca. 40 °C getrocknet. Anschließend wurde überprüft, ob der Trocknungsprozess Auswirkungen auf die Vitalität der Dauersori hatte. Die Vitalitätsprüfung erfolgte nach EPPO Standard PM 3/59 (2) (OEPP/EPPO, 1999) durch visuelle Bonitur am Durchlichtmikroskop und ergab keinen Vitalitätsverlust. Vitalität und Virulenz der Dauersori nach der Trocknung konnten durch einen Biotest bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.2.4.3, Überprüfen der Virulenz rückisolierter Dauersori mittels Pathogenitätstest)

Bestimmung des Gewichtes der Dauersori

Um das Gewicht der getrockneten Dauersori bestimmen zu können, wurde eine Zählreihe durchgeführt. Hierfür wurden getrocknete Dauersori mit einer Impföse auf einen Objektträger gegeben, das Gewicht erfasst und die Dauersori am Mikroskop ausgezählt. Um die Dauersori besser zählen zu können wurden 25 µl Leitungswasser zugegeben (aufpipettiert) und alles mit einem Deckgläschen (22 x 22 mm) abgedeckt. Die so erhobenen Daten dienen als Grundlage für das Ermitteln der Anzahl Dauersori bezogen auf ein Gewicht von 0,01 mg. Die Datenanalyse erfolgte mit der Statistiksoftware JMP 10. Der Auswertung lagen 50 Zählungen zugrunde. Abbildung 10 zeigt, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem eingewogenem

Gewicht und der gezählten Menge an Dauersori besteht. Ein Milligramm getrocknete Dauersori, isoliert aus Krebskompost 2006/2/P1 (Jahr/Charge/Pathotyp), enthält durchschnittlich 5.167 Dauersori, wobei die konkrete Zahl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % im Bereich 4.964 bis 5.370 Dauersori liegt. Das entspricht einer Abweichung von 400 Dauersori. Damit ist das Einwiegen der Dauersori die genaueste Methode, Klärschlämme zu kontaminieren. Durch die Verwendung getrockneter Dauersori sind Einflüsse auf den Erreger sehr gut nachvollziehbar und der Wassergehalt des Klärschlammes wird nicht beeinflusst. Daher wurde diese Art des Inokulums für die Untersuchungen ausgewählt.

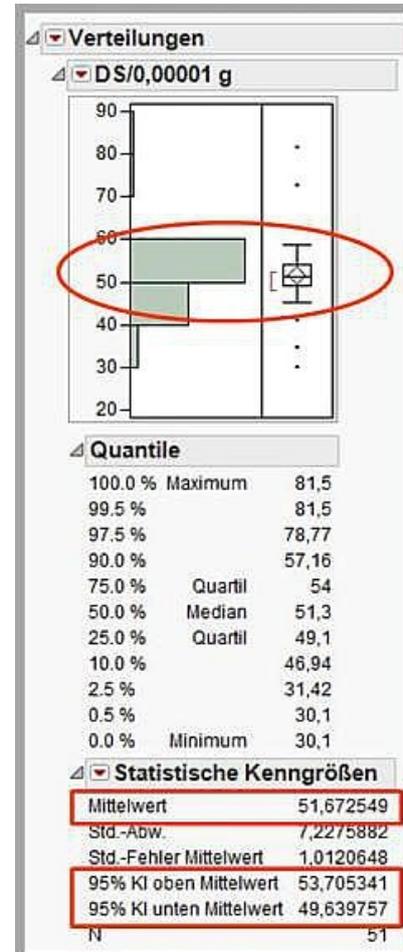


Abbildung 10: Ergebnis der Datenanalyse zur Ermittlung eines Zusammenhanges zwischen dem Gewicht und der Anzahl getrockneter Dauersori isoliert aus 40 g Quarzsandpräparat 2006/2/P1; dargestellt ist die Anzahl Dauersori bei einem Gewicht von 0,00001 g (0,01 mg).

Für die Untersuchungen zur thermischen Behandlung und zur Lagerung von Klärschlamm wurden getrocknete Dauersori aus Krebskompost 2009/1/P1 (Jahr/Charge/Pathotyp) verwendet. Der Krebskompost wird, wie bereits beschrieben, durch das geführte Verrotten frischer Krebswucherungen gewonnen. Es war davon auszugehen, dass die Menge und Größe der darin befindlichen Dauersori stark variiert. Deshalb wurde für diesen Krebskompost ebenfalls eine Zählreihe durchgeführt, bei der ein ähnlich enger Zusammenhang zwischen dem eingewogenen Gewicht getrockneter Dauersori und der Anzahl Dauersori in einem Milligramm festgestellt werden konnte. Allerdings enthielt dieser Krebskompost, mit 8.500 Dauersori (± 700 Dauersori), wesentlich mehr Dauersori als der Krebskompost 2006/2/P1. Das zeigt, dass bei Untersuchungen mit getrockneten Dauersori aus unterschiedlichen Krebskomposten jeweils eine Zählreihe durchgeführt werden muss, um die tatsächlich vorhandene Anzahl Dauersori in einem Milligramm getrockneter Dauersori zu erfassen.

Für die Untersuchungen wäre es eine wesentliche Erleichterung, wenn die Anzahl der im Klärschlamm befindlichen Dauersori nach erfolgter Behandlung, ebenfalls durch Isolieren der Dauersori, Trocknen der so gewonnenen Sporensuspension (Isolat) und Wiegen des getrockneten Isolates, erfolgen könnte. Deshalb wurde diese Methode auf ihre Eignung für die Auswertung der Proben nach erfolgter Klärschlammbehandlung geprüft. Bereits während des Mikroskopierens wurde allerdings deutlich, dass sich im Isolat aus Klär-

schlamm ein wesentlich höherer Anteil an Fremdstoffen befand, als das beim Isolat aus Krebskompost der Fall war. Damit war es nicht möglich, durch Wiegen einen Rückschluss auf die Anzahl der im Isolat befindlichen Dauersori zu ziehen.

Die Rückisolierung der Dauersori

Die Rückisolierung der Dauersori erfolgte während des gesamten Versuchszeitraumes unter Zuhilfenahme einer Siebmaschine der Firma Retsch. Die verwendete Siebkombination umfasste Siebe mit folgenden Maschenweiten: 210 µm, 125 µm, 75 µm, 25 µm und 20 µm, wobei die Dauersori auf dem 25 µm aufgefangen wurden. Durch den Einsatz des 20 µm Siebes konnte ausgeschlossen werden, dass möglicherweise kleinere Dauersori in den Abfluss gelangen.

Für die Rückisolierung der Dauersori stand das in Anhang I aufgeführte Protokoll für eine Nasssiebung zur Verfügung. Nach diesem Protokoll werden üblicherweise Dauersori aus Böden, Erden oder Quarzsand isoliert und es lagen Erfahrungen aus Untersuchungen mit Gärresten vor, wo Dauersori nach diesem Protokoll erfolgreich aus zuvor kontaminierten Gärresten zurückisoliert werden konnten (Schleusner, unveröffentlicht). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass dieses Protokoll auch für die Rückisolierung von Dauersori aus Klärschlamm geeignet ist. Im Rahmen der Autoklavierversuche bei 133 °C konnten allerdings nur ca. 40 % der in den Klärschlamm eingebrachten Dauersori zurückisoliert werden (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Eine Ursache hierfür könnte die Anlagerung von Dauersori an Komponenten im Klärschlamm sein. Um dies zu überprüfen wurden 50 ml Klärschlamm unterschiedlicher Herkunft mit jeweils ca. 1 mg Dauersori kontaminiert und diese nach Lagerung für eine Stunde bei Raumtemperatur zurückisoliert. Die Konzentration der Dauersori in der aufgefangenen Sporensuspension wurde ermittelt, indem 10 Zählungen durchgeführt wurden, wobei jeweils 20 µl Sporensuspension am Durchlichtmikroskop ausgezählt wurden. Durch Verdoppeln der Wassermenge im ersten Schritt des Protokolls für die Rückisolierung (200 ml anstelle von 100 ml), konnten Dauersori aus den Klärschlämmen Möhringen und Plieningen-Kemnat Dauersori verlustfrei zurückisoliert werden (Tabelle 36). Beim Klärschlamm aus Mühlhausen, konnten 82,7 % der Dauersori zurückisoliert werden. Damit verringerte sich der Verlust von ca. 60 % der Dauersori auf ca. 17 %. Eine Rückisolierung der Dauersori aus Klärschlamm der Uni Stuttgart mit tolerierbaren Verlusten, konnte nur durch Verwenden von 400 ml Wasser erreicht werden. Aus dem, im Vergleich zu allen anderen Klärschlämmen, wesentlich dickflüssigeren Klärschlamm, konnten 88,8 % der Dauersori zurückisoliert werden. Für Klärschlamm aus Mühlhausen wurden auch Isolierungsversuche mit 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer unternommen. Bei Verwendung von 200 ml Puffer anstelle von 200 ml Wasser konnten alle in den Klärschlamm eingebrachten Dauersori nach einer Stunde zurückisoliert werden. Aus zeitlichen Gründen und weil ein Verlust von 11,2 % der Dauersori tolerierbar ist, wurde auf eine Verwendung von Puffer für die Rückisolierung verzichtet.

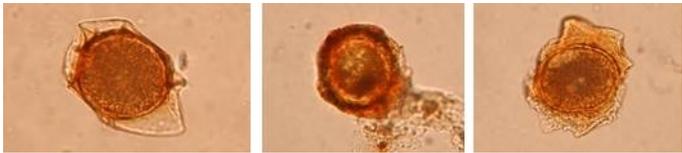
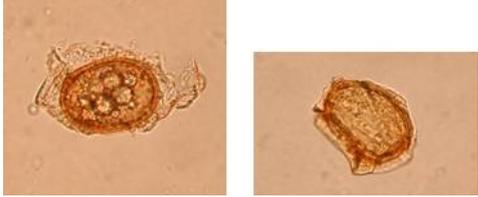
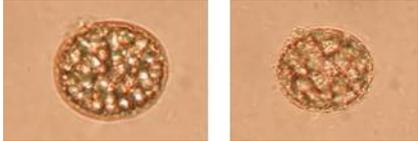
Tabelle 36: Vergleich der Anzahl in Klärschlamm eingebrachter Dauersori mit der Zahl zurückisolierter Dauersori, bei Verwendung von 200 ml Wasser bzw. Kalium-Phosphat-Puffer zur Isolierung; *Isolierung der Dauersori mit 400 ml Wasser

Herkunft des Klärschlammes	Input (Dauersori in 20 µl)	nach 1 Stunde zurückisolierte Dauersori in 20 µl Suspension
Möhringen	9,1	10,3
Plieningen-Kemnat	8,2	9,6
Mühlhausen (Wasser)	9,4	7,8
Mühlhausen (0,1 M K-P-Puffer)	11,0	10,7
Uni Stuttgart*	9,5	8,4

4.2.2.2 Die Durchführung der Bonitur

Die Bonitur der Dauersori erfolgte während des Auszählens der Sporensuspension durch visuelle Beurteilung des Zustandes der Dauersori bei 100facher bis 200facher Vergrößerung am Durchlichtmikroskop. Beim Zählen der Dauersori wurde in volle, teilentleerte und leere Dauersori unterschieden. Die Beurteilung der Vitalität erfolgte nach EPPO Standard PM 3/59 (2) (OEPP/EPPO, 1999). Demnach gelten volle Dauersori, mit grau granuliertem Inhalt und leicht abgerundetem Zytoplasma, als vital. Leere Dauersori bzw. Dauersori mit dauerhafter Plasmolyse gelten als nicht vital. Im Rahmen der Methodvalidierung wurde ein Boniturschema für die Beurteilung des Zustandes der Dauersori erarbeitet (Tabelle 37).

Tabelle 37: Boniturschema für die Beurteilung des Zustandes der Dauersori; Aufnahme bei 200facher Vergrößerung; Größe der Dauersori: 25 – 75 µm; Größe von Gelbrostsporen: 14-30 x 13-23 µm (Fotos: Yvonne Schleusner, JKI)

Zustand der Dauersori	Beispielfotos
volle, vitale Dauersori	
volle, denaturierte Dauersori	
teilentleerte Dauersori	
leere Dauersori	
Gelbrostsporen (Verwechslung möglich)	

Teilentleerte Dauersori müssen als potentiell vital angesehen werden, da die Vitalität optisch nicht eindeutig beurteilt werden kann. Aus den Sori entlassene Zoosporen, sind nur 1-2 Stunden lebensfähig (CBA international, 2014; Curtis, 1921; S. 454;), danach zerfallen sie. Es ist aber unklar, wie lange Zoosporen in der geschützten Umgebung des Sorus lebensfähig bleiben. Darüber sind in der Literatur keine Angaben zu finden. Im Rahmen der Untersuchungen wurden teilentleerte Dauersori als nicht vital gewertet, um erfassen zu können, wie hoch der Anteil eindeutig vitaler Dauersori ist. Eine Herausforderung während der Bonituren, war die Unterscheidung von Gelbrostsporen und Dauersori. Während der Untersuchungen wurden

immer wieder Gelbrostsporen gefunden. Im Gegensatz zu den Dauersori des Erregers *S. endobioticum* besitzen Gelbrostsporen keine dicke, doppelte Chitin-Wand und konnten somit eindeutig unterschieden werden.

4.2.2.3 Vorbereitung der Untersuchungen in der Hochdrucktemperaturpelletieranlage (HTP)

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens waren auch Untersuchungen zur Wirksamkeit der Hochdrucktemperaturpelletierung vorgesehen. Die Untersuchungen sollten an einer Versuchsanlage der Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg durchgeführt werden. Im Vorfeld der Untersuchungen sollte sichergestellt werden, dass sich Dauersori des Erregers *S. endobioticum* aus dem Trägermaterial zurückisolieren lassen. Hierfür wurden 10 g Klärschlamm pellets der Firma Agro Energie Hohenlohe GmbH und CO. KG mit 100 ml Leitungswasser und 1 mg Dauersori in eine Duran-Flasche gegeben und für eine Stunde auf einen Magnetrührer gestellt. Nachdem sich die Pellets aufgelöst hatten, blieb die Duran-Flasche über Nacht bei Raumtemperatur stehen, um abschätzen zu können, ob sich Dauersori bei längerem Kontakt an die Bestandteile der Klärschlamm pellets anlagern. Anschließend wurde die Rückisolierung vorgenommen (Protokoll Anhang I) und die Anzahl rückisolierter Dauersori durch Auszählen von 10 x 25 µl Sporensuspension ermittelt. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Aus den aufgelösten Klärschlamm pellets ließen sich durchschnittlich 60,4 % der ursprünglich zugegebenen Dauersori zurückisolieren.

Aus arbeitsschutzrechtlichen Gründen wurde auf die Verwendung von Klärschlamm als Pelletiermaterial verzichtet. Die Untersuchungen sollten stattdessen mit Holzspänen durchgeführt werden (siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.2.3.). Der Erreger sollte dem Pelletierprozess in Form von eingefärbter Sporensuspension zugeführt werden. Durch das Einfärben der Sporensuspension könnten die mit *S. endobioticum* kontaminierten Holzpellets von den nicht kontaminierten gut unterschieden werden, wodurch sich der anschließend zu untersuchende Stichprobenumfang enorm eingegrenzt lässt. Im Rahmen von Vorversuchen wurde abgesichert, dass die Verwendung von blauen Farbpigmenten zu einer guten Einfärbung der Holzpellets führt (Abbildung 12). Allerdings war es nicht möglich, die Bestimmungen zur Durchführung von Untersuchungen mit Quarantäneschadorganismen einzuhalten, sodass die geplanten Untersuchungen nicht durchgeführt werden konnten.

Wissenschaftliche Arbeiten mit QSO bedürfen der Genehmigung des zuständigen Pflanzenschutzdienstes. Grundvoraussetzung ist, dass die Anlage bzw. die Räume, in denen die Untersuchungen stattfinden, verschließbar sind und während der Arbeiten geschlossen bleiben. Während der Pelletierung kommt es zu einer sehr starken Staubentwicklung, weshalb die Anlage nur mit geöffnetem Tor betrieben werden konnte, um einer Staubexplosion entgegen zu wirken. Es wurde versucht, Teile der Pelletieranlage, aus denen der Erreger austreten kann, mit einem Filterfließ der Maschenweite 20 µm abzuschirmen (Abbildung 11). Damit wäre gewährleistet gewesen, dass der Erreger nicht ins Freiland gelangt und trotzdem ein Luftaustausch stattfinden kann. Die angebrachten Abschirmungen zeigten jedoch keine ausreichende Schutzwirkung. Des Weiteren hätten Teile der Maschine nach erfolgter Pelletierung desinfiziert werden müssen. Durch das Einfärben der Holzspäne war es möglich die Verteilung dieser innerhalb der Maschine nachzuvollziehen. In Abbildung (12) ist deutlich zu sehen, dass eine Desinfektion nicht möglich gewesen wäre, da die Maschine eine Vielzahl unzugänglicher Stellen aufwies (Abbildung 13). Damit konnte eine Genehmigung der Untersuchungen Seitens des Pflanzenschutzdienstes nicht erfolgen.



Abbildung 11: Frontalansicht der Pelletieranlage, die im vorderen Bereich mit einem Käfig (D) versehen ist, um das Austreten von *S. endobioticum* mit den bei der Pelletierung entstehenden Stäuben zu verhindern. Im Käfig befindet sich die Vorrichtung für die Zufuhr der Sporensuspension zum Presskanal und der Matrize, wie auch die Vorrichtungen zum Trennen der Pellets vom nicht pelletierten Material. Des Weiteren zu sehen sind der Trichter (A) über den die Holzspäne für die Pelletierung zugeführt werden, Motor (B), Kanal (C) zum Befeuchten und Vermischen der Holzspäne (Foto: Yvonne Schleusner, JKU)



Abbildung 12: Blau eingefärbte Holzpellets aus dem Vorversuch zu den Untersuchungen in der Hochdrucktemperaturpelletieranlage mit *S. endobioticum* (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)

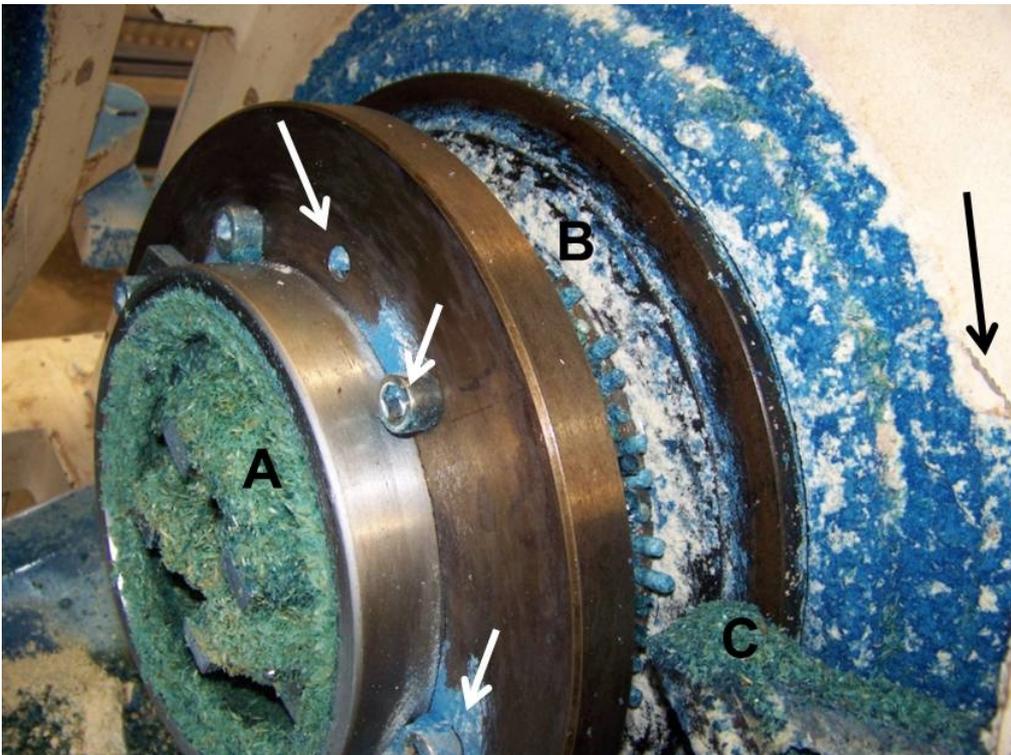


Abbildung 13: Foto des vorderen Teils der Pelletieranlage nach erfolgter Pelletierung blau eingefärbter Holzspäne. Abgebildet sind der Presskanal (A), die Matrize (B) und die Vorrichtung zum Abtrennen der Pellets von der Matrize (C) der Pelletieranlage. Die Pfeile markieren unzugängliche Stellen, die eine Desinfektion der Maschine unmöglich machen; (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)

4.2.2.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden standardisierte Methoden für die Versuchsdurchführung erarbeitet. Eine besondere Herausforderung war die Bereitstellung des Erregers *S. endobioticum*. Der Erreger sollte in einer Form vorliegen, die eine quantitative Ergebnisauswertung zulässt. Dabei wurde nachgewiesen, dass hierfür aus Krebskompost isolierte und anschließend getrocknete Dauersori am besten geeignet sind. Es konnte ein enger Zusammenhang zwischen dem eingewogenen Gewicht getrockneter Dauersori und Anzahl Dauersori nachgewiesen werden. Dadurch war es möglich, Dauersori in die Klärschlämme einzuwiegen. Durch Anpassen des Protokolls für die Isolierung der Dauersori aus Klärschlamm, konnte ein nahezu verlustfreies Zurückisolieren der in den Klärschlamm eingebrachten Dauersori gewährleistet werden. Allerdings war es, nach dem Rückisolieren der Dauersori aus Klärschlamm, nicht möglich, vom Gewicht des getrockneten Isolates auf die Anzahl der darin befindlichen Dauersori zu schließen, weil neben den Dauersori zu viele Fremdstoffe enthalten waren. Die Beurteilung der Wirkung der Klärschlammbehandlungsmethoden erfolgte daher durch Auszählen der Sporensuspension. Für die Beurteilung der Vitalität der Dauersori wurde ein Boniturschema erarbeitet. Durch einen Pathogenitätstest konnte die Vitalität der Dauersori zu Versuchsbeginn nachgewiesen werden. Die Untersuchungen mit *S. endobioticum* an einer Anlage zur Hochdrucktemperaturpelletierung mussten leider entfallen, da es an der Versuchsanlage Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg nicht möglich war, die Sicherheitsbestimmungen zum Arbeiten mit Quarantäneschadorganismen einzuhalten.

4.2.3 Material und Methoden

4.2.3.1 Thermische Behandlung

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine thermische Behandlung von Klärschlämmen auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum* hat. Dafür wurden aus Krebskompost 2009/1/P1 isolierte und getrocknete Dauersori verwendet. Die Autoklavierversuche wurden sowohl mit Wasser, als auch mit Klärschlämmen aus den Klärwerken in Mühlhausen und der Uni Stuttgart durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden je Temperaturvariante 5 Duranflaschen mit jeweils 50 ml Klärschlamm und ca. 1 mg Dauersori befüllt. Zwei Duranflaschen dienten als Kontrolle und wurden bis zur Rückisolierung der Dauersori (zwei Tage nach Kontamination) bei Raumtemperatur gelagert. Die übrigen drei Duranflaschen wurden zum Autoklavieren an die Uni Hohenheim geschickt. Um mögliche Abbauprozesse zu stoppen, erfolgte der Transport jeweils gekühlt. Zusätzlich zur thermischen Behandlung wurde untersucht, ob eine Lagerung der behandelten Klärschlämme einen Einfluss auf die Vitalität der Dauersori hatte. Hierfür wurden die thermisch behandelten Klärschlämme und die unbehandelten Kontrollen 6 Monate dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Tabelle 38 zeigt den generellen Versuchsaufbau. Dem Versuchsaufbau ist zu entnehmen, dass in der Regel mit drei parallelen Proben gearbeitet wurde.

Die Rückisolierung der Dauersori wurde am JKI durchgeführt und erfolgte für die Proben der Kontrolle und die behandelten Proben zeitgleich per Nasssiebung. Dabei wurde die erste Wiederholung laut Protokoll durchgeführt (siehe Anhang I). Für die zweite Wiederholung wurden anstelle von 100 ml Wasser im ersten Schritt des Protokolls, 200 ml Wasser verwendet, um Verlusten durch Anlagerung von Dauersori an Komponenten des Klärschlammes entgegen zu wirken (siehe Abschnitt 4.2.2.1, Rückisolierung der Dauersori). In den Behandlungsvarianten traten diese Verluste nicht auf. Die aufgefangene Sporensuspension wurde bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 38: Versuchsaufbau der Autoklavierversuche

Temperatur	Zeit	Druck	Lagerung	Medium	Probenumfang	Wiederholungen
133 °C	20 min	3 bar	keine	Klärschlamm aus Mühlhausen	3 parallele Proben	2
140 °C	2 h	4 bar	keine	Klärschlamm aus Mühlhausen und der Uni Stuttgart	3 parallele Proben	2
				Wasser	4 Parallele Proben	1
133 °C	20 min	3 bar	6 Monate	Klärschlamm aus Mühlhausen	3 parallele Proben	1
140 °C	2 h	4 bar	6 Monate	Klärschlamm aus Mühlhausen	3 parallele Proben	2

Die Konzentration der Dauersori in der Sporensuspension wurde durch Auszählen von 10 x 20 µl Sporensuspension ermittelt. Die Zählung wurde an einem Durchlichtmikroskop bei 100facher bis 200facher Vergrößerung vorgenommen. Während des Zählens wurde auch der Zustand der Dauersori beurteilt. Dabei wurde in volle, teilentleerte und leere Dauersori unterschieden. Des Weiteren wurde erfasst, ob Dauersori geplatzt waren oder der Inhalt denaturiert, wobei unter Denaturierung eine deutliche Abweichung von der normalerweise gleichmäßigen, gräulichen Granulierung zu verstehen ist. Laut EPPO Standard PM 3/59 (2) (OEPP/EPPO, 1999) sind unversehrte, vollständig gefüllte, gräulich granuliert Dauersori als vital einzustufen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden solche Dauersori und Dauersori, die nur leicht davon abweichen als vital eingestuft. Die Virulenz der rückisolierten Dauersori wurde durch einen Pathogenitätstest überprüft (siehe Abschnitt 4.2.2.3, Durchführung der Bonitur).

4.2.3.2 Lagerung von Klärschlamm

Untersuchungen zum Einfluss einer Lagerung auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum*, wurden sowohl als reine Lagerungsversuche, als auch als Lagerung nach erfolgter thermischer Behandlung durchgeführt. Dabei wurden die thermisch behandelten Klärschlämme für sechs Monate gelagert.

Die reinen Lagerungsversuche wurden mit Klärschlämmen aus den Klärwerken Mühlhausen bei Stuttgart, Möhringen, Plieningen-Kemnat sowie der Uni Stuttgart durchgeführt. Da sich diese Klärschlämme in ihrer Zusammensetzung und z.T. bei der hydraulischen Verweilzeit unterscheiden, wurde vermutet, dass es zu unterschiedlichen Einflüssen während der Lagerung kommt. Untersucht wurden Lagerungszeiten von einem Tag, drei Tagen, sieben Tagen, vier Wochen, zwölf Wochen und fünf Monaten. Für die Untersuchungen wurden Duranflaschen mit 50 ml des jeweiligen Klärschlammes befüllt und ca. 1 mg Dauersori eingewogen. Die Klärschlämme wurden bis zur Rückisolierung dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lagerungszeiten 1 - 7 Tage wurden mit zwei Wiederholungen und die Lagerungszeiten 4 Wochen bis 5 Monate in drei Wiederholungen geprüft. Die Wiederholungen wurden im Abstand von einer Woche angesetzt. Als Kontrolle zum Einfluss der Klärschlämme wurden Dauersori in Wasser gelagert. Hierfür wurden 2 parallele Proben angesetzt, denen nach entsprechender Lagerungszeit eine Teilproben entnommen wurden (8 x 20 µl Sporensuspension), um die darin befindlichen Dauersori zu zählen und deren Zustand zu bewerten. Die restliche Suspension wurde einer weiteren Lagerung ausgesetzt, sodass ein und dieselben Proben immer wieder bewertet wurden. Diese Vorgehensweise war für die Bewertung des Einflusses der Klär-

schlämme nicht möglich. Hier wurden für jeden Versuchsansatz Einzelproben angesetzt, die nach erfolgter Lagerung vollständig ausgewertet wurden.

4.2.3.3 Überprüfung der Pathogenität

Die Pathogenität der Dauersori wurde sowohl vor Versuchsbeginn, sowie nach erfolgter Behandlung geprüft. Der Tube-Test nach Potoček (Abbildung 14) ist die z.Z. zuverlässigste Methode dafür (Protokoll im Anhang II), da hier optimale Infektionsbedingungen herrschen. Der Test wird mit einer für *S. endobioticum* anfälligen Kartoffelsorte durchgeführt. Zu Beginn des Testes werden alle Kartoffeltriebe entfernt und müssen erst wieder nachwachsen. Damit hat der Erreger genug Zeit zum Keimen und findet, wenn die Zoosporen entlassen wurden, junge Triebe für die Infektion. Durch das Kompost-Quarzsandgemisch kann sowohl eine optimale Feuchtigkeit aber auch eine gute Belüftung gewährleistet werden. Der Tube-Test wird erst 12 Wochen nach Infektion ausgewertet. In dieser Zeit werden die Kartoffeltriebe regelmäßig zurückgeschnitten, um die Triebbildung an der Basis zu fördern. Damit stehen dann wieder junge Triebe für die Infektion zur Verfügung. Die Bonitur erfolgt anhand des von Stachewicz in Bartels und Backhaus (2000) veröffentlichten Boniturschlüssels, der in Tabelle 39 abgebildet ist. In Abbildung 15 ist die Symptomausprägung entsprechend der Boniturnoten beispielhaft abgebildet.



Abbildung 14: Kartoffeln im Tuben-Test zur Überprüfung der Vitalität bzw. Virulenz der Dauersori. Die Kartoffeln sind über ein schwarzes Gummiband fest an den Tuben fixiert. Die Tuben (weiße, leicht konisch zulaufende Plastik-Zylinder) sind mit einem Gemisch aus gedämpfter Komposterde und Krebskompost befüllt. (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)

Tabelle 39: Boniturschlüssel nach Stachewicz (Bartels und Backhaus, 2000) unter Angabe der Boniturnote und Symptomausprägung

Boniturnote	Symptome am Kartoffeltrieb
0	<ul style="list-style-type: none"> keine Symptome
1	<ul style="list-style-type: none"> dunkelbraune Schuppen längs über den infizierten Keim/Trieb verteilt keine Sorusbildung erkennbar
2	<ul style="list-style-type: none"> Nekrosen größer als bei Boniturnote 1 einzelne helle, nichtausgereifte oder dunkelbraune, vorzeitig nekrotisierte Sori sind möglich
3	<ul style="list-style-type: none"> Einzelsori oder kleinere Sorusfelder sind von nekrotisierten Epidermiszellen umgeben Sori und Wirtszellen sind nur zum Teil abgestorben im überwiegenden Bereich der Infektionsstellen sind Abwehrenekrosen vorhanden, die jedoch nicht in jedem Falle der Reifung von Einzelsori und Sorusfeldern zuvorkommen bis zu 5 teilweise oder nicht nekrotisierte Sori pro Trieb können toleriert werden
4	<ul style="list-style-type: none"> reife, nicht nekrotisierte Sori und Sorusfelder überwiegen Nekrosen (auch am gleichen Trieb) können reichlich vorhanden sein vereinzelt sind auch Wucherungen möglich
5	<ul style="list-style-type: none"> nicht nekrotisierte Infektionsfelder und Wucherungen überwiegen dicht nebeneinanderliegende Sommer- oder Dauersori ohne Wucherungsbildung sind möglich vereinzelt können sehr späte Nekrosen vorkommen

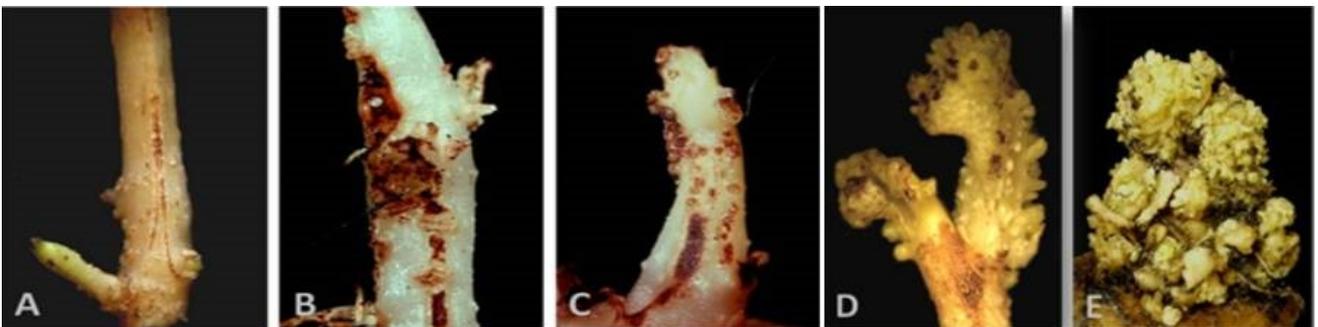


Abbildung 15: Bewertung der Reaktion von Kartoffelsorten oder -genotypen auf den Erreger *S. endobioticum* an Hand der Symptome am Kartoffeltrieb (Fotos: Dr. K. Flath, JKI, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland);
A = Boniturnote 1, B = Boniturnote 2, C = Boniturnote 3, D = Boniturnote 4, E = Boniturnote 5

4.2.4 Ergebnisse und Diskussion

4.2.4.1 Untersuchungen zum Einfluss von Temperatur und Druck auf den Erreger *Synchytrium endobioticum*

Die Untersuchungen zur thermischen Behandlung von Klärschlamm sind mit dem Ziel durchgeführt worden, die Wirkung dieser Behandlungsart auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum* zu beleuchten. Die Bewertung des Einflusses einer thermischen Behandlung von Klärschlamm erfolgt im Weiteren durch Betrachten des prozentualen Anteils zurückisolierter bzw. vitaler Dauersori.

Thermische Behandlung bei 133 °C

Die thermische Behandlung bei 133 °C für 20 Minuten und einem Druck von 3 bar wurde ausschließlich mit Klärschlamm aus Mühlhausen durchgeführt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dargestellt. Ein Vergleich beider Wiederholungen zeigt, dass durch Anpassen des Protokolls in der zweiten Wiederholung (siehe auch Abschnitt 4.2.3.1) hohe Verluste bei der Rückisolierung der Dauersori vermieden werden konnten. In der Kontrolle der ersten Wiederholung konnten 42,3 % der zu Versuchsbeginn in den Klärschlamm eingebrachten Dauersori zurückisoliert werden. Davon waren 23,4 % vital. Demgegenüber konnten in der Kontrolle der zweiten Wiederholung durchschnittlich 79,3 % zurückisoliert werden, wovon 64,9 % vital nachgewiesen werden konnten.

Die Beurteilung des Effektes der thermischen Behandlung wird nur anhand der zweiten Wiederholung vorgenommen, da nur hier die Rückisolierung nach dem angepassten Protokoll erfolgte. Es ist deutlich zu sehen, dass die thermische Behandlung bei 133 °C weder zu einer nennenswerten Erregerreduktion, noch zu einem vollständigen Vitalitätsverlust der Dauersori führte. Nach erfolgter thermischer Behandlung konnten durchschnittlich 40,9 % der ursprünglich eingebrachten Menge an Dauersori vital nachgewiesen werden. Damit reduzierte sich der Anteil vitaler Dauersori im Vergleich zur Kontrolle nur um 24,0 %.

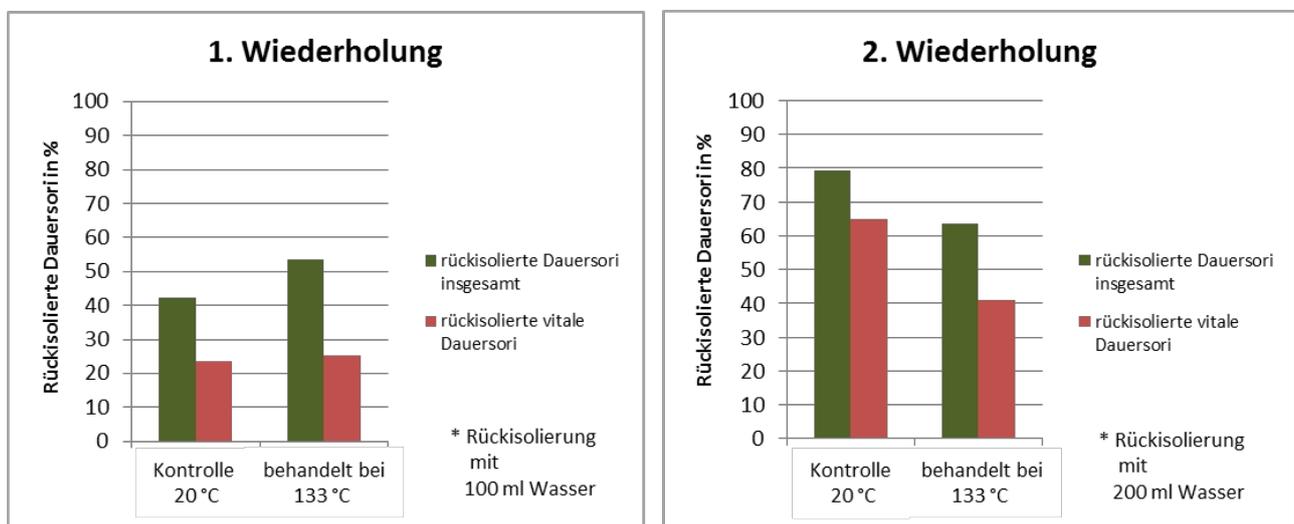


Abbildung 16: Einfluss einer thermischen Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen bei 133 °C und einem Druck von 3 bar für 20 Minuten auf Dauersori des Erregers *Synchytrium endobioticum*, dargestellt ist der Anteil zurückisolierter Dauersori in Prozent für beide Wiederholungen, je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Thermische Behandlung bei 140 °C

Untersuchungen zum Einfluss einer thermischen Behandlung bei 140 °C wurden sowohl mit Klärschlamm aus Mühlhausen, Klärschlamm der Uni Stuttgart, als auch mit Wasser durchgeführt. Um im Autoklaven eine Temperatur von 140 °C erreichen zu können, musste ein Druck von ca. 4 bar aufgebaut werden. Die Be-

handlungsdauer betrug zwei Stunden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt im Folgenden getrennt für die Behandlung von Wasser, Klärschlamm aus Mühlhausen und Klärschlamm der Uni Stuttgart.

Untersuchungen mit Wasser

Die Wasservariante diente als Kontrolle zum Klärschlamm und sollte Einflüsse aufdecken, die ausschließlich auf die Wirkung der Klärschlämme zurückzuführen sind. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Wasservariante sind in Abbildung 17 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine thermische Behandlung bei 140 °C kaum eine Wirkung auf die Vitalität der Dauersori hatte (Abbildung 18, rechts). In der Kontrolle konnten durchschnittlich 91,7 % der eingebrachten Dauersori zurückisoliert werden. Davon waren durchschnittlich 78,5 % vital. Nach erfolgter thermischer Behandlung konnten noch 70,9 % vital nachgewiesen werden. Damit reduzierte sich der Anteil vitaler Dauersori lediglich um 7,6 %.

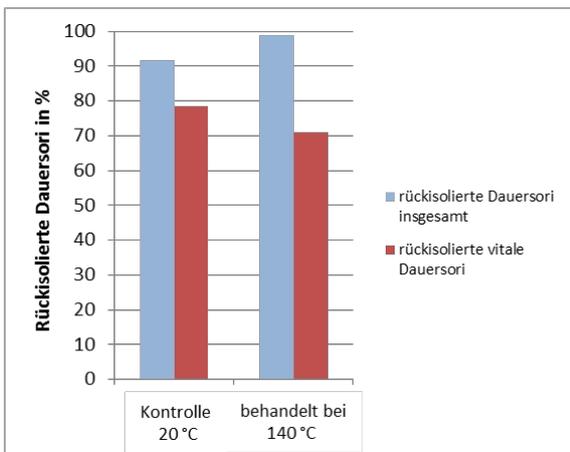


Abbildung 17: Einfluss einer thermischen Behandlung von Wasser 140 °C für 2 Stunden und einem Druck von 4 bar auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum*; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent

Untersuchungen mit Klärschlamm aus Mühlhausen

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der ersten und zweiten Wiederholung einer thermischen Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen bei 140 °C dargestellt. Wie schon in der 133 °C-Behandlung, erfolgte auch hier die Rückisolierung der Dauersori in der zweiten Wiederholung nach dem angepassten Protokoll. Das erklärt die unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Wiederholungen. Der Anteil insgesamt zurückisolierter Dauersori ist mit 81,2 % in der ersten Wiederholung und 79,3 % in der zweiten Wiederholung zwar etwa gleich hoch, der Anteil vitaler Dauersori unterscheidet sich allerdings deutlich. So konnten in der Kontrolle der ersten Wiederholung lediglich 28,8 % vitale Dauersori nachgewiesen werden. Demgegenüber waren in der zweiten Wiederholung 64,9 % der rückisolierten Dauersori vital.

Die Beurteilung des Effektes der thermischen Behandlung wird auch hier nur anhand der zweiten Wiederholung vorgenommen, da nur hier die Rückisolierung nach dem angepassten Protokoll erfolgte. In der Kontrolle der zweiten Wiederholung waren 64,9 % der Dauersori vital. Nach erfolgter thermischer Behandlung waren 33,1 % der zurückisolierten Dauersori vital. Der Anteil vitaler Dauersori wurde durch die thermische Behandlung um 31,8 % reduziert.

Untersuchungen mit Klärschlamm der Uni Stuttgart

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen mit Klärschlamm der Uni Stuttgart sind in Abbildung 19 dargestellt. Die Anzahl insgesamt zurückisolierter Dauersori ist in beiden Wiederholungen etwa gleich groß. Auch die Anzahl vitaler Dauersori unterscheidet sich kaum voneinander.

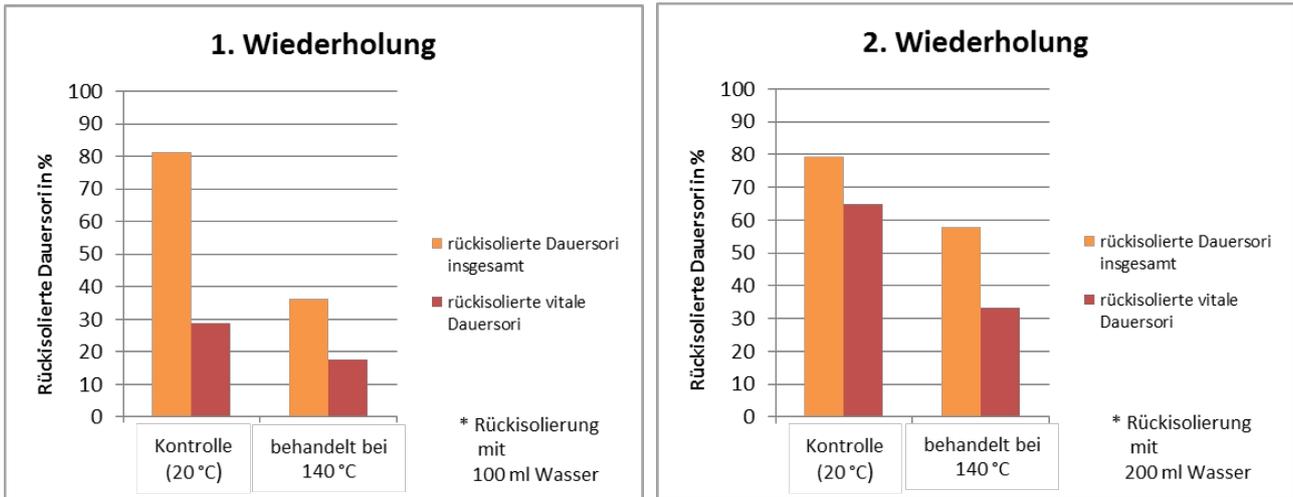


Abbildung 18: Einfluss einer thermischen Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen bei 140 °C und einem Druck von 4 bar für 2 Stunden auf Dauersori des Erregers *Synchytrium endobioticum*; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent für beide Wiederholungen, je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

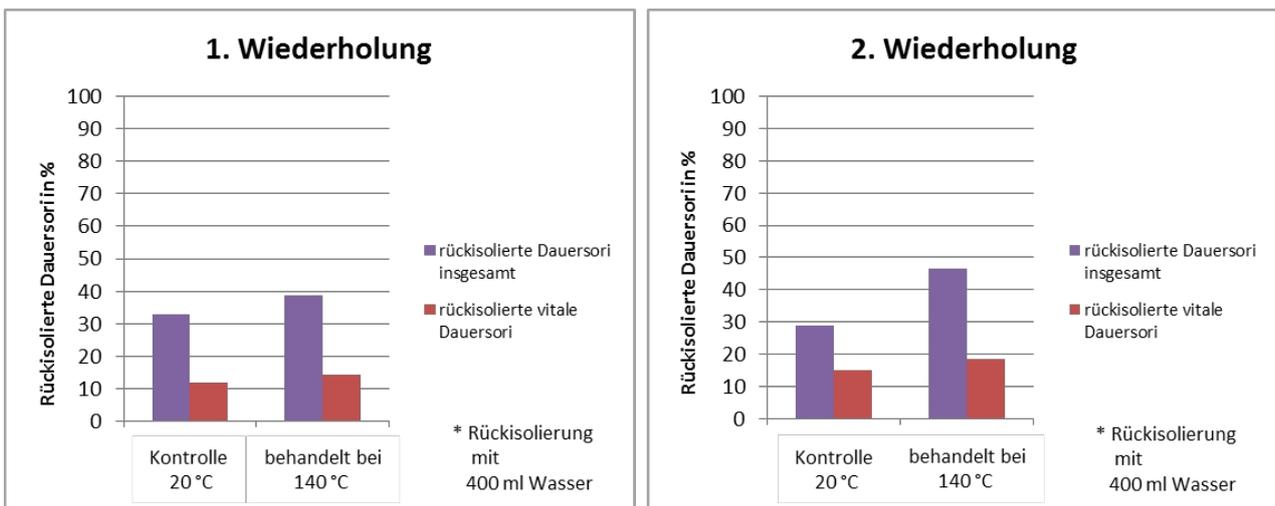


Abbildung 19: Einfluss einer thermischen Behandlung von Klärschlamm der Uni Stuttgart bei 140 °C und einem Druck von 4 bar für 2 Stunden auf Dauersori des Erregers *Synchytrium endobioticum*; dargestellt ist der Anteil rückisolierter Dauersori in Prozent für beide Wiederholungen, je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Auffällig ist jedoch die geringe Menge insgesamt zurückisolierter Dauersori in den Kontrollen, die in beiden Wiederholungen jeweils unter den Werten der zurückisolierten Dauersori aus den thermisch behandelten Proben lag. So konnten aus den Proben der Kontrolle der ersten Wiederholung durchschnittlich 32,9 % der eingebrachten Dauersori zurückisoliert, während aus den thermisch behandelten Proben 38,5 % und somit 5,6 % mehr Dauersori zurückisoliert werden konnten. In der zweiten Wiederholung konnten aus den Proben der Kontrolle durchschnittlich 28,8 % der ursprünglich eingebrachten Menge an Dauersori zurückisoliert werden, aus den thermisch behandelten Proben aber durchschnittlich 46,6 % und somit 17,8 % mehr Dauersori als in der Kontrolle.

Diese Ergebnisse lassen sich nur schwer interpretieren. Möglicherweise haben Komponenten im Klärschlamm (Mikroflora, Schwermetalle) einen Einfluss auf die Dauersori und es kommt zu einer tatsächlichen Erregerreduktion. Da die Klärschlammproben für die thermische Behandlung von Kleinmachnow nach Hohenheim transportiert werden mussten, waren die darin befindlichen Dauersori der Mikroflora des Klärschlammes für mindestens 24 Stunden ausgesetzt. Der Transport erfolgte zwar gekühlt, um die mikrobielle

Aktivität des Klärschlammes auf ein Minimum zu begrenzen, ein mikrobieller Aufschluss kann aber nicht ausgeschlossen werden. Demgegenüber wurden die Proben der Kontrolle bis zur Rückisolierung dunkel, bei Raumtemperatur, also nicht gekühlt gelagert. Diese Proben waren der Aktivität der Mikroflora, die nicht durch eine Kühlung eingeschränkt wurde, mindestens 48 Stunden lang ausgesetzt. Eine andere Erklärung könnte die Anlagerung von Dauersori an Komponenten im Klärschlamm sein, die sich erst nach einem längeren Zeitraum aufbaut, denn die in den Klärschlamm eingebrachten Dauersori ließen nach nur einer Stunde Einwirkzeit/Verweildauer nahezu verlustfrei zurückisolieren, wie die Untersuchungen zur Methodenvalidierung gezeigt haben (siehe Abschnitt 4.2.2.1; Rückisolierung der Dauersori).

Da nicht eindeutig bestimmt werden kann, ob sich die geringe Anzahl zurückisolierter Dauersori auf eine Erregerreduktion zurückzuführen lässt, oder ob es sich um eine Anlagerung von Dauersori an Komponenten im Klärschlamm handelt, ist eine Beurteilung der Wirkung der thermischen Behandlung bei 140 °C für den Klärschlamm der Uni Stuttgart nicht möglich.

Vergleich der Behandlung bei 133 °C mit der Behandlung bei 140 °C

Dieser Vergleich ist nur für die Untersuchungen mit Klärschlamm aus Mühlhausen möglich, da nur diese Klärschlammart in beiden Temperaturvarianten geprüft wurde. Um die Wirkung einer thermischen Behandlung bei unterschiedlichen Temperaturen einschätzen zu können, wird die Anzahl zurückisolierter **vitaler** Dauersori beider Behandlungsvarianten miteinander verglichen (Abbildung 20). Dieser Vergleich zeigt, dass in beiden Behandlungsvarianten der Anteil vitaler Dauersori in der ersten Wiederholung geringer als in der Zweiten. Interessant ist, dass die höhere Behandlungstemperatur, die mit einer Erhöhung des Druckes um 1 bar verbunden ist, in beiden Wiederholungen zu einem geringeren Anteil vitaler Dauersori führt, wobei der erzielte Effekt gleich groß und somit reproduzierbar war. So konnten in der ersten Wiederholung der 133 °C-Behandlung 25,2 % vitale Dauersori nachgewiesen werden, nach thermischer Behandlung bei 140 °C waren es 17,6 %. Damit reduzierte sich der Anteil vitaler Dauersori durch die Behandlung bei 140 °C um 7,6 %. Dieses Ergebnis ließ sich mit der zweiten Wiederholung reproduzieren. Hier lag der Anteil vitaler Dauersori nach der Behandlung bei 133 °C bei 40,9 % während in der 140 °C-Variante 33,1 % vitale Dauersori nachgewiesen werden konnten. Damit reduzierte sich der Anteil vitaler Dauersori hier um 7,8 %.

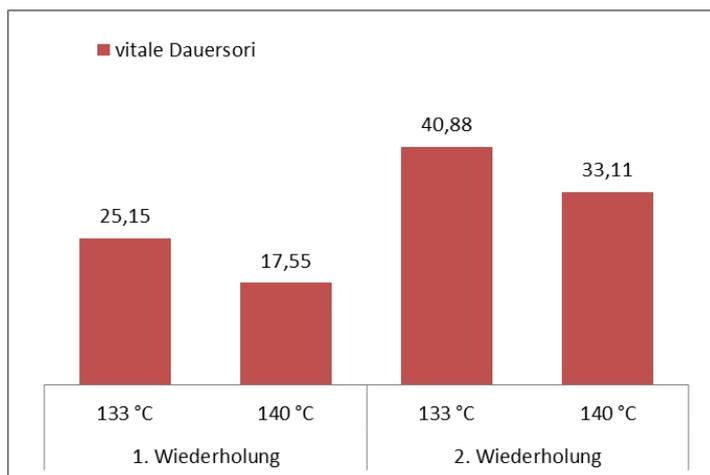


Abbildung 20: Vergleich des Anteils rückisolierter vitaler Dauersori des Erregers *Synchytrium endobioticum* aus Klärschlamm aus Mühlhausen nach einer thermischen Behandlung bei 133 °C bzw. bei 140 °C

Kombination von thermischer Behandlung und Lagerung für 6 Monate

Die bisher vorgestellten Untersuchungen zeigten, dass der Einfluss der thermischen Behandlung auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum* eher gering war. In Abbildung 21 werden die Ergebnisse einer Kombina-

tionsbehandlung aus thermischer Behandlung bei 133 °C bzw. 140 °C und einer nachgeschalteten sechsmonatigen Lagerung von Klärschlamm aus Mühlhausen im Vergleich zur nicht thermisch behandelten Kontrolle gezeigt. Die sechsmonatige Lagerung führte in beiden Temperaturvarianten zu einer weiteren Reduktion vitaler Dauersori, nicht jedoch zu einer vollständigen Inaktivierung.

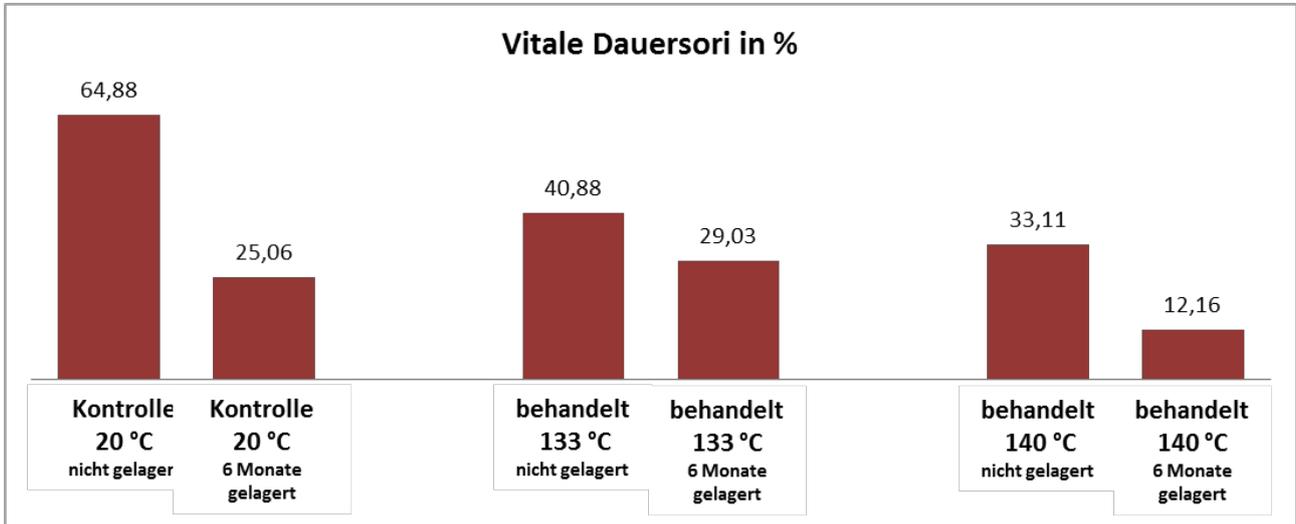


Abbildung 21: Rückisolierungsrate vitaler Dauersori des Erregers *S. endobioticum* aus unbehandeltem und bei 133 °C bzw. 140 °C behandeltem Klärschlamm aus Mühlhausen im Vergleich zu unbehandeltem bzw. bei 133 °C behandeltem Klärschlamm, der für 6 Monate gelagert wurde

Hochtemperaturpelletierung

Die Untersuchungen zur thermischen Behandlungen im Autoklaven waren auch als Vorversuche zu den Untersuchungen in einer Hochdrucktemperaturpelletieranlage (HTP) gedacht. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Drücke von 3 bzw. 4 bar keinen entscheidenden Einfluss auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum* hatten. Für die Untersuchungen in der HTP wurde eine Pelletpresse RMP 250 der Firma Münch mit einer Ringmatrize 6x39 mit einem Pressverhältnis von 1:6,5 (zylindrische Presskanäle) verwendet. Bei dieser Matrize entstehen nach Angaben der Hochschule für Forstwirtschaft in Rottenburg Presskanaldrücke bis zu ca. 250 MPa (=2500 bar) und Temperaturen von 90 °C bis 180 °C. Leider war es nicht möglich die notwendigen Sicherheitsvorschriften zum Arbeiten mit Quarantäneschadorganismen am Standort der Anlage einzuhalten, weshalb die Untersuchungen mit *S. endobioticum* nicht durchgeführt werden konnten. Anhand der Ergebnisse der Uni Hohenheim kann dennoch eine Wirkung abgeleitet werden. Endosporen von *Bacillus globigii* sind ähnlich beständig, wie die Dauersori von *S. endobioticum*. Da *Bacillus globigii* nach der Pelletierung vital nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.3.6), kann davon ausgegangen werden, dass auch *S. endobioticum* die Pelletierung überdauert hätte.

Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass in allen geprüften Varianten vitale Dauersori nachweisbar waren. Damit ist weder eine Behandlung bei 133 °C für zwanzig Minuten, noch eine Behandlung bei 140 °C für zwei Stunden für eine Hygienisierung von Klärschlämmen, die mit Dauersori des Erregers *S. endobioticum* kontaminiert sind, geeignet. Das gilt auch für die Kombination von thermischer Behandlung und anschließender sechsmonatiger Lagerung. Die von der Uni Hohenheim durchgeführten Untersuchungen in der Pelletieranlage lassen die Vermutung zu, dass *S. endobioticum* auch den Prozess der Pelletierung überdauern kann. Die Ergebnisse haben ferner gezeigt, dass Klärschlämme unterschiedlicher Herkunft die Vitalität der Dauersori unterschiedlich beeinflussen können. Deshalb wurden die Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes auf Lagerungsversuche mit Klärschlämmen verschiedener Herkunft ausgedehnt.

Thermische Verfahren gelten als sehr zuverlässig, was deren hygienisierende Wirkung angeht. Die Untersuchungen haben aber gezeigt, dass der QSO *Synchytrium endobioticum* durch seine Dauersori in der Lage ist, extreme Bedingungen zu überstehen. Die hohe Temperatur- und Druckbelastbarkeit lässt sich möglicherweise durch den besonderen Aufbau der Dauersori erklären. Der Zoosporensack, der sich im Inneren des Dauersorus befindet ist nach Außen durch eine doppelte Chitinwand geschützt. Laut Ruiz-Herrera (2012) ist α -Chitin die wichtigste strukturelle Komponente in Zellwänden von Pilzen. Es ist extrem unlöslich und besitzt eine höhere Festigkeit als künstliche Mikrofasern aus Stahl, Carbon oder Boron. Die Chitinwände der Dauersori werden im Verlauf der Entwicklung aus Mikrofibrillen gebildet, die sich zu lammelenartig angeordneten Chitinschichten verdichten (Murphy et al., 1982). Die charakteristische Struktur ähnelt dabei den Chitin-Mikrofibrillen, die in Insektenpanzern vorkommen (Murphy et al., 1982). Dort erhöht Chitin allerdings nicht die Festigkeit des Panzers, sondern deren Flexibilität, was letztendlich zu einer höheren Stabilität führt. Murphy et al. (1982) führt die Überlebensfähigkeit der Dauersori auf die in kompakten Lagen angeordneten Chitin-Mikrofibrillen zurück.

4.2.4.2 Untersuchungen zur Inaktivierung von *Synchytrium endobioticum* während der Lagerung

Die Untersuchungen zur Lagerung von Klärschlamm wurden durchgeführt, um erfassen zu können, ob eine alleinige Lagerung im Klärschlamm befindliche Dauersori des Erregers *S. endobioticum* beeinflusst. Da sich Klärschlämme in Abhängigkeit vom Einzugsgebiet der Abwasseraufbereitungsanlage in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, wurden die Untersuchungen mit vier Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft durchgeführt. Die Klärschlämme stammten aus den Klärwerken Mühlhausen bei Stuttgart, Möhringen, Pliezingen-Kemnat und Brüsnau, wobei das Klärwerk in Brüsnau ausschließlich Abwässer der Uni Stuttgart reinigt. Zusätzlich wurden Dauersori in Wasser gelagert, um eine Kontrolle zur Wirkung der Klärschlämme zu haben.

Lagerung in Wasser

Für die Untersuchungen mit Wasser wurden zwei Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Leitungswasser befüllt und ca. 1 mg isolierte, getrocknete Dauersori dazugegeben. Die so gewonnene Sporensuspension wurde homogenisiert und ebenso wie die kontaminierten Klärschlämme, dunkel bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) aufbewahrt. Nach Erreichen der jeweiligen Lagerungszeiten wurde die Sporensuspension wiederum homogenisiert, acht Mal 20 μ l Sporensuspension abpipettiert und die darin befindlichen Dauersori gezählt. Gleichzeitig wurde der Zustand der Dauersori visuell beurteilt, wobei in volle, teilentleerte und leere Dauersori unterschieden wurde. Volle Dauersori wurden in vital bzw. denaturiert unterschieden (siehe Abschnitt 4.2.2.2 Durchführung der Bonitur).

Die Ergebnisse beider Wiederholungen sind in Abbildung 22 dargestellt. Ein Vergleich beider Grafiken lässt erkennen, dass sich beide Wiederholungen kaum voneinander unterscheiden. Die Anzahl rückisolierter Dauersori blieb während des gesamten Versuchszeitraumes nahezu gleich. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Anzahl der insgesamt zurückisolierten Dauersori deutlich über der Anzahl ursprünglich eingebrachter Dauersori lag. In der ersten Wiederholung wurden vor Versuchsbeginn 1,1 mg getrocknete Dauersori eingewogen. Das entspricht einer Menge von durchschnittlich 9.300 Dauersori in 20 ml Wasser (\pm 700 Dauersori) bzw. 9,3 Dauersori in 20 μ l Wasser (\pm 0,7 Dauersori). Gezählt wurden in der ersten Wiederholung durchschnittlich 13 Dauersori in 20 μ l Wasser. In der zweiten Wiederholung wurden 1,3 mg Dauersori eingewogen, was einer Menge von 11.050 Dauersori in 20 ml Wasser (\pm 700 Dauersori) bzw. 11,0 Dauersori in 20 μ l Wasser (\pm 0,7 Dauersori) entspricht. Beim Auszählen der Sporensuspension wurden hier durchschnittlich 15,3 Dauersori erfasst. Damit wurden in beiden Wiederholungen durchschnittlich 4 Dauersori mehr gezählt, als ursprünglich eingewogen wurden, was einer Abweichung von ca. 40 % entspricht. Die Abweichung ist sehr konstant, was für einen methodischen Fehler spricht. Hierfür kann es zwei Ursachen geben. Zum einen können mit der eingewogenen Menge getrockneter Dauersori mehr als die durchschnittlich angegeben 8.500 Dauersori je Milligramm zugegeben worden sein. Sehr viel wahrscheinlicher ist aber,

dass die unterschiedliche Vorgehensweise bei der Erhebung der Anzahl Dauersori die Ursache für die Abweichung ist.

Die Anzahl der zu Versuchsbeginn eingewogenen Dauersori, also der Menge Dauersori, die den 20 ml Wasser zugegeben wurde, entspricht einem Mittelwert, der im Rahmen der Methodvalidierung durch Zählen getrockneter Dauersori ermittelt wurde (Zählung ohne Trägermedium; siehe Abschnitt 4.2.2.1, Bestimmung des Gewichtes der Dauersori). Während der Versuchsphase wird die Anzahl Dauersori in der so entstandenen Sporensuspension aber stichprobenartig durch Auszählen von 8 x 20 µl Sporensuspension erhoben. Das allein kann bereits zu einer Verschiebung der Werte führen. Da die Menge der gezählten Dauersori in beiden Wiederholungen über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass mit der gewählten Vorgehensweise die ursprünglich eingebrachte Menge Dauersori vollständig erfasst wurde. Ein Vergleich beider Wiederholungen in Abbildung 22 lässt gut erkennen, dass sich die Ergebnisse generell sehr gleichen und damit reproduzierbar sind.

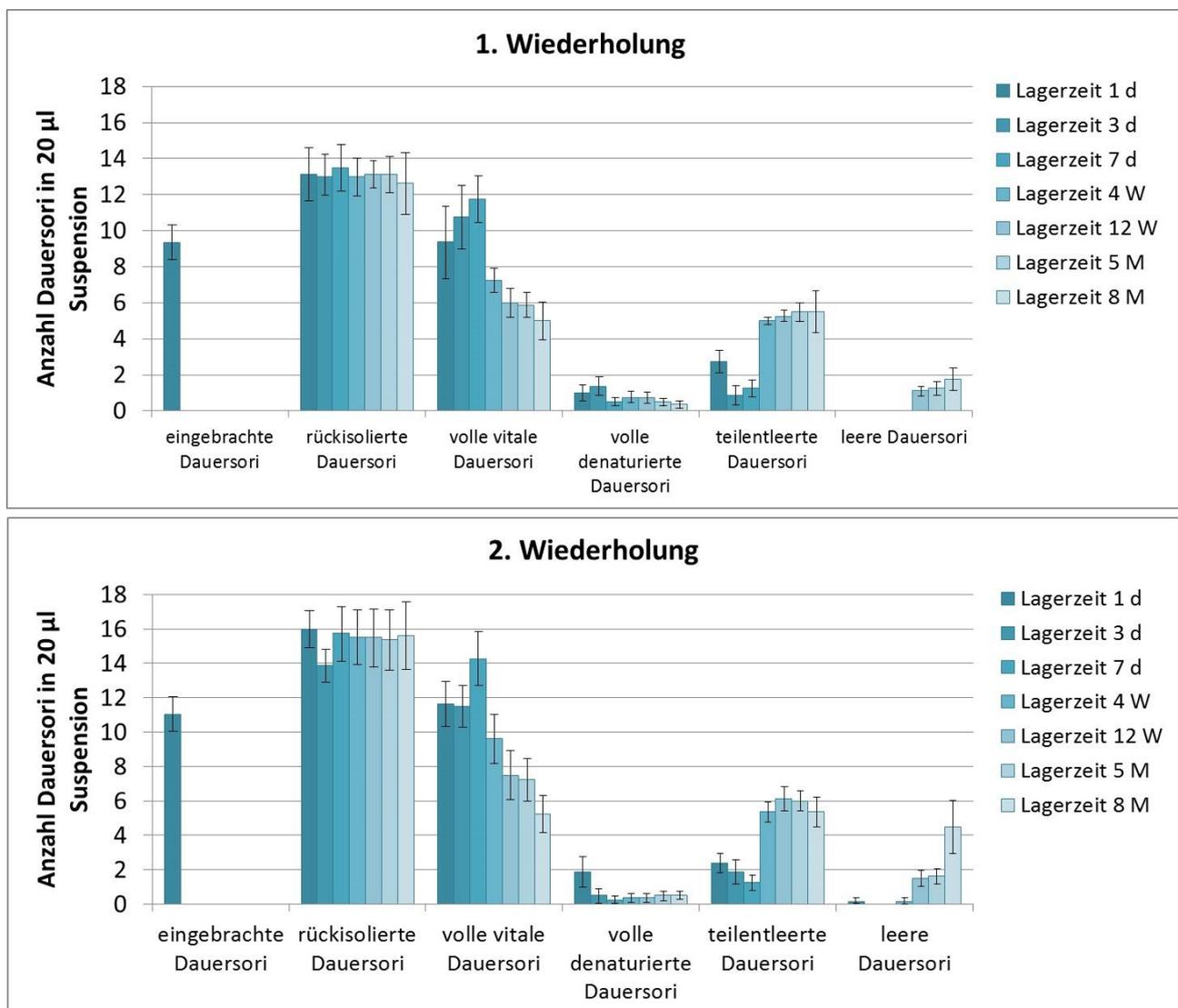


Abbildung 22: Einfluss einer Lagerung in Wasser auf Dauersori des Erregers *Synchytrium endobioticum*, dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 8 Zählungen und die STABW; d = Tag, W = Woche, M = Monat

In den Ergebnissen findet sich ein typisches Verhalten des Erregers wieder. In Anwesenheit von Wasser beginnen die Dauersori mit der Keimung. Durch die Aufnahme von Wasser schwellen die im Dauersorus

befindlichen Zoosporen an. Damit steigt der Druck innerhalb des Sorus. Wird der Druck zu groß, werden Zoosporen entlassen, wodurch dann mehr teilentleerte bzw. leere Dauersori zu finden sind, was in Abbildung 23 deutlich zu erkennen ist. Dieser Abbildung kann auch entnommen werden, dass der Anteil vitaler Dauersori blieb in den ersten vier Wochen nahezu konstant blieb und erst ab der 12. Woche zugunsten teilentleerter und leerer Dauersori abnahm. Demgegenüber blieb die Anzahl denaturierter Dauersori über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant.

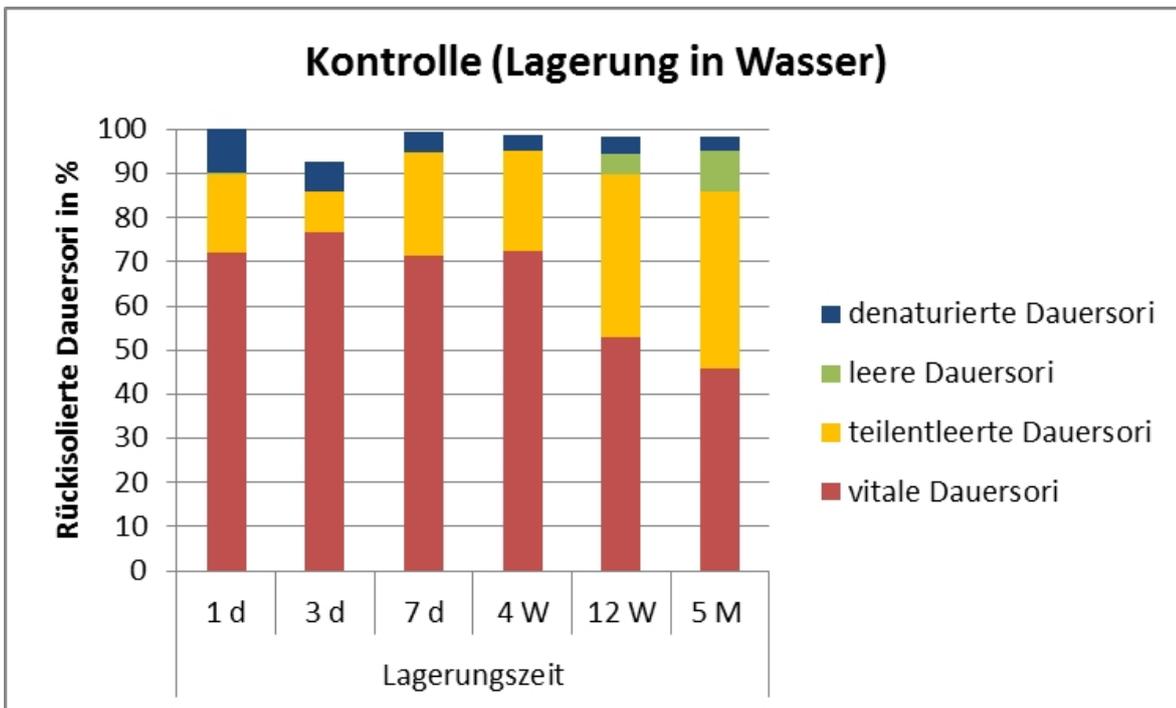


Abbildung 23: Rückisolierungsrate vitaler, teilentleerter, leerer und denaturierter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Wasser; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 -7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Lagerung in Klärschlamm

Die Ergebnisse zu den Lagerungsversuchen mit den verschiedenen Klärschlämmen sind in Abbildung 24 dargestellt. Der Einfluss der Klärschlämme auf Dauersori des Erregers *S. endobioticum* ist deutlich zu erkennen. Während in der Kontrolle der Anteil zurückisolierter Dauersori im Laufe der fünfmonatigen Lagerung nahezu gleich blieb, zeichnete sich bei Lagerung in Klärschlamm aus Möhringen und Mühlhausen ein klarer Negativtrend ab. Demgegenüber nahm der Anteil insgesamt zurückisolierter Dauersori in den Klärschlämmen aus Plieningen-Kemnat und der Uni Stuttgart am Anfang der Lagerung und bei längerer Lagerung eher zu, was eine Anlagerung von Dauersori an Komponenten im Klärschlamm vermuten lässt und weiter unten näher betrachtet werden soll.

Der Anteil vitaler Dauersori reduzierte sich in der Kontrolle ab einer Lagerungszeit von 12 Wochen eindeutig zugunsten teilentleerter und leerer Dauersori. Der Anteil denaturierter Dauersori reduziert sich zu Beginn der Lagerungsversuche leicht, um dann ab einer Lagerungszeit von 7 Tagen in etwa gleich zu bleiben.

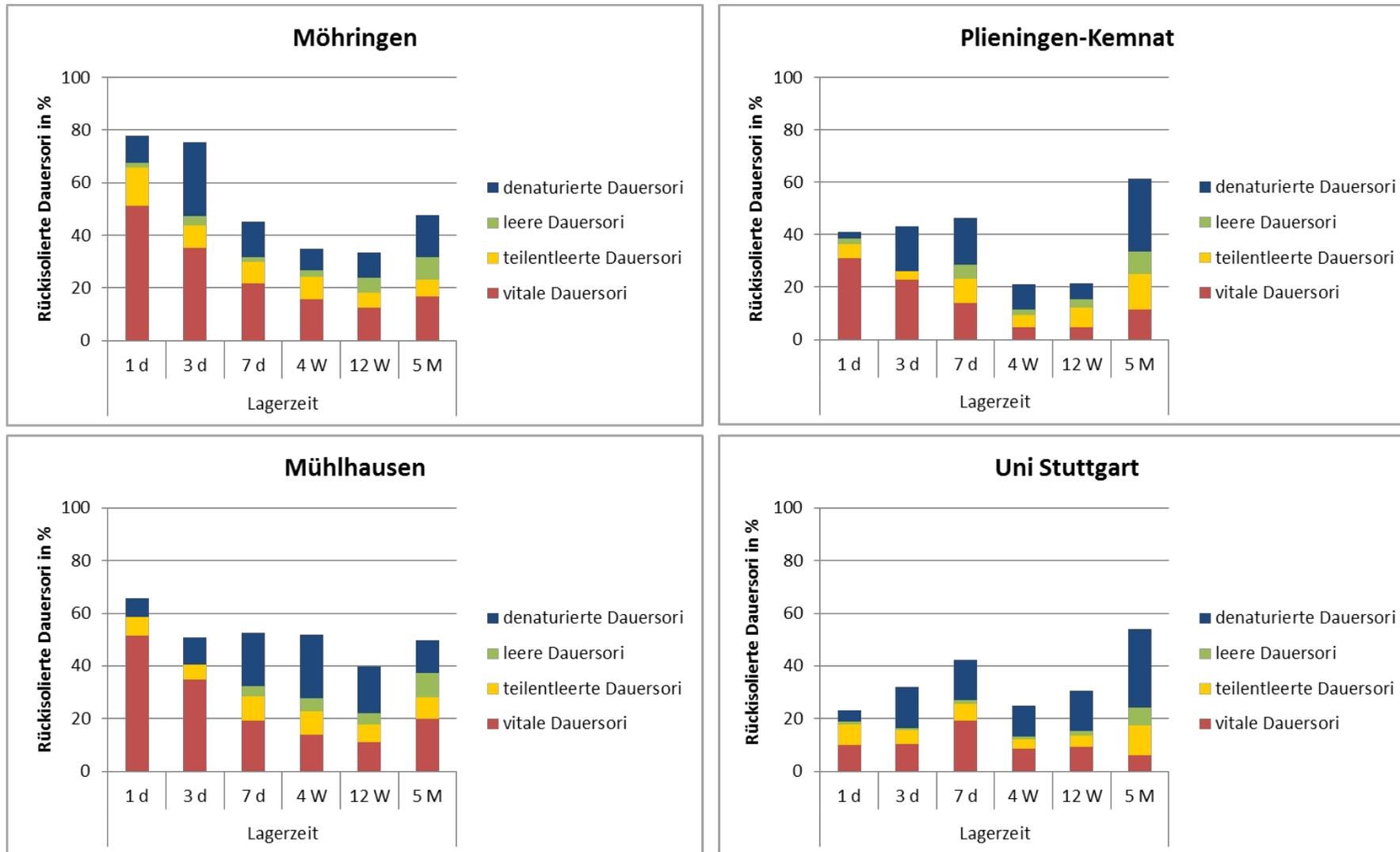


Abbildung 24: Rückisolierungsrate vitaler, teilentleerter, leerer und denaturierter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

In drei Klärschlämmen ergab sich eine kontinuierliche Reduktion der Dauersori während der ersten 12 Wochen Lagerung. Nach 5 Monaten Lagerung wurde dann wieder eine etwas erhöhte Konzentration vitaler Dauersori nachgewiesen (siehe Diskussion). Demgegenüber nahm die Anzahl vitaler Dauersori bei Klärschlamm der Uni Stuttgart mit steigender Lagerungszeit zunächst eher zu, was auf eine Anlagerung von Dauersori an Komponenten im Klärschlamm schließen lässt.

Diskussion der Ergebnisse der Lagerungsversuche

Obwohl die Lagerung der Klärschlämme nicht zu einer vollständigen Eliminierung der Dauersori führte, lohnt sich eine Diskussion der Ergebnisse, da die Dauersori des Erregers während der Lagerung teilweise deutlich reduziert werden konnten.

In Abbildung 25 ist dargestellt, wie viele Dauersori insgesamt sowohl aus Wasser, als auch aus den verschiedenen Klärschlämmen zurückisoliert werden konnten. Es ist gut zu sehen, dass eine vollständige Rückisolierung der Dauersori über den gesamten Versuchszeitraum nur bei Lagerung von Wasser möglich war. Aus den Klärschlammvarianten konnten deutlich weniger Dauersori zurückisoliert werden und es zeigten sich große Unterschiede bei den verschiedenen Klärschlämmen. So ließen sich bei den Klärschlämmen Möhringen und Mühlhausen weitaus mehr Dauersori zurückisolieren, als aus den beiden anderen Klärschlämmen.

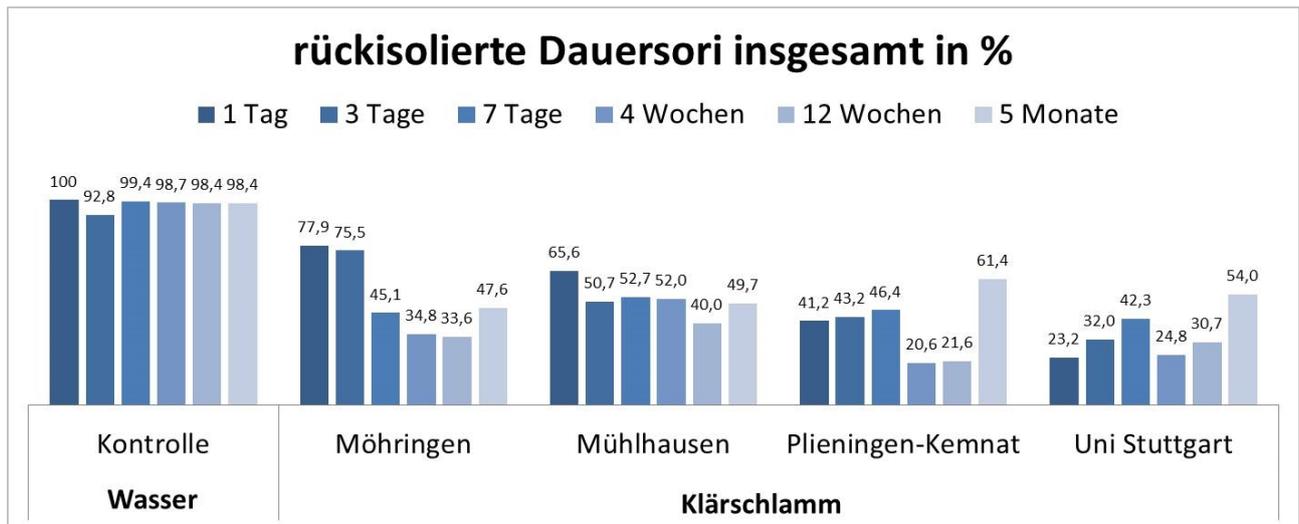


Abbildung 25: Rückisolierungsrate von Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung aus Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Auffällig sind die Werte bei einer Lagerung für 5 Monate. Die Anzahl insgesamt zurückisolierter Dauersori ist hier höher, als bei einer Lagerung für vier oder zwölf Wochen. Die Gesamtzahl rückisolierter Dauersori nimmt zum Ende der Lagerungsversuche wieder zu. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Proben für die fünfmonatige Lagerung mit einer anderen Klärschlammcharge angesetzt wurden, als alle anderen Lagerungsvarianten. Die Proben für die fünfmonatige Lagerung wurden mit den zuerst gelieferten Klärschlämmen angesetzt, wobei der Ansatz der Proben zu den Lagerungsversuchen erst erfolgte, nachdem die Methodvalidierung und die ersten Autoklavierversuche abgeschlossen waren. Die Klärschlämme wurden zwar über den gesamten Zeitraum im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, die Lagerung könnte sich aber auf die mikrobielle Aktivität der Klärschlämme ausgewirkt haben. Alle anderen Lagerungsvarianten wurden mit frisch gelieferten Klärschlämmen angesetzt. Die Ergebnisse zur fünfmonatigen Lagerung sollten des-

halb vorsichtig interpretiert werden, oder ganz aus der Betrachtung herausgenommen werden. Sie werden aber der Vollständigkeit halber stets mit aufgeführt.

Vitale Dauersori

In Abbildung 26 ist dargestellt, welchen Einfluss die Klärschlamm Lagerung auf den Anteil vitaler Dauersori hatte. Die Ergebnisse der Klärschlammvarianten unterschieden sich deutlich von der Kontrolle. Während in der Kontrolle die Anzahl vitaler Dauersori erst nach einer Lagerungszeit von 12 Wochen zurückging, nahm ihre Anzahl bei den Klärschlämmen aus Möhringen, Mühlhausen und Plieningen-Kemnat bereits ab dem ersten Tag Lagerung ab. Dabei war die Reduktion vitaler Dauersori bei Klärschlamm aus Möhringen und bei Klärschlamm aus Mühlhausen ähnlich ausgeprägt. Beim Klärschlamm aus Plieningen Kemnat fiel die Reduktion vitaler Dauersori stärker aus.

Der Rückgang vitaler Dauersori in Abhängigkeit von der Lagerungszeit lässt bei diesen drei Klärschlämmen einen mikrobiellen Abbau von Dauersori während der Lagerung vermuten. Allerdings kann eine abschließende Aussage hierzu erst getroffen werden, wenn der Anteil teilentleerter, leerer und denaturierter Dauersori betrachtet wird. Bei einem mikrobiellen Abbau dürfte der Anteil teilentleerter und leerer Dauersori nicht zunehmen, da davon ausgegangen werden kann, dass diese von den Mikroorganismen leichter aufgeschlossen werden. Da bei Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat bereits nach einem Tag Lagerung deutlich weniger Dauersori (insgesamt) zurückisoliert werden konnten, kann hier eine Anlagerung von Dauersori nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Beim Klärschlamm der Uni Stuttgart war der Anteil vitaler Dauersori während des gesamten Lagerversuchs sehr niedrig (6 % bis 20 %), was die Annahme bestätigt, dass es bei diesem Klärschlamm zu einer Anlagerung der Dauersori gekommen ist.

Über die Betrachtung teilentleerter, leerer und denaturierter Dauersori können zusätzliche Informationen gewonnen werden.

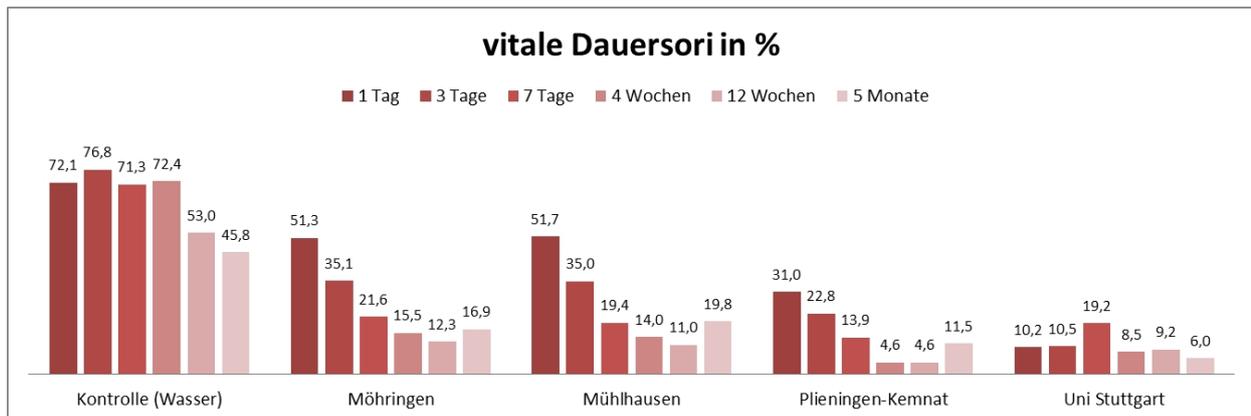


Abbildung 26: Rückisolierungsrate vitaler Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung aus Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Teilentleerte Dauersori

In Abbildung 27 ist der Anteil teilentleerter Dauersori an der Menge der insgesamt zurückisolierten Dauersori dargestellt. Der Anteil teilentleerter Dauersori nahm in der Kontrolle mit längerer Lagerungszeit deutlich zu. In den Klärschlammvarianten war dagegen kein Trend erkennbar und die Konzentration der teilentleerter Dauersori blieb auf niedrigem Niveau konstant.

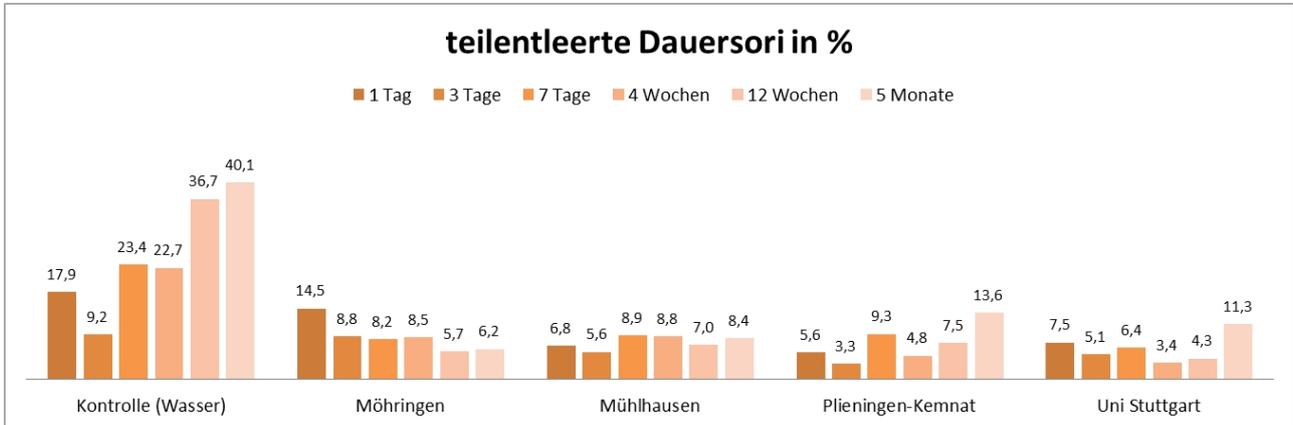


Abbildung 27: Rückisolierungsrate teilentleerter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämme unterschiedlicher Herkunft dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Der bereits beschriebene Prozess der Keimung der Dauersori bei Anwesenheit von Wasser kann auch für Dauersori in Klärschlamm vermutet werden, da alle geprüften Klärschlämme einen Wassergehalt von mindestens 97 % aufwiesen (Tabelle 40). Im Vergleich zur Kontrolle, sind Dauersori in Klärschlamm aber dem Einfluss der Mikroflora ausgesetzt und somit einem potentiellen Abbauprozess. Geht man davon aus, dass ein mikrobieller Aufschluss und somit eine Deformierung oder Zersetzung der Dauersori stattgefunden hat, müssten in den untersuchten Proben auch Teilstücke von Dauersori zu finden sein, was nicht der Fall war. Hier zeigt sich ein wesentlicher Nachteil der gewählten Isolierungsmethode. Das verwendete Protokoll, wird für die Isolierung von Dauersori aus Bodenproben im Rahmen der Freigabe von Befallsherden genutzt, um zu überprüfen, ob sich im Boden noch vitale Dauersori befinden. Die Isolierungsmethode (dabei insbesondere die beiden Zentrifugationsschritte) ist deshalb auf die Isolierung intakter Dauersori ausgerichtet. Teilstücke von Dauersori lassen sich daher nicht nachweisen. Damit kann ein wesentliches Merkmal, durch das sich ein mikrobieller Abbau und damit die beobachtete Reduktion von Dauersori bestätigen ließe, nicht beobachtet werden.

Leere Dauersori

Leere Dauersori traten in der Kontrolle erstmalig nach einer Lagerungszeit von 12 Wochen in größerer Zahl auf (Abbildung 28). Demgegenüber waren leere Dauersori in den unterschiedlichen Klärschlämme bereits nach einer Lagerungszeit von sieben Tagen nachweisbar. Der Anteil leerer Dauersori war insgesamt sehr gering und variierte über den Lagerungszeitraum von einem Tag bis 12 Wochen nur geringfügig. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass leere Dauersori von den im Klärschlamm befindlichen Mikroorganismen aufgeschlossen und als Grundlage für den eigenen Stoffwechsel genutzt wurden. Für die Klärschlammproben der fünfmonatigen Lagerungszeit wurde bereits vermutet, dass die mikrobielle Aktivität herabgesetzt war, weil die Klärschlämme bereits zu Versuchsbeginn älter waren, als bei allen anderen Versuchsansätzen. Diese Vermutung deckt sich mit der Tatsache, dass in den Klärschlammproben, die für fünf Monate gelagert wurden, ein höherer Anteil an leeren Dauersori nachweisbar war.

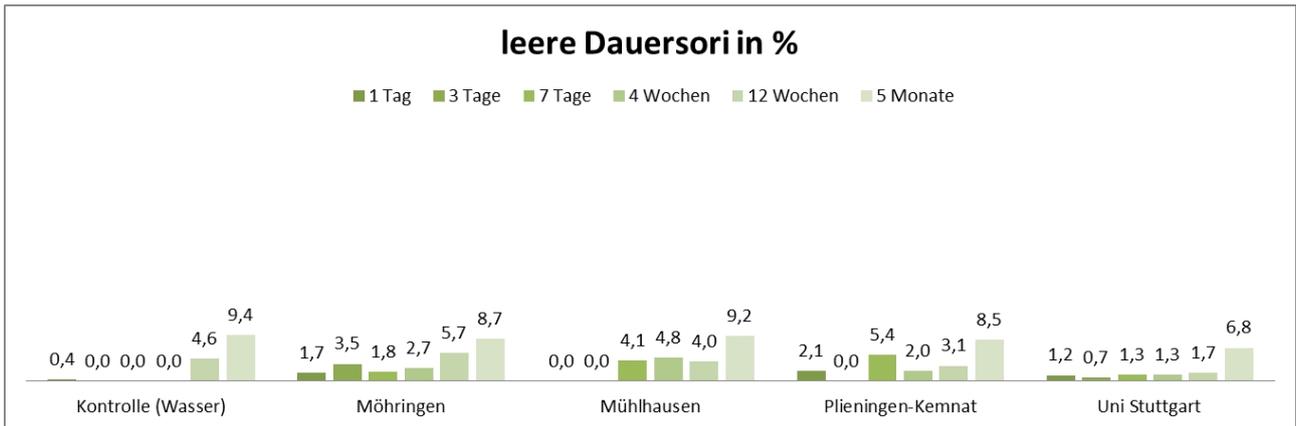


Abbildung 28: Rückisolierungsrate leerer Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Denaturierte Dauersori

Abbildung 29 zeigt den Anteil denaturierter Dauersori an der Menge insgesamt zurückisolierter Dauersori. Der Anteil denaturierter Dauersori war in der Kontrolle insgesamt gering. Da sich im Wasser keine Substanzen befinden, die eine Denaturierung hervorrufen können, waren diese geringen Konzentrationen zu erwarten.

In den Klärschlammvarianten war der Anteil denaturierter Dauersori insgesamt wesentlich höher als in der Kontrolle. Lässt man bei der Betrachtung des Anteil denaturierter Dauersori die Lagerung für fünf Monate außer Acht (siehe Diskussion zu insgesamt zurückisolierten Dauersori), fällt auf, dass sich, mit Ausnahme des Klärschlamm der Uni Stuttgart, der Anteil denaturierter Dauersori erst erhöht, um dann wieder abzufallen. Dabei ist der Höhepunkt bei den unterschiedlichen Klärschlämmen jeweils zu einem anderen Zeitpunkt zu finden. Auch hier lässt sich vermuten, dass denaturierte Dauersori leichter mikrobiell abgebaut werden, als vitale Dauersori und daher nicht bis zum Versuchsende erhalten bleiben.

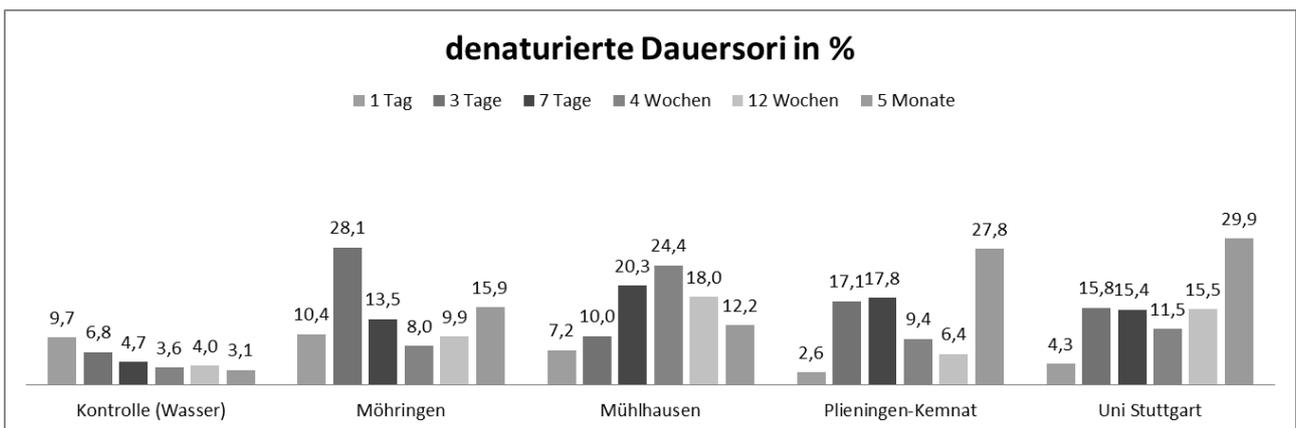


Abbildung 29: Rückisolierungsrate denaturierter Dauersori des Erregers *S. endobioticum* nach Lagerung in Klärschlämmen unterschiedlicher Herkunft; dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Wiederholungen für die Lagerzeiten 1 - 7 Tagen bzw. aus drei Wiederholungen für die Lagerzeiten 4 Wochen bis 5 Monate; je Wiederholung wurden 8 x 20 µl Sporensuspension ausgezählt

Die Denaturierung von Dauersori ist sehr wahrscheinlich nicht auf die mikrobielle Aktivität der Klärschlämme, sondern eher auf die Wirkung der im Klärschlamm befindlichen Schwermetalle und/oder organischer Schadstoffe zurückzuführen. Wie Tabelle 40 zeigt, waren in allen geprüften Klärschlämmen die gleichen Schwermetalle vorhanden. Dabei waren die Konzentrationen der Schwermetalle und insbesondere die Konzentration an Quecksilber bei den einzelnen Klärschlämmen unterschiedlich, lagen aber jeweils unterhalb der mit der neuen Novellierung der Klärschlammverordnung (AbfallKlärV, 2010 und 2013) vorgesehenen Grenzwerte. Zur Konzentration organischer Schadstoffe in den geprüften Klärschlämmen liegen keine Werte vor.

Welche Wirkung Schwermetalle auf Dauersori haben könnten, kann im Rahmen dieser Untersuchungen nur über allgemeingültige Aussagen beurteilt werden. Es ist bekannt, dass Blei, Cadmium, Zink und Kupfer auf Mikroorganismen toxisch wirken. Schwermetallbelastungen der Bodenmikroflora führen zu funktionellen Störungen, zur Denaturierung von Proteinen und zur Störungen der Integrität der Zellmembran. So wirkt die Chromverbindung Chromat (CrO_4^{2-}) bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch und karzinogen (Florez & Perez, 1999). Laut Kawanishi et al. (1986), Zhitkovich et al. (1998) und Sudgen & Stearns (2000) in Juhnke (2004) spielen Cr(V)-Intermediate eine Schlüsselrolle bei der Initiation von DNA-Schäden.

Auch organische Schadstoffe könnten einen Einfluss auf die Dauersori haben. Laut Sikkema et al. (1995) können hydrophobe organische Schadstoffe, wie Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Polychlorierte Biphenyle (PCB), die Permeabilität der Cytoplasmamembran von Mikroorganismen verändern, wodurch sowohl die Nährstoff- aber auch die Schadstoffaufnahme in die Zelle erhöht werden kann. Die Betrachtung organischer Schadstoffe ist laut Christian-Bickelhaupt et al. (2008) insofern schwierig, weil die Anzahl Einzelverbindungen sehr groß ist, und weil die Wirkung vieler organischer Verbindungen auf die Umwelt und auf Lebewesen noch nicht tiefgreifend erforscht ist, sodass Wirkungsabschätzungen, gerade von sehr niedrigen Konzentrationen, schwierig sind. Koch & Wilke (1998), die sowohl die Einzelwirkung von PAK und PCB aber auch die Wirkung dieser beiden organischen Schadstoffe in Verbindung mit den Schwermetallen Kupfer und Zink untersucht haben, konnten feststellen, dass die Bodenmikroorganismen durch die organischen Schadstoffe kaum beeinträchtigt wurden. Toxische Wirkungen auf Mikroorganismen bzw. die Beeinflussung mikrobieller Umsetzungsprozesse wurden auf die Wirkung der Schwermetalle zurückgeführt. Bei Ihren Untersuchungen konnten sie außerdem feststellen, dass sich die Aufnahme von Zink in die untersuchten Pflanzen erhöhte, wenn organische Schadstoffe anwesend waren, was sich mit der Aussage von Sikkema et al. (1995) am Anfang dieses Absatzes deckt.

Tabelle 40: Zusammensetzung der untersuchten Klärschlämme

	Möhringen	Mühlhausen	Plieningen-Kemnat	Uni Stuttgart (Brüsnau)
TS-Gehalt	2,6 - 3,2 %	2,8 - 3,2 %	8,54 %	4,9 (3 - 6,5) %
pH-Wert	7,0	7,1	7,2	k.a.
Methangehalt	58 % Vol.	ca. 60% Vol.	59 % Vol.	66 % Vol.
CO ₂ -Konzentration	39,8 % Vol.	k.a.	39 % Vol.	k.a.
basisches CaO	0,7 %*	0,14 %*	1,12 %*	k.a.
N _{ges.}	1,18 %*	0,39 %*	1,05 %*	0,045 %*
NH ₄	0,17 %*	0,07 %*	0,23 %*	k.a.
P ₂ O ₅	2,21 %*	0,20 %*	1,52 %*	0,046 %*
K ₂ O	0,06 %*	0,02 %*	0,07 %*	k.a.
Pb	33,1 mg/kg ¹	36,6 mg/kg ¹	35,8 mg/kg ¹	27 mg/kg ¹
Cd	1,55 mg/kg ¹	1,08 mg/kg ¹	1,36 mg/kg ¹	<1,2 mg/kg ¹
Cr	32,5 mg/kg ¹	43,5 mg/kg ¹	40,6 mg/kg ¹	27 mg/kg ¹
Cu	438 mg/kg ¹	401 mg/kg ¹	445 mg/kg ¹	327 mg/kg ¹
Ni	21,2 mg/kg ¹	26,5 mg/kg ¹	31,3 mg/kg ¹	28,7 mg/kg ¹
Hg	0,64 mg/kg ¹	1,27 mg/kg ¹	0,39 mg/kg ¹	3,45 mg/kg ¹
Zn	1010 mg/kg ¹	1140 mg/kg ¹	1130 mg/kg ¹	676 mg/kg ¹
Al ₂ O ₃	160 mg/kg ¹	k.a.	222 mg/kg ¹	k.a.
Flockungsmittel	3-S-Chemica („Fediflock 880 CH“)	Polychemie CP66	k.a.	Reiflock FHM S1/F
hydraulische Verweilzeit im Faul-turm	20 Tage	10 Tage	15 - 20 Tage (genaue Angabe nicht möglich)	50 Tage

(*) Gehalt der Frischsubstanz

(1) Gehalt der Trockensubstanz

k.a.= keine Angaben

4.2.4.3 Überprüfen der Virulenz rückisolierter Dauersori mittels Pathogenitätstest

Die Virulenz der aus den Klärschlämmen zurückisolierten Dauersori wurde mittels Tube-Test nach Potoček geprüft. Insgesamt wurden zwei Tests durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde die gegenüber *S. endobioticum* Pathotyp 1 hochanfällige Kartoffelsorte 'Tomensa' verwendet. Überprüft wurde die Virulenz von Dauersori aus Klärschlämmen nach erfolgter rein thermischer Behandlung, nach thermischer Behandlung und einer zusätzlichen sechsmonatigen Lagerung, sowie aus Klärschlämmen die ohne vorherige thermische Behandlung für 4 und 12 Wochen sowie für 5 Monate gelagert wurden. Die Bonitur wurde anhand des Boniturschlüssels nach Stachewicz durchgeführt (Tabelle 37).

Die Tuben wurden mit dem entsprechenden Substratgemisch so befüllt, dass ein ca. 2 cm hoher Gießrand bestehen blieb. Für die Negativ-Kontrolle wurde die entsprechende Anzahl Tuben mit einem 1:1 Gemisch aus gedämpftem Kompost und Quarzsand befüllt. In der Positiv-Kontrolle wurden die Tuben mit einem 1:1 Gemisch aus gedämpftem Kompost und Krebskompost⁴ befüllt. Den Tuben der Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden anschließend jeweils 5 ml Leitungswasser zugegeben. In allen anderen Prüfvarianten wurden die Tuben mit einem 1:1 Gemisch aus gedämpftem Kompost und Quarzsand befüllt und mit 5 ml Sporensuspension⁵ inokuliert. Nach dem Aufhängen der Tuben in der Klimazelle wurde der 2 cm hohe Gießrand mit vollentmineralisiertem Wasser (VE-Wasser) aufgefüllt. Die Auswertung erfolgte 12 Wochen nach Infektion. Dafür wurden die Tuben entfernt, die gewachsenen Triebe für die Bonitur freigelegt und von dem Kompost-Quarzsandgemisch befreit. Die Bonitur der Symptome an den Kartoffeltrieben erfolgte an einem Stereomikroskop bei 10-18facher Vergrößerung.

Tabelle 41 und 42 zeigen den genauen Versuchsaufbau für den ersten und zweiten Pathogenitätstest inklusive der vergebenen Boniturnoten. Den Tabellen ist zu entnehmen, dass erregertypische Gewebewucherungen nur in den Positiv-Kontrollen und bei der Überprüfung der Vitalität isolierter, getrockneter Dauersori beobachtet werden konnten (siehe auch Abbildung 30). Wurden aus Klärschlamm isolierte Dauersori als Inokulum verwendet, konnten maximal Abwehrreaktionen in Form von nekrotisierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 31 bis 35), die eindeutig den Boniturstufen 1 und 2 zugeordnet werden konnten. In folgenden Prüfvarianten konnten keine nekrotisierten Zellen beobachtet werden: Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat gelagert für 4 Wochen, 12 Wochen bzw. 5 Monate, Klärschlamm aus Möhringen gelagert für 5 Monate und Klärschlamm der Uni Stuttgart gelagert für 5 Monate.

Bei Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat, der für 4 bzw. 12 Wochen gelagert wurde, lässt sich das Fehlen nekrotisierter Zellen an den Kartoffeltrieben auf die vergleichsweise geringe Anzahl vitaler Dauersori im Inokulum zurückführen. Bei den Klärschlämmen aus Möhringen, Mühlhausen und der Uni Stuttgart die für 4 bzw. 12 Wochen gelagert wurden, lag die Anzahl vitaler Dauersori im Inokulum zwischen 85 - 150 Dauersori. Im Vergleich dazu lagen beim Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat jeweils nur 46 vitale Dauersori im Inokulum vor.

Bei drei von vier geprüften Klärschlämmen, die für fünf Monate gelagert wurden, konnten im Biotest keine nekrotisierten Zellen an den Kartoffeltrieben nachgewiesen werden, was den Schluss nahe legt, dass die Dauersori durch die Lagerung weniger vital waren. Gegen eine solche Aussage spricht aber die Tatsache, dass die Keimung der Dauersori nur schwer zu steuern ist. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, dass die Dauersori aufgrund der ungünstigen Umweltbedingungen in eine Art Keimruhe übergegangen waren (persönliches Gespräch mit Fr. Dr. Flath, JKI, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland).

In den mitgeführten Negativ-Kontrollen konnten keine nekrotisierten Zellen beobachtet werden. Die beobachteten Nekrosen lassen sich somit eindeutig auf die Anwesenheit von *S. endobioticum* zurückführen,

⁴ mit Dauersori kontaminierter Quarzsand

⁵ In Suspension vorliegende, aus Klärschlamm zurückisolierte Dauersori

was beweist, dass in den untersuchten Proben noch vitale, also keimfähige Dauersori vorlagen, deren entlassene Zoosporen Zellen der Kartoffeltriebe attackiert haben. Damit deckt sich das Ergebnis des Pathogenitätstestes mit der der Einschätzung der Vitalität der Dauersori durch die visuelle Begutachtung am Mikroskop.

4.2.4.4 Fazit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass:

- a. Erhitzung und hoher Druck nicht ausreichen, um mit Se kontaminierte Klärschlämme zu hygienisieren.
- b. auch die Kombination aus Hitze/Druck und Lagerung nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der Dauersori führt.
- c. die Effekte während der Lagerung sehr wahrscheinlich primär auf die Aktivität der Mikroflora im Klärschlamm zurückgeführt werden können.

Tabelle 41: Versuchsaufbau und Boniturergebnisse des ersten Biotestes zur Überprüfung der Pathogenität nach erfolgter thermischer Behandlung von Klärschlamm aus Mühlhausen (K=Kontrolle, B= behandelt, DS=Dauersori)

Kürzel der Prüfvariante	Prüfvariante	Zugegebenes Inokulum je Kartoffel	Ø Anzahl Dauersori im Inokulum	Ø Anzahl vitaler Dauersori im Inokulum	Anzahl inokulierter Kartoffeln	Erzielte Boniturnoten je Kartoffelknolle (n=3)		
K-negativ	Unbehandelte Kontrolle	5 ml Leitungswasser	0	0	3	0	0	0
K-positiv	Positiv-Kontrolle	5 ml Sporensuspension; isolierte Dauersori aus Krebskompost 2009/1/P1	3.000	unbekannt	2	5	5	
			1.000	unbekannt	3	5	5	5
DS-getrocknet	isolierte, getrocknete Dauersori	5 ml Sporensuspension mit isolierten, getrockneten Dauersori aus Krebskompost 2009/1/P1	3.000	unbekannt	2	5	5	
			1.000	unbekannt	3	5	5	5
K-MH-20 °C	Kontrolle zur thermischen Behandlung bei 133 °C; KS aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	3.000	700	5	0	1	0
B-MH-133 °C	Behandlung bei 133 °C für 20 Minuten	5 ml Sporensuspension	3.000	750	2	2	2	
			1.000	250	3	2	1	1
K-MH-20 °C	Kontrolle zur thermischen Behandlung bei 140 °C; KS aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	3.000	860	5	1	0	0
B-MH-140 °C	Behandlung bei 140 °C für 2 Stunden;	5 ml Sporensuspension	3.000	540	2	1	0	
			1.000	180	3	0	1	0

Tabelle 42: Versuchsaufbau des zweiten Biotestes zur Überprüfung der Pathogenität nach erfolgter thermischer Behandlung von Klärschlamm der Uni Stuttgart bzw. nach erfolgter Lagerung unterschiedlicher Klärschlämme für 4 Wochen, 12 Wochen und 5 Monate; (K=Kontrolle, B= behandelt, DS=Dauersori, M=Monate, W= Wochen)

Kürzel Prüf-variante	Prüfvariante	Zugegebenes Inokulum je Kartoffel	Ø Anzahl Dauersori im Inokulum	Ø Anzahl vitaler Dauersori im Inokulum	Anzahl inokulierter Kartoffeln	Erzielte Boniturnoten je Kartoffelknolle (n=3)		
K-negativ	Unbehandelte Kontrolle	5 ml Leitungswasser	0	0	3	0	0	0
K-positiv	Positiv-Kontrolle	5 ml Sporensuspension mit isolierten Dauersori aus Krebskompost 2009/1/P1	3.000	unbekannt	3	5	5	5
K-Uni-20 °C	Kontrolle zur thermischen Behandlung bei 140 °C; KS der Uni Stuttgart	5 ml Sporensuspension	3.000	390	3	0	1	0
B - Uni 140 °C	Behandlung bei 133 °C für 20 Minuten; Klärschlamm der Uni Stuttgart	5 ml Sporensuspension	3.000	480	3	1	0	0
B - MH 133 °C - 6 M	Behandlung bei 133 °C für 20 Minuten, 6 Monate gelagert; Klärschlamm aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	1.000	320	5	1	2	1
B - MH 140 °C - 6 M	Behandlung bei 140 °C für 2 Stunden; 6 Monate gelagert; Klärschlamm aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	3.000	190	5	1	1	0
MH - 4 W	4 Wochen gelagerter Klärschlamm aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	1.000	140	3	2	1	0
MH - 12 W	12 Wochen gelagerter Klärschlamm aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	1.000	100	3	0	2	0

Klärschlammhygiene

Kürzel Prüf- variante	Prüfvariante	Zugegebenes Inokulum je Kartoffel	Ø Anzahl Dauersori im Inoku- lum	Ø Anzahl vitaler Dauersori im Inoku- lum	Anzahl inokulier- ter Kartof- feln	Erzielte Boniturnoten je Kartoffel- knolle (n=3)		
MH - 5 M	5 Monate gelagerter Klärschlamm aus Mühlhausen	5 ml Sporensuspension	1.000	190	3	2	0	0
MR - 4 W	4 Wochen gelagerter Klärschlamm aus Möhringen	5 ml Sporensuspension	1.000	150	3	0	1	0
MR - 12 W	12 Wochen gelagerter Klärschlamm aus Möhringen	5 ml Sporensuspension	1.000	120	3	0	0	1
MR - 5 M	5 Monate gelagerter Klärschlamm aus Möhringen	5 ml Sporensuspension	1.000	170	3	0	0	0
Plie - 4 W	4 Wochen gelagerter Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat	5 ml Sporensuspension	1.000	46	3	0	0	0
Plie - 12 W	12 Wochen gelagerter Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat	5 ml Sporensuspension	1.000	46	3	0	0	0
Plie - 5 M	5 Monate gelagerter Klärschlamm aus Plieningen-Kemnat	5 ml Sporensuspension	1.000	110	3	0	0	0
Uni - 4 W	4 Wochen gelagerter Klärschlamm der Uni Stuttgart	5 ml Sporensuspension	1.000	85	3	2	0	0
Uni - 12 W	12 Wochen gelagerter Klärschlamm der Uni Stuttgart	5 ml Sporensuspension	1.000	90	3	0	1	1
Uni - 5 M	5 Monate gelagerter Klärschlamm der Uni Stuttgart	5 ml Sporensuspension	1.000	60	3	0	0	0



Abbildung 30: Tuben der Negativ-Kontrolle (links), der Positiv-Kontrolle (mitte) und der Infektion mit getrockneten Dauersori (rechts) 12 Wochen nach Infektion; in der Positiv-Kontrolle und bei Infektion mit getrockneten Dauersori sind bereits oberirdisch Gewebewucherungen zu sehen. (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)



Abbildung 31: Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen (rot markiert) als Reaktion auf eine Infektion mit *S. endobioticum*. Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die aus behandeltem Klärschlamm (20 Minuten bei 133 °C autoklaviert); Symptome entsprechen der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)



Abbildung 32: Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen als Reaktion auf eine Infektion mit *S. endobioticum*. Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, aus Klärschlamm, behandelt bei 140 °C für 2 Stunden; Symptom entspricht der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)



Abbildung 33: Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen markiert durch rote Pfeile, als Reaktion auf eine Infektion mit *S. endobioticum*. Aufnahme bei 18facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die 12 Wochen in Klärschlamm der Uni Stuttgart gelagert wurden; Symptome entsprechen der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)



Abbildung 34: Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen in Form einer Linie (roter Pfeil) als Reaktion auf eine Infektion mit *S. endobioticum*. Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die 4 Wochen in Klärschlamm aus Möhringen gelagert wurden; Symptom entspricht der Boniturnote 1 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)



Abbildung 35: Kartoffeltrieb mit nekrotisierten Zellen als Reaktion (markiert durch roten Pfeil) auf eine Infektion mit *S. endobioticum*. Aufnahme bei 10facher Vergrößerung, 12 Wochen nach Infektion mit Dauersori, die 4 Wochen in Klärschlamm aus Möhringen gelagert wurden; Symptom entspricht der Boniturnote 2 (Foto: Yvonne Schleusner, JKI)

Hygieneanforderungen hinsichtlich Umgang und Verwertung von Klärschlämmen

4.3 Literaturbasierte Bewertung von weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren hinsichtlich ihrer reduzierenden Wirkung auf Krankheitserreger und Schadorganismen

In Anlage 2 des Entwurfes zur Novellierung der AbfklärV (2010 bzw. 2013) werden weitergehende Klärschlammbehandlungsverfahren aufgeführt, die bei Beachtung aller Vorgaben der AbfklärV eine seuchenhygienische Unbedenklichkeit bei der Klärschlammausbringung gewährleisten sollen. Aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Daten zu phytopathogenen Erregern, ist Anlage 2 des Entwurfs der Novellierung der Klärschlammverordnung derzeit nicht für die Phytohygiene vorgesehen. Die Phytohygiene soll trotzdem in die literaturbasierte Bewertung einbezogen werden, um einen umfassenden Überblick über seuchen- und phytohygienische Erfordernisse zu erlangen und synergistische Effekte nutzen zu können.

Klärschlammbehandlungsverfahren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf unterschiedliche Krankheitserreger und Schadorganismen. Sie könnten in Zukunft eine breitere Anwendung von Klärschlamm ermöglichen, wenn Infektionsrisiken zuverlässig ausgeschlossen werden können. Im Folgenden wird die Wirkung der Behandlungsverfahren auf relevante Schadorganismen der Seuchen- und Phytohygiene auf der Basis einer Literaturrecherche bewertet.

4.3.1 Thermische Verfahren

Die Anwendung von Hitze zur Inaktivierung von Mikroorganismen ist wohl das älteste und verbreitetste Verfahren. Laut Hartwig et al. (2009) spielt Wasser bei der Übertragung der letalen Energie eine große Rolle. Es ist das Leitmedium bei der Übertragung der Wärmeenergie, die letztendlich zu einer heftigen Bewegung der Wassermoleküle führt. Die in der Zellmembran und im Zytoplasma vorhandenen Wassermoleküle beginnen so stark zu schwingen, dass zwischenmolekulare Bindungen in beispielsweise Eiweißen und Nukleinsäuren geschwächt bis zerstört werden, was letztendlich zu einer Denaturierung der nativen Moleküle führt. Das erklärt die höhere Wirksamkeit feuchter Hitze im Vergleich zu trockener Hitze. Die meisten potentiell pathogenen, vegetativen Bakterien und Pilze bzw. Schadorganismen von Pflanzen tolerieren einen Temperaturbereich von 5 °C bis 40 °C, maximal 45 °C. Temperaturen über 40-45 °C führen zu einer Denaturierung der Proteine, zum Zusammenbruch der Struktur der Membran und unter Umständen zu einer thermisch bedingten Lyse.

Einige Mikroorganismen bilden Dauerstadien, um ungünstige Lebensbedingungen zu überbrücken. Sie enthalten im Vergleich zu vegetativen Zellen wesentlich weniger Wasser. Laut Hartwig et al. (2009) enthalten Endosporen der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* 70 % bis 90 % weniger Wasser, als deren vegetative Zellen, wodurch die Wärmeübertragung und somit die Zerstörung lebenswichtiger Strukturen erschwert wird. Dies erklärt u.a. auch, warum für das Abtöten der Dauerstadien, meist höhere Temperaturen notwendig sind bzw. längere Einwirkzeiten.

Welche Temperaturen für ein sicheres Eliminieren von Mikroorganismen nötig sind und wie lang der Zeitraum sein muss, über den diese Temperaturen wirken müssen, ist auch von der Erregerart abhängig. Mit Ausnahme thermoresistenter Viren, verlieren nicht durch Zellmaterial geschützt vorliegende Viren, ihre Infektiosität innerhalb weniger Minuten, wenn feuchte Hitze mit Temperaturen zwischen 55 °C und 70 °C auf sie einwirken. Temperaturen von 75 °C bis 80 °C sind ausreichend, um vegetative Pilz- und Bakterienzellen rasch abzutöten, wobei sich die Einwirkzeit verlängert, wenn diese in organische Materialien schützend eingebettet sind. Nach dem Modell von Böhm (2007), welches Hitzeresistenzstufen von Schadorganismen aufzeigt, erfolgt die Inaktivierung der Dauerstadien aerober und anaerober Sporenbildner erst bei Temperaturen ab 100 °C (Abbildung 36).

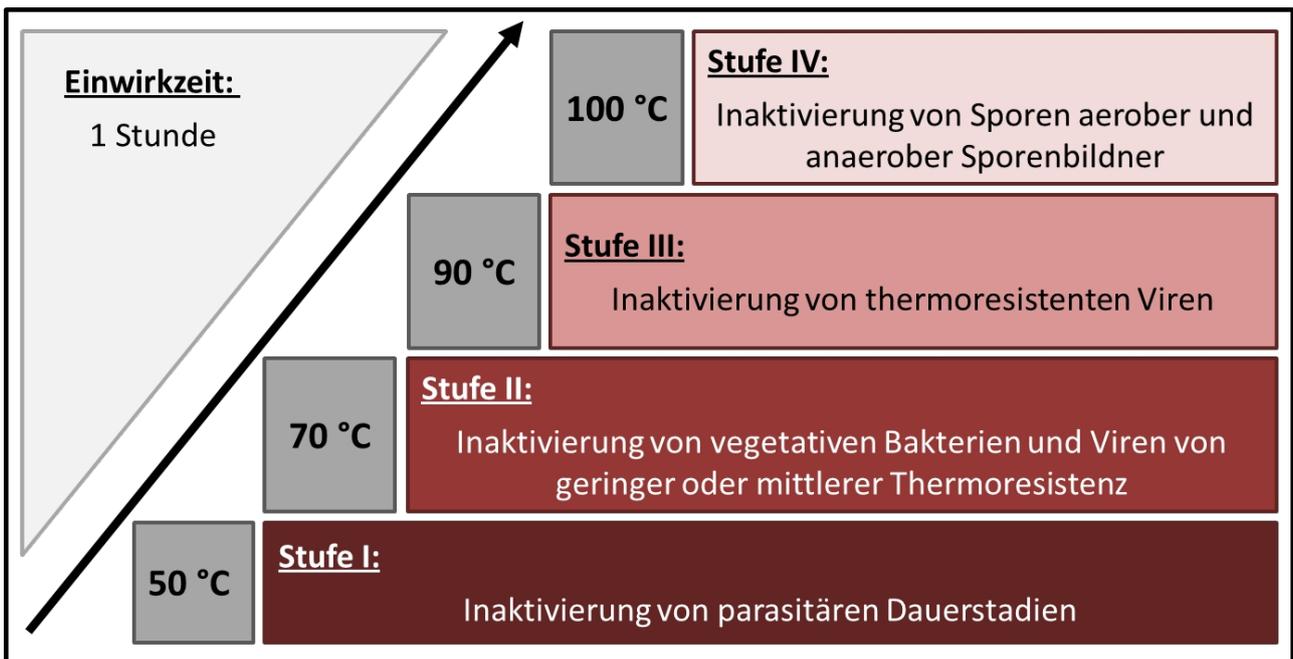


Abbildung 36: Stufen der Widerstandsfähigkeit von Krankheitserregern und Prüforganismen im Hinblick auf ihre Inaktivierung bei thermischer Behandlung nach Böhm (2007); entnommen aus: KTBL-Schrift 453, „Perspektiven der Klärschlammverwertung“

Demnach kann davon ausgegangen werden, dass thermische Behandlungsverfahren ein sehr zuverlässiges Mittel zur Abtötung von Mikroorganismen sind. Thermische Behandlungsverfahren sollten laut Philipp (1981) vor oder während der biologischen Stabilisierung angewendet werden. Die Inaktivierungsrate hängt dabei sowohl von der Höhe der Temperatur, als auch von der Dauer des Einwirkens der Temperatur ab. Mit niedrigen Temperaturen, die über einen längeren Zeitraum wirken, kann oft ein ähnliches Ergebnis erzielt werden, wie bei der Anwendung höherer Temperaturen für einen kürzeren Zeitraum (Wasiak, 2009).

Tabelle 43 zeigt u.a. eine Übersicht jener Verfahren aus Anlage 2 des Entwurfes zur Novellierung der Abf-KlärV, bei denen die Temperatur eine Rolle bei der Inaktivierung von Schadorganismen spielt. Auf Grund der obigen Informationen, kann davon ausgegangen werden, dass die Schlammpasteurisierung, die Thermische Konditionierung, die Kompostierung bei 65 °C sowie die Hochtemperaturtrocknung auf Grund der Temperaturwirkung geeignet sind, vegetative Zellen von im Klärschlamm befindlichen Krankheitserregern und Schadorganismen ausreichend zu reduzieren. Die Hochtemperaturtrocknung hatte sogar einen, wenn auch geringen, Effekt auf die Sporen von *Bacillus globigii* und wäre damit evtl. sogar geeignet Dauerstadien bildende Schadorganismen zu reduzieren, was allerdings durch weitere Untersuchungen überprüft werden müsste. Die Inaktivierung von Dauersori von *Synchytrium endobioticum* ist auch bei dieser Methode eher unwahrscheinlich, da sich die Dauerstadien als äußerst temperaturresistent erwiesen haben (siehe Abschnitt 4.2.4.1)

Hygienisierungsmaßnahmen zur Abtötung von tier- und humanpathogenen Erregern sollten auf die im Klärschlamm möglicherweise vorhandenen Erregern ausgerichtet sein. Sie sollten zudem eine Sicherheit mit einbeziehen, um das unterschiedliche Verhalten von Organismen einer Erregergruppe zu berücksichtigen, z. B. durch Verlängerung der Behandlungszeit oder einer Temperaturerhöhung. Durch Validierungsverfahren können Rahmenbedingungen für eine zuverlässige weitergehende Klärschlammbehandlung konkretisiert werden.

4.3.2 pH-Wirkung im alkalischen Bereich

Die desinfizierende Wirkung von Kalk beruht auf einer extremen Erhöhung des pH-Wertes auf einen Wert von mindestens 12,8 gleich zu Beginn der Behandlung. Mikroorganismen können in der Regel nur in dem pH-Wert-Bereich leben, an den sie sich angepasst haben. Die meisten Bodenbakterien entwickeln sich in einem pH-Wert-Bereich von 4,5 bis 10 (Husson, 2013). Bei pH-Werten über 10 sind nur spezialisierte Mikroorganismen, z.B. alkaliphile Bakterien lebensfähig, wobei die Obergrenze hier bei pH 12 liegt. Beim Einsatz von Branntkalk kommt eine thermische Wirkung hinzu. So kann der Schlamm infolge der exothermen Löschreaktion auf 60 °C und mehr erwärmt werden. Die Kombination beider Effekte verstärkt die Wirkung (Capizzi-Banas, 2004). Der Effekt hängt aber von der Einhaltung bestimmter Bedingungen ab. Dazu gehört eine partielle Entwässerung des zu kalkenden Klärschlammes auf einen TS-Gehalt von ca. 28 %, wie auch eine zügige Vermischung von Klärschlamm und Kalk. Bei Erreichen von Temperaturen über 50 °C kann eine bessere Reduktion der Mikroorganismen erreicht werden. Dokumentiert ist die Inaktivierung von Salmonellen und *E.coli* durch Bauer (2006). Laut Strauch und Berg (1980) werden bei pH-Werten zwischen 11 und 13 auch bei niedrigen Temperaturen Salmonellen innerhalb von 24 bis 48 Stunden sicher abgetötet. Koch und Strauch (1981) geben an, dass Branntkalk zur Desinfektion von im Klärschlamm enthaltenen Viren geeignet ist. Laut Schirm (2005) wirkt eine Kalkung auf pH-Werte über 12 auch gegen den Schweinespulwurm (*Ascaris suum*). Ein möglicher Einfluss auf Clostridien bzw. eine Inaktivierung von Clostridien-Sporen durch pH-Werte > 12 ist kurzzeitig nicht zu erwarten.

Durch pH-Wert-Erhöhung können auch Phytopathogene inaktiviert werden. Allerdings existieren für relevante Schadorganismen noch keine ausreichenden wissenschaftlichen Untersuchungen, so dass zu dieser Thematik nach wie vor Forschungsbedarf besteht. Aus dem Bereich der Phytohygiene ist lediglich die Inaktivierung von *Ralstonia solanacearum* dokumentiert. Laut Elphinstone (2001) wird *Ralstonia solanacearum* inaktiviert, wenn ein pH über 12 für mindestens 24 h auf den Erreger einwirkt. Auf den Erreger *Synchytrium endobioticum* hat eine Behandlung mit Kalk allerdings keine Wirkung. Langerfeld (1984) konnte beobachten, dass ein pH von 12,38 nur geringen Einfluss auf Dauersori des Erregers hatte. Auch Zysten der Kartoffelzystennematoden überleben laut Spaul et al. (1989) eine derart extreme pH-Wert-Verschiebung.

4.3.3 Kompostierung

Die hygienisierende Wirkung der Kompostierung beruht auf einer thermischen Wirkung, auf der Bildung toxisch bzw. antibiotisch wirkender Substanzen durch die Mikroflora und durch mikrobiellen Abbau. Die Kompostierung von Klärschlamm erfolgt unter Zugabe von Strukturmaterial. Zucker et al. (2011) beschreiben die Kompostierung als einen überwiegend aerob-thermophilen Prozess bei dem Temperaturen von 50 °C bis 55 °C erreicht werden. Für eine optimale Kompostierung sind laut Bauer (2006) ein Feuchtigkeitsgehalt von 50 %- 60 %, eine ausreichende Sauerstoffzufuhr und ein neutraler pH-Wert Voraussetzung. Der erzielte Effekt im Stapelkompost ist laut Bauer (2006) aus bakteriologischer Sicht ausreichend, wenn für eine Woche eine Temperatur von 55 °C erreicht wird oder die Kompostierung im Bioreaktor für 10 Tage bei einer Mindesttemperatur von 55 °C erfolgt. Laut Bioabfallverordnung (BioAbfV, 2013) muss die Kompostierung so erfolgen, dass über mehrere Wochen Temperaturen im thermophilen Bereich herrschen (Temperaturen von mindestens 55 °C über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen, von 60 °C für 6 Tage oder von 65 °C für 3 Tage). Des Weiteren ist eine hohe biologische Aktivität bei günstigen Feuchte- und Nährstoffverhältnissen zu gewährleisten, wie auch eine optimale Struktur und Luftführung. Dem wird im Entwurf zur Novellierung der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, -2010 bzw. 2013) Rechnung getragen, indem die Kompostierung von Klärschlamm unter Zugabe von Strukturmaterial zu erfolgen hat. Der Anfangsfeuchtegehalt soll mindesten 40-60 % betragen und es ist für eine ausreichende Belüftung zu sorgen. Die Kompostierung muss so gestaltet werden, dass in allen Teilen des Kompostes die für einen Hygienisierungseffekt notwendigen Temperaturen für die erforderliche Mindestzeit erreicht werden. Diese Temperaturvorgaben entsprechen somit denen der BioAbfV (2013). Hinsichtlich der Clostridienspezies ist davon auszugehen, dass die Sporen Kompostierungstemperaturen zwischen 60 - 70 °C über Wochen ohne Beein-

trächtigkeit überstehen. Da das natürliche Reservoir der Clostridien der Boden ist, muss auch im Kompost mit dem Vorkommen der verschiedensten Clostridienspezies als auch dem toxinbildenden *Clostridium botulinum*-gerechnet werden. Laut Quinn et al. (2001) können Sporen von *Clostridium perfringens* im Boden mehrere Monate überleben.

Das Vogelgrippevirus hat auf inerten Medien (z.B. Kunststoff, Holz etc.) eine Überlebensfähigkeit von 1 - 2 Tagen in Abhängigkeit von Temperatur und Feuchtigkeit belegt. Speziell für das humane Influenzavirus werden 2 - 8 Stunden angegeben. In organischem Material wie Körpersekret, Kot, etc. kann das Virus aber, v.a. bei niedrigen Temperaturen, einige Monate überstehen. Die Überlebenszeit in organischem Material (Kot, Geflügelfleisch und Eier) beträgt bei 4 °C 30 Tage, bei 20 °C zwischen 3 und 7 Tagen, bei 22 °C 4 Tage. In Flüssigmist kann das Virus bis zu 105 Tage infektiös bleiben. In gefrorenem Material ist die Haltbarkeit unbegrenzt. Temperaturen über 60 °C töten das Virus in 5 Minuten sicher ab. Es ist empfindlich gegen Hitze, Trockenheit, extreme pH-Werte (pH < 5 und > 11) und Desinfektionsmittel. Direktes Sonnenlicht inaktiviert das Virus ebenfalls. Desinfektionsmedien wie Formaldehyd oder Peressigsäure wirken zuverlässig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz nur geringer Haltbarkeit in der Außenwelt, bei Vorliegen des Virus in organischem Material bezogen auf die Wintermonate von einer längeren Infektionsfähigkeit ausgegangen werden kann. Nach den aus der Literatur entnommenen Angaben zur Tenazität reichen Prozesseinflüsse von Temperaturen > 55 °C in 2 Wochen in einer offenen Mietenkompostierung bzw. 65 °C über eine Woche in einer geschlossenen Anlage (Boxen- oder Containerkompostierung), wie sie nach der Bioabfallverordnung vorgeschrieben sind aus, um Geflügelpestviren zu eliminieren. Praktische Untersuchungen zum Überlebensverhalten von Geflügelpestviren in der Mietenkompostierung liegen bisher aber nicht vor.

Zu den als temperaturresistent bekannten Parvo-Viren sind in der Literatur D-Werte bei Temperaturen um 55 °C in Anaerobanlagen zwischen 4 und 20 h angegeben (Hoferer, 2001). Unter der Voraussetzung, dass bei einer sachgerechten Kompostierung in aller Regel Temperaturwerte um 60 °C und höher über zwei bis drei Wochen einwirken, ist davon auszugehen, dass dadurch alle bisher bekannten Viren inaktiviert werden.

Bei vorschriftsgemäßer Kompostierung werden auch zahlreiche pflanzenpathogene Erreger inaktiviert. So wird z.B. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* vollständig inaktiviert, wenn infiziertes Gewebe für 4 Stunden bei Temperaturen um 55 °C verkompostiert wird (Suarez-Estrella et al., 2003). Steinmüller et al. (2012) berichten das Zysten von *Globodera rostochkiensis* während einer Kompostierung von 7 Tagen bei 50 - 55 °C abgetötet werden. Suárez-Estrella et al. (2007) konnten in ihren Untersuchungen zur Kompostierung *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* ssp. *syringae*, *Rhizoctonia solani* und *Pythium ultimum* in den ersten vier Stunden eliminieren. Auch *Botrytis cinerea* wird durch Kompostierung zuverlässig abgetötet, wenn für mindestens 48 Stunden thermophile Temperaturen herrschen. Noble et al. (2009) geben an, dass die Phytopathogene *Fusarium culmorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia rolfsii*, *Thielaviopsis basicola* und *Verticillium dahliae* während einer Kompostierung 7 Tage bei 52 °C inaktiviert wurden. Die Kompostierung fand unter definierten Bedingungen im Labor statt. Die Wärmezufuhr erfolgte von außen über ein Wasserbad oder einen Inkubator und garantierte gleichbleibende Temperaturen über den gesamten Prüfzeitraum.

Bruns et al. (1993) haben die Überlebensfähigkeit von *Erwinia amylovora* in kommerziellen Kompostieranlagen untersucht und festgestellt, dass *Erwinia amylovora* nur abgetötet wird, wenn Temperaturen von mehr als 40 °C über einen Zeitraum von 7 Tagen auf das Kompostgut einwirken. Bei Temperaturen unter 40 °C überlebt *Erwinia amylovora* den Behandlungsprozess.

Es gibt allerdings auch Erreger von Pflanzenkrankheiten, die den Kompostierungsprozess überdauern. So stellten Bruns et al. fest, dass *Plasmodiophora brassicae* auch unter optimalen Kompostierungsbedingungen (Temperaturen >60 °C, Feuchtegehalt 50 %) nicht abgetötet wird. Dieses Ergebnis deckt sich mit Un-

tersuchungen von Noble et al. (2011). *Macrophomia phaseolina*, ein Pilz der in warmen Regionen Wurzelrotte an Bohnen und anderen Kulturpflanzen verursacht, überlebte ebenfalls den Kompostierungsprozess bei Temperaturen von 48 ° bis 62 °C (Lodha et al., 2002). Auch die beiden Quarantäneschadorganismen *S. endobioticum* und *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* können mittels Kompostierung nicht inaktiviert werden (Steinmüller et al., 2012).

Bereits Bruns et al. (1993) regen den Einsatz von Indikatororganismen zur Überprüfung des Hygienestatus von Kompost an. Diesbezügliche Untersuchungen von Noble et al. (2011) belegen, dass *Sclerotinia sclerotiorum*, *Microdochium nivale*, *Phytophthora cinnamomi* und *Phytophthora nicotianae* aufgrund ihrer geringen Temperaturtoleranz nicht als Indikatororganismen geeignet sind. Die Autoren empfehlen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* und f. sp. *radicis-lycopersici* und Tomatensamen für die Verwendung als geeignete Indikatororganismen. Diese Organismen lassen Aussagen zur Wirkung der Temperatur während des Kompostierprozesses in einem Zeitraum von zwei bis sechs Tagen zu und sind somit für eine Abschätzung des erreichten Hygienezustands geeignet.

4.3.4 Langfristige Aufbewahrung

Unter langfristiger Lagerung wird in Anlage 2 der AbfklärV die weitergehende Klärschlammbehandlung in Pflanz- oder Vererdungsbeeten vorgegeben. Wichtig bei der Lagerung in Beeten ist der Schutz vor Zugang von großen Schädigern und Wildtieren (Ratten, Füchse Wildschweine). Die sehr lange Behandlungsdauer, 12 Monate nach der letzten Beschickung zuzüglich einer anschließenden Lagerung des entwässerten, festen Materials für 6 Monate, kann zum Absterben von Salmonellen, Enterokokken und *Escherichia coli*, führen (Nielsen und Willoughby 2005). Aus den Ergebnissen der Untersuchungen zur Seuchenhygiene lässt sich ableiten, dass eine Reduktion der Konzentrationen hinsichtlich der Erreger EAHEC und *Salmonella* durch eine Langzeitlagerung wahrscheinlich erreicht wird, eine vollständige Inaktivierung pathogener Erreger aber nicht erreicht wird. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Avery et al. (2005), Himathongkham et al. (1999, 2000) und Mannion et al. (2007) (siehe Abschnitt und 4.1.3.5 und 4.1.1.4).

Für die phytopathogenen Erreger *Synchytrium endobioticum* und *Polymyxa betae* und auch die Zysten von *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* ist anzunehmen, dass eine langfristige Lagerung für eine vollständige Inaktivierung ebenfalls nicht ausreicht. Durch die Bildung von Überdauerungsorganen bleiben diese Erreger im Boden mehr als 10 Jahre lebensfähig (Asher und Blunt, 1987; Heijbroek, 1987; Turner, 1996; Stachewicz, 2003).

Eine längerfristige Lagerung von Klärschlamm in Schlammteichen bzw. -silos ist zwar kein in Anlage 2 aufgeführtes Behandlungsverfahren zum Zwecke der Hygienisierung von Klärschlamm, soll an dieser Stelle aber trotzdem angeführt werden, das eine derartige längerfristige Lagerung vor allem für kleinere Anlagen von Bedeutung ist. Hierbei werden sowohl Nassschlamm, aber auch entwässerte Schlämme in Schlamm lagern für eine längere Zeit zwischengelagert, um Ausbringungsbeschränkungen bei der landwirtschaftlichen Verwertung zu überbrücken bzw. um bei externen Dienstleistern genügend große Mengen für eine wirtschaftliche Entwässerung bereit stellen zu können. Laut Klages et al. (2009) werden die Klärschlämme in der Regel für mehrere Monate gelagert. Über die für eine ausreichende Reduktion von Krankheitserregern notwendige Dauer der Lagerung von Klärschlamm, liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Haible (1988) gibt an, dass Lagerungszeiten von wenigen Monaten bis zu mehr als einem Jahr ausreichen um Erreger der Seuchenhygiene abzutöten (Haible, 1988). Demnach waren bereits nach fünfmonatiger Lagerungszeit keine Salmonellen mehr im Klärschlamm nachzuweisen. Enteroviren wurden innerhalb von 11 Monaten abgetötet, Askarideneier waren zu diesem Zeitpunkt noch zu 14 % lebensfähig.

4.3.5 Hochtemperaturtrocknung

Das Verfahren der Hochtemperaturtrocknung dient in erster Linie einer Verbesserung der Transporteigenschaften von Klärschlamm. Durch die Verdunstung des Wassers verringern sich Gewicht und Volumen, was

letztendlich Kosten reduziert. Des Weiteren verbessern sich die Lagerungs- und Transporteigenschaften, sowie die Dosierbarkeit. In Veröffentlichungen zu diesem Verfahren wird immer auch die erreichbare hygienische Unbedenklichkeit angegeben, (Wiechmann et al., 2012; Müßig, 2004; Müllhandbuch). Begründet ist dies durch die Annahme, dass die zur Anwendung gebrachte Temperatur diesen Effekt bewirkt. Laut Klages (2009) wird das Medium (Luft, Wasser, etc.) durch Zufuhr von Energie auf Temperaturen zwischen 100 °C und 450 °C erhitzt. Allerdings wird nicht angegeben für welchen Zeitraum. Es wird davon ausgegangen, dass Krankheitserreger ausreichend inaktiviert werden, wenn mindestens gleiche Bedingungen, wie bei der Pasteurisierung erreicht werden (Möller, 1988).

Bisher fehlen allerdings Untersuchungen zur Wirksamkeit dieses Behandlungsverfahrens auf widerstandsfähige pflanzenpathogene Erreger. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass eine Wirksamkeit gegenüber *Synchytrium endobioticum* nicht gegeben ist, wenn der Trocknungsprozess nur wenige Minuten dauert (siehe Abschnitt 4.2.4.1 Zusammenfassung und Diskussion). Dies lässt sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen zur Wirksamkeit der Hochtemperaturpelletierung ableiten (Abschnitt 4.1.3.6 und 4.1.4.5) Das Verfahren der Hochtemperaturpelletierung, bei dem im Presskanal für wenige Sekunden Temperaturen zwischen 90 °C und 150 °C und ein Druck von etwa 250 MPa erreicht werden, führte zu einer vollständigen Inaktivierung bzw. einer Reduktion um 4,5 bzw. 4,7 log₁₀-Stufen der Keime *E. coli* K12 bzw. *S. Zoosoral*. Des Weiteren kann von einer Inaktivierung von *Salmonella* ssp. und *Escherichia coli*, inklusive des enteroaggregativen hämorrhagischen *Escherichia coli* (EAHEC) Serovar O104:H4 ausgegangen werden. Demgegenüber wurde der Sporenbildner *Bacillus globigii*, der für die Untersuchungen als biologischer Tracer fungierte, nicht vollständig inaktiviert. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Dauersori des Erregers *S. endobioticum* ebenfalls nicht inaktiviert werden.

4.3.6 Diskussion

Die in Anhang 2 des Entwurfes zur Novellierung der AbfklärV (2010 und 2013) aufgeführten weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren, sind nach aktuellem Wissenstand geeignet, außer sporenbildenden Bakterien alle aus seuchenhygienischer Sicht relevanten Erreger im Klärschlamm zu inaktivieren. Dies wurde bereits in der 80-er Jahren beschrieben und dokumentiert (ATV/VKS, 1986; ATV/VKS, 1988 a+b). Dies verdeutlicht auch Tabelle 45, in der die in Anlage 2 (AbfklärV, 2010 und 2013) aufgeführten weitergehenden Behandlungsverfahren aufgelistet sind. Des Weiteren ist aufgeführt, welche Rahmenbedingungen eingehalten werden müssen um eine ausreichende Inaktivierung zu gewährleisten und für welche Erreger der Seuchen- bzw. Phytohygiene eine Inaktivierung bzw. ein Überleben in der Literatur belegt ist. Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Bei Anwendung der Verfahren unter Einhaltung aller Vorgaben der Entwürfe zur AbfklärV (2010 und 2013) kann weitgehend gewährleistet werden, dass die landwirtschaftliche Klärschlammausbringung aus seuchenhygienischer Sicht unbedenklich ist. Dies schließt auch die in 2011 aufgetretene EAHEC-Variante (enteroaggregative hämorrhagische *Escherichia coli*) mit ein. Auch die Mehrzahl der bekannten Viren, insbesondere das epidemiologisch interessante Afrikanische Schweinepest-Virus (ASFV), das sich momentan, ausgehend von Russland über Weißrussland nach Litauen und Polen verbreitet, kann über die beschriebenen Behandlungsverfahren inaktiviert werden. Dieser Umstand ist aus seuchenprophylaktisch-epidemiologischer Sicht in ländlichen Räumen von enormer Bedeutung, da Wildschweine in aller Regel in großen Horden leben und durch ihre Neugier und den Bewegungsdrang auch in die Nähe von Kläranlagen vorkommen. Damit ist ein Eintrag von ASFV über Wildschweine in die Abwasserkanalisation in befallenen Regionen nicht auszuschließen.

Die Pasteurisierung (Vorpasteurisierung) bei Temperaturen von 70 °C/1h ist aus seuchenhygienischer Sicht ein sicheres, einfaches und zuverlässiges Verfahren für die Inaktivierung von Krankheitserregern in Klärschlämmen (Philipp, 1981). Das Verfahren bzw. die Verfahrensprozesse sind einfach zu steuern und leicht zu überwachen. Wichtig ist allerdings, dass sich dem Pasteurisierungsprozess eine Faulung anschließt. Bei

Anlagengrößen zwischen 50.000 und 300.000 EW betragen die Kosten der Pasteurisierung etwa 2 bis 3 € je angeschlossenen Einwohner. Durch den mit der Pasteurisierung verbundenen Zellaufschluss erhöht sich allerdings auch der Gasertrag aus dem Behandlungsprozess, was bei entsprechender Verwertung wiederum zu einer Verminderung der Behandlungskosten führen würde (KTBL, 2008).

Es gibt aber auch Erreger, die aufgrund ihrer physiologischen Besonderheiten durch die genannten Verfahren nicht oder nicht ausreichend inaktiviert werden können. In der Seuchenhygiene betrifft dies *Clostridium* spp., deren Sporen durch keines der Verfahren inaktiviert werden, was die im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Untersuchungen belegen. Der Anspruch, auch sporenbildende Bakterien (z. B. *Clostridien*) zu inaktivieren, stellt sich aber so auch nicht, da viele Vertreter dieser Gattung (apathogene und pathogene Arten) normale „Umweltkeime“ sind. Sie lassen sich in vielen organischen Substraten und im Erdboden in unterschiedlichsten Konzentrationen nachweisen.

Auch bei den Phytopathogenen gibt es Vertreter, die sich durch keines der Verfahren inaktivieren lassen, insbesondere der Erreger des Kartoffelkrebses, *Synchytrium endobioticum*. Steinmüller et al. (2012 und 2013) berichten, dass auch *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* die Schlammpasteurisierung überdauert. Für Samen der Samtpappel (*Abutilon theophrasti*) ist ein Überdauern der Schlammpasteurisierung ebenfalls sehr wahrscheinlich. Laut Bloemhard et al. (1992) können die Samen eine Erhitzung auf über 100 °C für 15 min überdauern. Die Schlammpasteurisierung erfolgt bei 70 °C für 60 Minuten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Mehrzahl der seuchen- und phytopathogenen Erreger über die in Anlage 2 der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) aufgeführten weitergehenden Behandlungsmethoden relativ sicher inaktiviert werden. Ausnahmen bilden Organismen, die persistente Überdauerungsorgane bilden, wie *Clostridien* spp. bzw. *S. endobioticum*. In Abhängigkeit vom Behandlungsverfahren gehören auch Zysten der Kartoffelzystennematoden, thermoresistente Viren und hartschalige Unkrautsamen, wie z. B. die Samen der Samtpappel, zu den nicht inaktivierbaren Organismen.

Tabelle 43: Behandlungsverfahren, die in Anlage 2 des Entwurfes zur Novellierung der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) gelistet sind, als weitergehende Verfahren zur Hygienisierung von Klärschlamm, deren zugrundeliegende Wirkmechanismen, einzuhaltende Konditionen sowie deren Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen

Behandlungsverfahren	Wirkmechanismen	Einzuhaltende Konditionen	Inaktivierung gewährleistet für	Beispiele phytopathogener Erreger, für die keine Hygienisierung gewährleistet ist <u>(keine vollständige Auflistung)</u>
Schlamm-pasteurisierung	<ul style="list-style-type: none"> • Fremderhitzung • Temperatur-Zeit-Kombination 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhitzung auf mindestens 70 °C für mindestens 60 min <p>Zusätzlich:</p> <ul style="list-style-type: none"> • maschinelle Zerkleinerung größerer Bestandteile vor der Erhitzung (Größe darf 12 mm nicht überschreiten) 	<ul style="list-style-type: none"> • vegetative Pilze und Bakterien (Böhm, 2007); • Seuchenhygienische Unbedenklichkeit gewährleistet (außer für <i>Clostridien</i> ssp.) • Viren (außer <i>Parvo-Viren</i>) (Hoferer, 2001; Drca, 2007; Ade-Kappelmann, 2008) • Parasiten (Zucker et.al. 2011) • Zysten von <i>Globodera rostochiensis</i>; abgetötet bei 70 °C für 30 min (Steinmüller et al., 2012) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i> (siehe Abschnitt 4.2.4.1 und Steinmüller et al. 2012 und 2013) • <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>; überlebt 90 min bei 70 °C (Steinmüller 2013) • Samen von <i>Abutilon theophrasti</i> (überleben laut Bloemhard et al. (1992) Erhitzung auf über 100 °C für 15 min) • Thermostabile Viren fraglich
Thermische Konditionierung	<ul style="list-style-type: none"> • Fremderhitzung • Temperatur-Zeit-Kombination • Druck 	<ul style="list-style-type: none"> • Druck: 15 bar • Temperatur: 80 °C • Zeitspanne: 45 min 	<ul style="list-style-type: none"> • vegetative Pilze und Bakterien (Böhm, 2007); • Seuchenhygienische Unbedenklichkeit gewährleistet (außer für <i>Clostridien</i> ssp.) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i> (siehe Abschnitt 4.2.4.1) • In Literatur keine Angaben zu <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> vorhanden, sollte überprüft werden • Thermostabile Viren fraglich

Behandlungsverfahren	Wirkmechanismen	Einzuhaltende Konditionen	Inaktivierung gewährleistet für	Beispiele phytopathogener Erreger, für die keine Hygienisierung gewährleistet ist <i>(keine vollständige Auflistung)</i>
Aerob-thermophile Schlammstabilisierung	<ul style="list-style-type: none"> • Selbsterhitzung und chemische Reaktionswärme • Temperatur-Zeit-Kombination • pH-Werterhöhung auf pH 8 (durch exotherme mikrobielle Abbau- und Stoffwechselfvorgänge) 	<ul style="list-style-type: none"> • Aktive Luft- bzw. Sauerstoffzufuhr (Begünstigung aerober Mikroorganismen, Förderung des mikrobiellen Abbaus, Bildung antagonistisch wirkender Stoffwechselprodukte) • Richtige Bemessung der Luftzufuhr • Gute Wärmedämmung des Reaktionsbehälters • Ausreichender TS-Gehalt • Semikontinuierlicher Betrieb, mindestens zweistufig (zwei in Reihe geschaltete Reaktionsbehälter) • Mindestens 55 °C für 22 Stunden im zweiten Behälter 	<ul style="list-style-type: none"> • vegetative Pilze und Bakterien (Böhm, 2007); • Seuchenhygienische Unbedenklichkeit gewährleistet (außer für <i>Clostridien</i> spp.) • <i>Ralstonia solanacearum</i> (laut Termorshuizen (2003) nach 6 Wochen bei 40 °C Reduktion des Erregers bis in die Nähe der Nachweisgrenze, aber kein vollständiges abtöten) • <i>Cryptosporidien</i> spp. (Meyer, 2002) • <i>Ascaris suum</i> (Bauer (2006) • Zysten von <i>Globodera</i> spp. (Spaull und McCormack, 1989; Spaull et al. 1989) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i> (siehe Abschnitt 4.2.4.1 und Steinmüller et al. 2012) • Thermostabile Viren fraglich

Behandlungsverfahren	Wirkmechanismen	Einzuhaltende Konditionen	Inaktivierung gewährleistet für	Beispiele phytopathogener Erreger, für die keine Hygienisierung gewährleistet ist <u>(keine vollständige Auflistung)</u>
<p>Schlammkompostierung in Mieten sowie Kompostierung von Klärschlamm in Reaktoren</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatur-Zeit-Kombination • Bildung von antibiotisch wirkenden Stoffwechselprodukten der Mikroflora • mikrobieller Abbau • Anreicherung toxischer Komponenten (organische Säuren, Ammoniak) • lytische Wirkung gebildeter Enzyme 	<ul style="list-style-type: none"> • Zusatz von Strukturmaterial • Anfangswassergehalt mind. 40 - 60 % • Belüftung des Mischgutes (Umsetzen der Mieten, Zwangsbelüftung) • Wirksamer Temperaturbereich muss für jeden Teil des Mischgutes für die erforderliche Dauer gewährleistet werden <p><u>einzuhaltende Temperatur-Zeit-Kombinationen:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 55 °C für 2 Wochen • 60 °C für drei Tage (in geschlossenen Anlagen; z.B. in Containern) • 65 °C für drei Tage 	<ul style="list-style-type: none"> • Salmonellen und <i>E. coli</i> (Strauch, 1980 a, 1980 b) • Seuchenhygienische Unbedenklichkeit gewährleistet (außer für <i>Clostridium</i> ssp.) • <i>Globodera rostochiensis</i> ; vollständig abgetötete Zysten bei mind. 50 °C für 8 Tage (Bøen et al. 2006, Steinmüller et al. 2012) • <i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>, <i>Pseudomonas syringae</i> ssp. <i>syringae</i>, <i>Rhizoctonia solani</i> und <i>Pythium ultimum</i> (Elorrieta et al. (2003), Suárez-Estrella et al., 2007) • <i>Erwinia amylovora</i> (Bruns et al., 1993) • <i>Botrytis cinerea</i> (Ghaly et al., 2006) • <i>Fusarium culmorum</i>, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, <i>Sclerotinia rolfsi</i>, <i>Thielaviopsis basicola</i> und <i>Verticillium dahliae</i>; Inaktivierung unter definierter Kompostierung für 7 Tage bei 52 °C im Labor (Noble et al., 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i> (Steinmüller et al., 2012) • <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>, überlebt Kompostierung für 6 Tage mit max. 70 °C und 13 Tage mit max. 55 °C (Steinmüller et al., 2013) • <i>Macrophomina phaseolina</i> (Lodha et al., 2002) • <i>Plasmodiophora brassicae</i> (Noble et al., 2011, Bruns et al., 1993, Idelmann, 2005)

Behandlungsverfahren	Wirkmechanismen	Einzuhaltende Konditionen	Inaktivierung gewährleistet für	Beispiele phytopathogener Erreger, für die keine Hygienisierung gewährleistet ist <i>(keine vollständige Auflistung)</i>
Zugabe von ungelöschtem Branntkalk zum Klärschlamm	<ul style="list-style-type: none"> • Erwärmung infolge exothermer Reaktion von CaO mit noch vorhandenem Wasser des zuvor entwässerten Klärschlammes • Extreme pH-Wert-Erhöhung 	<ul style="list-style-type: none"> • mind. 55 °C • Anfangs-pH-Wert des Klärschlamm-Kalk-Gemisches mind. 12,8 • Herstellung des Klärschlamm-Kalkgemisches mit Doppelwellenmischer 	<ul style="list-style-type: none"> • Seuchenhygienische Unbedenklichkeit gewährleistet (außer für <i>Clostridien</i> ssp.) • Salmonellen, <i>E.coli</i> (Bauer, 2006) <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris suum</i> (Schirm, 2005). • <i>Ralstonia solanacearum</i> (laut, Elphinstone (2001) absterben bei pH über 12 für mindestens 24 h) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i> (laut Langerfeld (1984) nur geringer Einfluss von pH 12,38 auf Dauersori des Erregers); keine Inaktivierung bei Temperatur von 55 °C (siehe Abschnitt 4.2.4.1.) • Zysten der Kartoffelzystennematoden (Spaull et al., 1989)
Zugabe von Kalkhydrat im Zuge der Schlammbehandlung (z. B. bei der Schlammkonditionierung)	<ul style="list-style-type: none"> • Extreme pH-Wert-Erhöhung • Zeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von Kalkmilch zu flüssigem Klärschlamm (mind. 0,2 kg Ca(OH)₂/kg TM) • Anfangs-pH-Wert des Klärschlamm-Kalk-Gemisches mind. 12,8 • Einwirkzeit mind. 3 Monate 		

Behandlungsverfahren	Wirkmechanismen	Einzuhaltende Konditionen	Inaktivierung gewährleistet für	Beispiele phytopathogener Erreger, für die keine Hygienisierung gewährleistet ist <u>(keine vollständige Auflistung)</u>
<p>Klärschlammbehandlung in Pflanzenbeeten</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Langfristige Aufbewahrung • Mineralisierung und Aufnahme der organischen Substanz durch Schilf oder Flechtbinsen 	<ul style="list-style-type: none"> • Gewährleistung von Mindestverweilzeiten und beschickungsfreien Zeiten • Beete müssen mit Basis- und Seitenabdichtung ausgestattet sein • Durchgängig gleichmäßiger Pflanzenbewuchs der Beete <p><u>Voraussetzungen für Schaderregerreduzierung:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Beet vor Räumung mindestens 12 Monate lang nicht mehr mit Klärschlamm oder Abwasser beschicken • Pflanzbeet anschließend entwässern; festes Substrat 6 Monate lang lagern 	<ul style="list-style-type: none"> • Seuchenhygienische Unbedenklichkeit gewährleistet (außer für <i>Clostridium</i> spp.) • Absterben von Enterokokken und <i>Escherichia coli</i> (Nielsen und Willoughby, 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i>, <i>Polymyxa betae</i>, Zysten von <i>Globodera rostochiensis</i> und <i>G. pallida</i> (Bildung von Überdauerungsorganen die im Boden mehr als 10 Jahre lebensfähig bleiben) (Asher und Blunt, 1987; Heijbroek, 1987; Turner, 1996; Stachewicz, 2003). • Reduktion von EAHEC und <i>Salmonella</i> bis unter die Nachweisgrenze, aber kein vollständiges abtöten (siehe Abschnitt 4.1.3.5)

Behandlungsverfahren	Wirkmechanismen	Einzuhaltende Konditionen	Inaktivierung gewährleistet für	Beispiele phytopathogener Erreger, für die keine Hygienisierung gewährleistet ist <u>(keine vollständige Auflistung)</u>
Hochtemperaturtrocknung (HTT)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatur 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhitzung des Mediums (Luft/Wasser etc.) auf über 100 °C (bis > 450 °C)* • Volltrocknung auf TM-Gehalt von 90-95% (Innen und Außen) 	<ul style="list-style-type: none"> • vegetative Pilz- und Bakterienzellen • seuchenhygienische Unbedenklichkeit gegeben, wenn mindestens gleiche Bedingungen wie bei Pasteurisierung erreicht werden (Möller, 1988). • Für sporenbildende Bakterien und thermoresistente Schadorganismen weitere Untersuchungen notwendig 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Synchytrium endobioticum</i> (siehe Abschnitt 4.2.4.1)

* Temperatur des Wärmeübertragenden Mediums (z.B. Wasser, Luft); Höhe vom Trocknungsverfahren abhängig (Klages et al., 2009)

4.4 Hygieneaspekte bei der Qualitätssicherung von Klärschlammprodukten

4.4.1 Einleitung

In Deutschland haben sich verschiedene Träger einer Qualitätssicherung für Klärschlammprodukte und deren Verwertung etabliert, um Qualität und Akzeptanz der Klärschlammmanwendung in der Landwirtschaft zu verbessern. Die bestehenden Qualitätssicherungssysteme, z.B. der Qualitätssicherung landbaulicher Abfallverwertung e.V. (QLA) und des Verbandes zur Qualitätssicherung von Düngung und Substraten e.V. (VQSD), unterstützen Kläranlagenbetreiber bzw. Verwerter von Klärschlämmen bei der Einhaltung gesetzlicher Vorgaben oder gehen in ihren inhaltlichen Anforderungen z.T. auch über die gesetzlichen Vorgaben hinaus.

Die Düngemittelverordnung (DüMV, 2012) honoriert bereits die Mitgliedschaft in einem Qualitätssicherungssystem gemäß § 5 Abs. 3 Nr. 2, indem auch die überregionale Aufbringung von Klärschlamm entsprechend den Anwendungsvorgaben in § 5 Abs. 3 Nr. 1 erlaubt ist, wenn die Abgabe an Personen erfolgt, die den Klärschlamm im Rahmen ihrer beruflichen Tätigkeit anwenden. Die seuchenhygienischen Anforderungen gelten als eingehalten, ohne dass eine Laboruntersuchung die Freiheit von Salmonellen in 50 g Boden bestätigt hat. Die Novellierung der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 2010 bzw. 2013) sieht ebenfalls die Einführung von Regelungen zur Qualitätssicherung vor und verbindet damit Erleichterungen im Bereich der Hygiene. Diese Erleichterungen betreffen die Befreiung von den in Abschnitt 5.1 diskutierten weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren und die Untersuchung des Klärschlammes auf Salmonellen.

Angesichts der bekannten seuchen- und phytohygienischen Risiken stellt sich die Frage, welches hygienische Schutzniveau mit Gütesicherungsmaßnahmen erreicht wird und welche Risikomanagementoptionen Erleichterungen für gütegesicherte Klärschlämme im Bereich der Hygiene rechtfertigen.

4.4.2 Vorgesehene Maßnahmen der Qualitätssicherung in der Klärschlammverordnung

Das Hauptziel der AbfKlärV (1992) besteht darin, die mit der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung verbundenen Schadstoffeinträge in den Boden sowie die seuchen- und phytohygienischen Risiken zu begrenzen. Zur Verbesserung des Hygienestatus von Klärschlamm sehen die Entwürfe zur Novellierung der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) zusätzlich zu den Anwendungsverböten und -vorgaben eine Behandlungspflicht mit den in Kapitel 5.1 genannten Verfahren vor. Nach den Entwürfen der AbfKlärV von 2010 bzw. 2013 darf in Anlehnung an § 5 Absatz 1 und Absatz 2 der DüMV (2012) Klärschlamm zudem nur abgegeben werden, wenn im Klärschlamm in 50 g keine Salmonellen nachweisbar sind. Ferner sind umfassende Anforderungen an eine freiwillige Qualitätssicherung enthalten. Diese beinhalten Anforderungen an die Träger der Qualitätssicherung und inhaltliche Aspekte von der Entstehung bis zur Aufbringung des Klärschlammes. Bei Anwendung eines Qualitätssicherungssystems sind weitreichende Erleichterungen von den Hygieneanforderungen bei der Klärschlammabgabe vorgesehen. So gelten die Anforderungen an die Hygiene auch ohne Behandlungspflicht als eingehalten, wenn an einer Qualitätssicherung teilgenommen wird. Qualitätssicherungssysteme, die ursprünglich für Komposte eingeführt wurden und inzwischen andere organische Dünger abdecken, u.a. auch Gärprodukte, sollen nach den Entwürfen zur Novellierung der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) bei der Anwendung im Klärschlammbereich nur die Gehalte von Schwermetallen und die Summe der organischen Halogenverbindungen als adsorbierte organisch-gebundene Halogene sowie der organischen Schadstoffe Benzo(a)pyren und perfluorierte Chemikalien mit den Einzelsubstanzen Perfluorooctansäure und Perfluorooctansulfonsäure berücksichtigen. Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen, wie sie bei allen anderen organischen Düngern mit Qualitätszeichen durchgeführt werden, sind allerdings nicht vorgesehen.

Daraus ergeben sich verschiedene Konsequenzen:

- beim Klärschlamm aus einem Qualitätssicherungssystem sind hygienische Gesichtspunkte nicht gebührend berücksichtigt und die Verhältnismäßigkeit zu den Qualitätszeichen anderer Produkte bzw. organischen Düngern ist nicht gegeben und
- qualitätsgesicherte Klärschlämme weisen vermutlich ein höheres seuchenhygienisches Risiko auf als Klärschlämme, die einem weitergehenden Behandlungsverfahren und einer Untersuchung auf Salmonellen unterzogen wurden, da bei richtiger Funktionsweise der weitergehenden Behandlungsverfahren für Klärschlämme davon ausgegangen werden kann, dass alle relevanten, nicht sporenbildenden Bakterien und Viren sowie Parasitendauerstadien soweit reduziert bzw. inaktiviert werden, dass von ihnen keine Infektionsgefahr mehr für Mensch und Tier ausgeht.
- Aus seuchenhygienischer Sicht sind qualitätsgesicherte Klärschlämme und solche, die einem weitergehenden Behandlungsverfahren unterzogen wurden nur dann in etwa gleichrangig zu beurteilen, wenn mikrobiologische Ergebnisse vorliegen und diese entsprechend interpretiert werden können.

4.4.3 Bewertung hygienischer Risiken durch einen Träger der Qualitätssicherung

Die Bewertung von Gesundheitsrisiken erfolgt heute durch die so genannte Risikoanalyse. Nach Forsythe (2010) besteht sie aus drei Komponenten:

- die Risikoeinschätzung: sie identifiziert das Risiko und Faktoren, die es beeinflussen
- das Risikomanagement: es zeigt, wie das Risiko kontrolliert oder verhindert werden kann;
- und die Risikokommunikation: sie informiert andere über das Risiko.

Die Risiko-Abschätzung in der modernen Risikoforschung erfordert die Erstellung „begründbarer“ Risikoprognozen, da es ein „Null-Risiko“ nicht geben kann. Sie beinhaltet die Gefahren-Erkennung, in Form einer qualitativen Einschätzung des Risikos. Zur Erkennung mikrobiologischer Gefahren werden vor allem epidemiologische Daten sowie Daten der phänotypischen und genotypischen Merkmale der Mikroorganismen verwendet.

Bei der Gefahren-Charakterisierung soll das Ausmaß der gesundheitlichen Schäden erfasst werden (quantitative Schätzung). Bei mikrobiologischen Risiken spielt die Abschätzung der minimalen Infektionsdosis eine zentrale Rolle (Dosis-Wirkungsbeziehung). Diese ist wiederum abhängig von der Pathogenität und Virulenz des Erregers, sowie der Abwehrkraft des Menschen (Disposition). Als Grundlage dienen gezielte Untersuchungen sowie Daten aus Überwachungsprogrammen (z. B. aus Lebensmittelvergiftungen), Bevölkerungscharakteristiken und Tierversuchen. Die Expositionsabschätzung beinhaltet eine qualitative und quantitative Auswertung der möglichen Aufnahme des Erregers. Aufgrund der Ergebnisse der Gefahren-Identifizierung, Gefahren-Charakterisierung und Expositionsabschätzung (Eigenschaften des Erregers, Disposition des Menschen, Exposition des Menschen), wird ein quantitativer Schätzwert ermittelt, der die Erkrankungshäufigkeit pro 100.000 Einwohner beschreibt. Neben der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Erkrankung in der Bevölkerung, soll auch die Schwere der daraus resultierenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen beschrieben werden. Wesentlich ist die Abschätzung des Risikos für bestimmte Bevölkerungsgruppen, z. B. immungeschwächte Personen, inklusive der Angabe über gegebene Unsicherheiten der Schätzung. Die Ergebnisse der Risikoabschätzung stellen Entscheidungshilfen bei der Auswahl von geeigneten Maßnahmen zur Minimierung eines Risikos dar.

Das Risiko-Management liegt in erster Linie in der Verwaltungsebene bzw. bei den politischen Entscheidungsträgern. Im Rahmen der Risiko-Handhabung sollen Sicherheitsziele definiert werden, um ein angemessenes Gesundheitsschutzniveau festzulegen. Sicherheitsziele sind definiert als „die maximale Häufigkeit und/oder Konzentration einer mikrobiologischen Gefährdung, die das für den Gesundheitsschutz angemessene Niveau gewährleistet“. Im Rahmen der Risiko-Vermittlung soll es zu einem Austausch von In-

formationen über bestehende Risiken kommen und zwar zwischen Personen, die die Risiken einschätzen und denen, die sie handhaben, sowie interessierte Gruppen (Zangerl, 2007).

Es ist inzwischen unbestritten, dass pathogene Erreger aus organischen Düngern sowohl über die Blattoberfläche als auch über den Wurzelpfad das Innere einer wachsenden Pflanze besiedeln können. Die Mechanismen, mit denen sich enterale Pathogene an die Oberfläche von Pflanzenblättern und -wurzeln anheften können, wie auch die Pathogenitätsfaktoren, die von den Pathogenen für die Adhärenz an die Pflanze verwendet werden, sind denen der Phytopathogene ähnlich. Die molekularen Mechanismen sind allerdings weitestgehend unklar (Garcia et al., 2013; Kroupitski et al., 2009). Der Infektionsweg über den Boden, der gesamten Infektionszyklus von Salmonellen und *E. coli* unter Einbeziehung des Lebensraumes Boden-Pflanze-Umwelt und die Bedeutung dieses alternativen Habitats/Reservoirs für human- und tierpathogene Erreger, sind bisher nur in Ansätzen untersucht. Damit lässt sich das Infektionsrisiko für Mensch und Tier und somit die Infektionsdosis unter Feldbedingungen schwer bestimmen. Während z. B. die Infektionsdosis bei Salmonellen für Menschen bei 10^6 KbE/g Lebensmittel liegt, ist die Infektionsdosis für EHEC-Bakterien sehr gering und wird mit 10 - 100 KbE/g Lebensmittel angegeben. Somit besteht nach wie vor eine relativ hohe Unsicherheit für die Risikobewertung zur Kontamination von Pflanzen mit pathogenen Bakterien, insbesondere im Zusammenhang mit organischen Düngemitteln.

Im Bereich der Pflanzengesundheit existieren Vorgaben für die Risikobewertung von Quarantäneschadorganismen und Verbreitungswege (z.B. organische Düngemittel) auf der Grundlage eines internationalen FAO-Standards, der sich auf das Internationale Pflanzenschutzübereinkommen IPPC (1997) stützt. Bei dieser Risikoanalyse nach ISPM 11 (2013) handelt es sich ebenfalls um einen dreistufigen Prozess, in dem zunächst die Risikofaktoren analysiert und das daraus resultierende Risiko bewertet wird. Im dritten Schritt werden Managementoptionen zur Risikominderung ermittelt.

4.4.3.1 Allgemeine Bewertung von Risikofaktoren der Seuchen- und Phytohygiene

Laut § 17 Abs. 1 Nr. 4 des Entwurfes zur Novellierung der AbfKlärV von 2010 ist vorgesehen, dass die Anforderungen an die Seuchenhygiene ohne weitergehende Behandlung bzw. ohne den Nachweis der Freiheit an Salmonellen in 50 g Klärschlamm als eingehalten gelten, wenn bei der Bewertung hygienischer Risiken durch einen Träger der Qualitätssicherung festgestellt wurde, dass die hygienisierende Behandlung entbehrlich ist. Spezifische Mindestanforderungen sind nicht festgelegt, aber § 13 Abs. 4 fordert vom Träger der Qualitätssicherung, dass er die fachgerechte Anwendung, sowie die hygienischen Risiken auf der Grundlage eines Konzeptes bewertet. Es stellt sich daher die Frage, welche Daten der Träger einer Qualitätssicherung für die Risikobewertung heranziehen kann bzw. soll und unter welchen Bedingungen der Schluss gezogen werden kann, dass eine hygienisierende Behandlung entbehrlich ist. Im Entwurf zur Novellierung der AbfKlärV von 2013, ist die Risikobewertung nicht mehr ausdrücklich gefordert. Allerdings sieht § 16 Abs. 1 dieses Entwurfes weiterhin vor, dass ein Träger der Gütesicherung ein Konzept zur Minderung von hygienischen Risiken im Vorfeld der Klärschlammstehung zu erstellen hat. Das Konzept der Risikobewertung durch den Träger einer Qualitätssicherung wird im Folgenden in Hinblick auf seine Eignung zur Sicherung der Hygieneanforderungen geprüft.

Anhand des internationalen Standards für pflanzengesundheitliche Maßnahmen ISPM Nr. 11 (2013) kann u.a. der Frage nachgegangen werden, welches pflanzengesundheitliche Risiko von einem organischen Dünger unter praxisüblichen Bedingungen ausgeht. Nach Pietsch und Unger (2002) sollte die Bewertung von pflanzengesundheitlichen Risiken bezogen auf die Kreislaufwirtschaft die folgenden Aspekte beinhalten:

- Risiko des Eintrags von Schadorganismen der Ausgangsstoffe;
- Wirksamkeit durchgeführter Behandlungen;
- Anwendungsrisiken für Zielorganismen (Mensch, Tier, Pflanze):

Da dieser Ansatz auch auf seuchenhygienische Risiken anwendbar ist, sollen die drei vorgenannten Aspekte beispielhaft für die Risikobewertung durch einen Träger der Qualitätssicherung herangezogen werden.

4.4.3.2 Risiko des Eintrags von Schadorganismen der Seuchen- und Phytohygiene mit den Ausgangsstoffen

In der Einleitung (Kapitel 3) sind die vielfältigen Krankheitserreger und Parasiten von Mensch, Tier und Pflanze sowie die Unkräuter aufgeführt, die in unterschiedlicher Konzentration im Abwasser bzw. im Klärschlamm enthalten sein können. Aufgrund des Eintrags dieser Organismen ist ein permanentes seuchen- und phytohygienisches Risiko anzunehmen. Der Träger der Gütesicherung hat unter den gegenwärtigen Bedingungen kaum Möglichkeiten, auf den Eintrag von Schadorganismen ins Abwasser Einfluss zu nehmen. Üblicherweise ins kommunale Abwasser gelangende Schadorganismen der Seuchen- und Phytohygiene müssen als Basisrisiko hingenommen werden, da ihr Eintrag auf der Grundlage des bestehenden Abwassermanagements nicht beeinflussbar ist. Ein Verbot der Einleitung hygienisch problematischer Abwässer kann sinnvoll sein und würde eine hohe Effektivität besitzen. Es ist jedoch fraglich, ob die Träger der Qualitätssicherung den Eintrag beeinflussen können.

Hygienische Wirksamkeit von Abwasserbehandlungsverfahren

Auch wenn keines der unter 5.1 genannten weitergehenden Klärschlammbehandlungsverfahren zum Einsatz kommt, kann zumindest davon ausgegangen werden, dass die Kläranlagen aerobe und anaerobe Stabilisierungsverfahren anwenden. Die hygienisierende Wirkung dieser Verfahren ist aber gering. Steinmüller (2008) bewertet auf der Grundlage einer Literaturstudie die Wirkung der aeroben Stabilisierung bei Außentemperatur als unzureichend für die Inaktivierung von Quarantäneschadorganismen der Kartoffel (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Synchytrium endobioticum*, Kartoffelzystennematoden (*Globodera* spp.), *Ralstonia solanacearum* sowie von *Polymyxa betae* (Vektor für das *Beet necrotic yellow vein virus* an Rüben). Eine etwas bessere Wirkung erzielte die mesophile anaerobe Stabilisierung. Die Wirkung war zwar für die Inaktivierung von *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *S. endobioticum* und Kartoffelzystennematoden nicht ausreichend, aber es ist kein Risiko mehr anzunehmen im Hinblick auf *Ralstonia solanacearum* und *Polymyxa betae*. Anhand von vielfältigen Untersuchungen mit pflanzlichen Ausgangsstoffen konnte gezeigt werden, dass viele phytopathogene Nicht-Quarantäneschadorganismen, mit Ausnahme des thermostabilen Tabakmosaikvirus, durch die mesophile Vergärung innerhalb weniger Tage hinreichend reduziert werden (Haumacher et al, 2012). Hartschalige Unkräuter können länger überdauern (Weinhappel 2011). Chytil (1986) stellte fest, dass Klärschlämme aus Kläranlagen mit mechanischer Reinigung und Faulung oder mechanischer und biologischer Reinigung und Faulung bzw. mit ausschließlich biologischer Reinigung, eine große Anzahl von keimfähigen Samen enthalten können. Unkraut-, Kürbis- und Tomatensamen überlebten nach Leist und Gießler (1998) die mesophile, jedoch nicht die thermophile anaerobe Schlammstabilisierung. Die vorgenannten Abwasserbehandlungsverfahren reichen auch zur Inaktivierung von relevanten Infektionserregern der Seuchenhygiene nicht aus (Haible, 1989; Gmelin, 2009).

Nach Klages et al. (2009) ist in mehr als 2/3 der 10.000 Kläranlagen in Deutschland die simultane aerobe Stabilisierung vorherrschend. Der überwiegende Anteil des Klärschlammes hieraus wird als Nassschlamm verwertet. In weiteren 20 % der Anlagen erfolgt eine nachgeschaltete einstufige, mesophile Faulung, deren Klärschlamm nach weiterer Aufbereitung zum Teil landwirtschaftlich verwertet wird. Diese Zahlen machen deutlich, dass die überwiegende Mehrheit der Kläranlagen auf einem sehr niedrigen Hygieniveau arbeitet. Der Träger einer Gütesicherung wird daher im Regelfall davon ausgehen können/müssen, dass der landwirtschaftlich zu verwertende Klärschlamm hygienische Risiken birgt.

Anwendungsrisiken für Zielorganismen

Gütesicherungsmaßnahmen beziehen sich auch auf die Verwertung der Klärschlämme. Es stellt sich daher die Frage, ob der Träger einer Gütesicherung risikoärmere Verwertungsformen vorgeben kann, um eine Befreiung von der Behandlungspflicht zu rechtfertigen.

In der z.Z. geltenden Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992) wird der Hygiene im Wesentlichen durch Anwendungsverbote und -vorgaben Rechnung getragen. Aufbringungsverbote auf Gemüse- und Obstbauanbauflächen, Dauergrünland, forstwirtschaftliche Böden, Natur- und Wasserschutzgebiete sowie Anwen-

dungsbeschränkungen in Feldgemüse-, im Feldfutter- und Zuckerrübenanbau (sofern das Rübenblatt verfüttert werden soll), verfolgen vorrangig das Ziel, ein Zusammentreffen von Seuchenhygieneerregern und ihren Zielorganismen (Mensch und Tier) zu verhindern. Die Anwendungsverbote und -beschränkungen stellen sehr effektive und strenge Risikominderungsmaßnahmen dar. Im Hinblick auf eine Reduzierung des Anwendungsrisikos könnte die Gütesicherung einzelne Anwendungsbeschränkungen ggf. strenger vorgeben, wie z.B. längere zeitliche Abstände zwischen Klärschlammaufbringung und Anbau bzw. Nutzung.

Aus Vorsorgegründen schließt die QLA (2013) Schlämme, die aus der Abwasserreinigung von Betrieben mit industrieller Verarbeitung von Kartoffeln und Tabak kommen aufgrund der phytohygienischen Risiken von der Qualitätssicherung aus, sofern keine Hygienisierung erfolgt. Dies ist ein alternativer, risikomindernder Ansatz und ein gutes Beispiel für positive Gestaltungsmöglichkeiten einer Qualitätssicherung.

Eine Qualitätssicherung ist im Grundsatz zu befürworten, da im Rahmen der Fremdüberwachung eine zuverlässige Kontrolle der Klärschlammverwertung bzw. der Einhaltung der Anwendungsverbote und -beschränkungen erfolgt. Allerdings hat ein Träger der Gütesicherung bei der Verwertung nur geringfügige Spielräume für zusätzliche Risikominderungsmaßnahmen im Bereich Seuchen- und Phytohygiene, auf deren Basis sich ein Verzicht auf eine weitergehende Behandlung rechtfertigen ließe.

4.4.3.3 Risikobewertung durch Bestimmung von Indikatororganismen

Unter dem Blickwinkel der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung, wurden mögliche Verbreitungswege von EHEC, u.a. auch durch Klärschlämme, als mögliches Hygienierisiko in Erwägung gezogen, da angenommen wird, dass der EHEC-Epidemiestamm menschlicher Herkunft ist. Obwohl bereits stringente gesetzliche Vorgaben der Klärschlammverordnung bestehen, um den Übergang von Krankheitserregern in die menschliche Nahrung oder das Tierfutter zu verhindern, wird nachfolgend der Versuch unternommen, die hygienische Relevanz der Düngung mit Klärschlämmen hinsichtlich EHEC und auch bezüglich anderer Krankheitserreger zu bewerten. In Anbetracht der Tatsache, dass seit Jahren insbesondere das Problem der antibiotikaresistenten Bakterien bei der landwirtschaftlichen Verwertung des Klärschlammes eine besondere hygienische und umweltrelevante Bedeutung hat, sollten in einer novellierten Klärschlammverordnung nur noch weitergehend behandelte Klärschlämme landwirtschaftlich und landbaulich, sowie auf Rekultivierungsflächen angewandt werden.

Das Risiko eines Eintrags von EHEC und von anderen Krankheitserregern fäkalen Ursprungs, z. B. Salmonellen, *E. coli*, *Campylobacter*, *Listerien*, ESBL-Erreger etc., in die Nahrungskette des Menschen oder von Tieren, ist zwar reduziert, wenn Klärschlamm bestimmungsgemäß verwertet und unter Beachtung der Ausbringungsverbote und der Wartezeiten angewandt wird. Um das hygienische Risiko allerdings auf ein verantwortbares bzw. vertretbares Maß zu reduzieren, ist die Anwendung von Behandlungsverfahren für Klärschlämme unverzichtbar. Aus hygienischer Sicht kann die Vergabe eines Qualitätszeichens nicht den Verzicht auf eine Behandlung des Klärschlammes bedeuten oder rechtfertigen, da beide Maßnahmen inhaltlich verschieden sind und somit nicht miteinander verglichen werden können.

Eine sinnvolle Risikobewertung für Klärschlämme bei Verzicht auf die Klärschlammbehandlungsverfahren könnte anhand mikrobiologischer Untersuchungen im Rahmen der regelmäßigen Qualitätsüberwachung erreicht werden. Nachweise über die Einhaltung der vorgegebenen mikrobiologischen Richtwerte könnten die Vergabe eines Qualitätszeichens ermöglichen.

Da Klärschlämme aus finanziellen und organisatorischen Gründen nicht auf alle, theoretisch vorkommenden Pathogene untersucht werden können, bedient man sich eines „Indikatorsystems“. In der Wasserhygiene sind dies mikrobiologische Untersuchungen, u.a. auf *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken. In der EU-VERORDNUNG Nr. 142/2011 („Hygieneverordnung“) sind neben Salmonellen auch *E. coli* und/oder *Enterokokken* genannt. Salmonellen sind klassische Infektionserreger (Zoonoseerreger) und gelten als „Lebensmittelvergifter“. *E. coli* sind ebenfalls Infektionserreger bei Mensch und Tieren. Als Fäkalkeime kom-

men sie in Klärschlämmen in relativ hoher Anzahl vor. Daher erscheinen Salmonellen und *E. coli* als Indikatorkeime in Klärschlämmen geeignete bakteriologische Parameter zu sein.

Zur Festlegung mikrobiologischer Grenzwerte soll die Österreichische Düngemittelverordnung (DüMV, 2004) und Deutsche Düngemittelverordnung (DüMV, 2012) herangezogen werden. Dort werden Vorgaben zu Hygieneparametern gemacht (siehe Anlage 2-Grenzwerte, Nr. 4 (Hygienische Parameter)), wobei in jeweils 50 g Probenmaterial keine *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC), *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Yersinien sp.*, *Listeria monocytogenes* und *Clostridium perfringens* nachweisbar sein sollen. Das bedeutet, dass zur Inaktivierung für die genannten Erreger (mit Ausnahme von *Clostridium perfringens*) zumindest die Pasteurisierung der organischen Dünger (70 °C/1h) erfolgen muss. Zur Inaktivierung von *Clostridium perfringens* wäre eine Drucksterilisation (133 °C / 3 bar / 20 min) unumgänglich. Die in der Österreichischen Düngemittelverordnung definierten Mikroorganismengrenzwerte sind nur durch strikte Behandlungsmaßnahmen für die organischen Dünger zu erreichen, wobei Parameter wie *Clostridium perfringens* ihre Berechtigung als „Prüfkeime“ nur dort haben, wo hoch kontaminiertes Ausgangsmaterial „keimfrei“ gemacht werden muss. Sinnvoll war dieser Parameter daher im alten Tierkörperbeseitigungsgesetz bei der Herstellung von Tiermehl zu Verfütterungszwecken. Für eine generelle Anwendung bei Klärschlämmen werden diese Anforderungen als zu streng angesehen.

Als mikrobiologische Richtwerte für Klärschlämme und alle anderen organischen Düngemittel wird für Salmonellen ein Richtwert von 1×10^2 KbE/g und für *E. coli* ein Richtwert von 1×10^3 KbE/g, bezogen auf das Feuchtgewicht, vorgeschlagen.

Die mikrobiologischen Richtwerte sind solange aufrechtzuerhalten, bis Ergebnisse aus weiteren Forschungsprojekten möglicherweise Korrekturen erforderlich machen. In einem Projekt werden Faktoren, die die Aufnahme von Salmonellen und *E. coli* über die Wurzel in die Pflanze beeinflussen bzw. bewirken, erarbeitet. Hierbei spielen Interaktionen zwischen Pflanze, Boden und Bakterien, wie auch pflanzliche und bakterielle Faktoren eine wichtige Rolle. Ein wichtiger Faktor in der Problematik der Aufnahme von Salmonellen und *E. coli* in Nutzpflanzen und Gemüse über die Wurzeln, ist die Quantität der in organischen Düngern und in Klärschlämmen vorkommenden pathogenen Erreger.

Unter Einbeziehung von Richt- und Warnwerten für pathogene Mikroorganismen in Mischsalaten, die die DGHM in 2007 veröffentlicht und u.a. für *E. coli* Richtwerte von 1×10^2 KbE/g festgelegt hat, ist der vorgeschlagene Richtwert für *E. coli* in organischen Düngern von 1×10^3 KbE/g realistisch und vertretbar. Im Jahr 2010 hat die DGHM die Richt- und Warnwerte für Keimlinge und Sprossen zur Abgabe an den Verbraucher ergänzt und um koagulase-positive Staphylokokken und präsumtive *Bacillus cereus* erweitert, wobei für beide Erreger ein Richtwert von 1×10^2 KbE/g gilt. Hierbei handelt es sich um Lebensmittel, die in rohem Zustand verzehrt werden.

Die organischen Dünger (insbesondere Gülle und Gärreste) werden in aller Regel nach Guter Fachlicher Praxis als Dünger zu Zeitpunkten angewandt, in denen die Pflanzen, die darin enthaltenen Nährstoffe dringend benötigen. Bis Futtermittel nach einer Düngung zur Verfütterung an landwirtschaftliche Nutztiere gelangen, vergehen oftmals mehrere Wochen, so dass dadurch zumindest theoretische Sicherheitsspanne bezüglich der Infektionsgefahr für Tiere, die durch möglicherweise ursprünglich mit den Düngern an die Pflanze gelangten Infektionserreger bestehen kann, eingebaut ist.

Dabei gilt bei einer quantitativen Untersuchung auf Salmonellen und *E. coli* als mikrobiologischer Richtwert für Klärschlämme und alle anderen organischen Düngemitteln bei Salmonellen ein Wert von 1×10^2 (< 100) KbE/g und für *E. coli* 1×10^3 (1 000) KbE/g.

Werden die Richtwerte um 50 % überschritten (Warnwert), ist den Anweisungen der zuständigen Behörde Folge zu leisten und Maßnahmen zur Erregerreduktion zu ergreifen. Mit diesem Vorgehen kann ein wichtiger Beitrag zur Risikominderung möglicher futter- und lebensmittelhygienischer, sowie seuchen- und umwelthygienischer Gefahren auf ein vertretbares Maß geleistet werden.

Untersuchungen zum Gehalt von Seuchenhygieneerregern im Klärschlamm lassen keine direkten Rückschlüsse auf den Hygienestatus bzgl. der Phytohygiene zu, da es in der Regel keinen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Organismen der Seuchen- und Phytohygiene gibt. Des Weiteren lässt die Feststellung eines geringen Gehaltes an Infektionserregern der Seuchenhygiene nicht zwangsläufig auf eine ausreichende Reduktion durch die Behandlung schließen, sondern kann auch auf einem geringen Ausgangsgehalt im Abwasser beruhen (z. B. höherer Anteil industriellen Abwassers). Für die Phytohygiene ist das Konzept der Überprüfung des Hygienestatus mittels Indikatororganismen nicht geeignet, da dies die Kenntnis geeigneter Indikatoren voraussetzt. Es ist zu vermuten, dass relevante Phytopathogene im Klärschlamm nur selten Kontaminationsgrade erreichen, die durch eine Laboruntersuchung mit vertretbarem Aufwand nachweisbar sind, was den Erregernachweis zusätzlich erschwert. Hinzu kommt, dass derzeit für viele phytopathogene Schadorganismen, die eine gewisse Relevanz zur Thematik besitzen, keine Untersuchungsmethoden zum Nachweis im Klärschlamm existieren.

Als geeigneter Indikator für die Phytohygiene können Samen und austriebsfähige Pflanzenteile herangezogen werden. Entsprechende Prüfungen sind nach § 3 Abs. 7 der BioAbfV (2013) für hygienisierte Bioabfälle bereits etabliert und könnten auch für Klärschlamm durchgeführt werden. Eine Prüfmethode steht sowohl für feste als auch flüssige Proben zur Verfügung. Nach BioAbfV (2013) liegt der Grenzwert für die hygienische Unbedenklichkeit bei 2 keimfähigen Samen und austriebsfähigen Pflanzenteilen/Liter Substrat.

Insbesondere Tomatensamen können nach der menschlichen Darmassage über das Abwasser in großer Menge in den Klärschlamm gelangen. Tomatensamen sind nach Idelmann (2005) gut als Indikatoren für die Wirksamkeit von wärmebedingten Behandlungsmaßnahmen geeignet, da sie ein ähnliches Inaktivierungsverhalten zeigen, wie viele Schadorganismen von Pflanzen. Für das Tabak mosaic virus trifft dies jedoch nachweislich nicht zu. Die Erkenntnisse von Idelmann (2005) beziehen sich allerdings auf Tomatensamen, die nicht bereits den menschlichen Verdauungstrakt passiert haben. Die Testung auf Samen und austriebsfähige Pflanzenteile sollte bei der Klärschlammverwertung eingeführt werden, um zusätzliche Informationen über den Hygienestatus eines Klärschlammes aus Sicht der Phytohygiene zu erlangen. Außerdem könnte hierdurch auch die Verschleppung von Unkräutern mit Klärschlamm begrenzt werden, wie von Leist und Gießler (1998) sowie Chytil (1984) gefordert. Aufgrund der Arbeiten der zuvor genannten Autoren ist allerdings mit dem Überleben von Tomatensamen zu rechnen, wenn Klärschlamm nicht weitergehend behandelt worden ist.

4.4.4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Werden die Risikomanagementoptionen für Klärschlamm insgesamt betrachtet, sollten die in Anlage 2 der Entwürfe zur Novelle der Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 2010 und 2013) beschriebenen Behandlungsverfahren aus seuchen- und umwelthygienischer Sicht zur Anwendung kommen. Es ist davon auszugehen, dass durch die Verwertung von unbehandeltem Klärschlamm auf landwirtschaftlichen Flächen Infektionserreger mit zum Teil mehrfacher Antibiotikaresistenz verbreitet werden. Das „EHEC-Geschehen“ im Jahre 2011 hat deutlich vor Augen geführt, dass die theoretische Möglichkeit der Verbreitung von human- und tierpathogenen Infektionserregern, insbesondere bei der landwirtschaftlichen Verwertung von unbehandeltem Klärschlamm, permanent besteht.

Zum Schutz der Umwelt vor vermeidbaren Kontaminationen mit Schaderregern sollten die Forderungen der „Hygiene“ für alle organischen Dünger umgesetzt und rechtliche Bedingungen einheitlich gestaltet werden. In der Konsequenz ist es unerheblich, ob pathogene Erreger über Klärschlämme, Gülle, Gärreste oder Bioabfälle in die Umwelt verfrachtet werden.

Die landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm sollte daher nur dann erfolgen, wenn zuvor eine ausreichende Reduzierung der Schadorganismen in Klärschlamm stattgefunden hat. Diese Forderung hat vor dem Hintergrund der Problematik des möglichen Eindringens von Salmonellen über die Wurzelhärchen in die Pflanze seine Berechtigung, weil auf und in verschiedenen landwirtschaftlichen Kulturpflanzen und Gemüse Salmonellen und *E. coli* nachgewiesen werden konnten (Paungfoo-Lonhienne et al., 2010, Tobi et al., 2009, Schikora et al., 2008). Es kann angenommen werden, dass auch andere human- und tierpatho-

gene Erreger bei entsprechenden bodenphysikalischen und bodenchemischen Voraussetzungen über die Wurzeln aus den unbehandelten Klärschlämmen und organischen Düngern bzw. dem Boden aufgenommen werden und somit die Pflanzen bzw. die Pflanzenzellen endophytisch kontaminieren.

Bei einer Behandlungspflicht nach den in Anlage 2 der Novellierung der AbfKlärV (2010 bzw. 2013) aufgeführten Verfahren, ist zumindest davon auszugehen, dass alle relevanten human- und tierpathogenen, nicht sporenbildende Bakterien und auch die Mehrzahl der Viren reduziert bzw. soweit inaktiviert werden, dass von ihnen keine Infektionsgefährdung mehr ausgeht, sondern nur noch eine unvermeidbare Kontamination des Bodens durch Aufbringung des behandelten Klärschlammes zu erwarten ist.

Bei Inanspruchnahme eines Qualitätssicherungssystems, sehen die Vorschläge zur Novellierung der AbfKlärV aus 2010 und 2013 einen Verzicht auf die weitergehende Behandlung vor. Die Qualitätssicherung soll dem Qualitätszeichennehmer eine schriftliche Rechtfertigung liefern, wonach eine hygienisierende Behandlung des Klärschlammes verzichtbar ist. Damit wird die Verantwortung im Rahmen der Vorsorge auf die Qualitätssicherung übertragen, die eine mehr oder weniger qualifizierte und dokumentierte Risikoabschätzung durchführen soll. Die nähere Prüfung dieses Konzeptes hat gezeigt, dass die Träger der Qualitätssicherung nur einen sehr begrenzten risikomindernden Einfluss ausüben können, der in der Regel nicht zu einem verbesserten bzw. äquivalenten Hygieneniveau, wie eine zusätzliche Klärschlammbehandlung, führt. Bei dem Klärschlamm der vorhandenen Kläranlagen muss von einem Hygienierisiko ausgegangen werden. Die Qualitätssicherung verfügt bei diesem Ansatz nicht über effektive und quantitativ messbare hygieneverbessernde Maßnahmen, die eine hygienisierende Behandlung entbehrlich machen könnten.

Eine Befreiung von der Behandlungspflicht im Rahmen der Gütesicherung ohne äquivalente Hygienemaßnahmen wird nicht befürwortet. Im Ergebnis würde das gütegesicherte Produkt ein geringeres Hygieneniveau aufweisen, als das nicht gütegesicherte, aber behandelte und untersuchte Produkt. Dies würde dem Sinn der Gütesicherung nicht gerecht und wäre aus mikrobiologisch-hygienischer Sicht irreführend. Zudem ist zu beachten, dass die Qualitätssicherungen in Deutschland (QLA, VQSD) für organische Produkte (z. B. Komposte, Gärreste, Klärschlammkomposte etc.) bereits jetzt u.a. qualitative und quantitative mikrobiologische Untersuchungen des abgabebereiten Materials auf Salmonellen und *E. coli* beinhalten. Sofern eine weitergehende Behandlung insgesamt nicht mehr angestrebt wird, weil z.B. die Politik das Ende der Klärschlammverwertung zu Düngezwecken verfolgt (Koalitionsvertrag, 2013), sollten die Anwendungsbeschränkungen und -verbote fortgeführt werden. Ferner sollten alle Klärschlämme auf Indikatorkeime untersucht und bei Überschreiten von Grenzwerten einer Behandlung zugeführt werden.

Eine Risikobewertung- bzw. -abschätzung bei Verzicht auf die weitergehende Behandlung könnte sich zunächst auf den quantitativen Gehalt ausgewählter Infektionserreger, wie z.B. Salmonellen und *Escherichia coli* begrenzen (1×10^2 KbE/g für Salmonellen und für *E. coli* 1×10^3 KbE/g), bis weitere Erkenntnisse aus Forschungsprojekten zur möglichen Aufnahme von Infektionserregern für Mensch und Tier über die Wurzeln in die Pflanzen vorliegen. In der novellierten Klärschlammverordnung muss daher die Berücksichtigung von quantitativen mikrobiologischen Untersuchungen ein essentieller Bestandteil der Gütesicherung sein.

Werden die Grenzwerte um eine Zehnerpotenz überschritten, werden Maßnahmen zur Reduzierung der Keimgehalte erforderlich. Wird z.B. der Klärschlamm über 2-3 Monate kontaminationsfrei gelagert, besteht eine große Chance, dass sich die Anzahl an Salmonellen und *E. coli* bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Vor dem Hintergrund langjähriger Erfahrungen mit der Klärschlammverwertung haben die bisher praktizierten Vorsorgemaßnahmen den Ausbruch schlimmerer Gesundheitsschäden offensichtlich wirkungsvoll unterdrückt. Bei einem Klärschlamm, in dem Salmonellen nur in geringer Konzentration vorkommen ($<10^2/g < 100$ KbE/g) und der nur auf Ackerland verwendet wird, ist nach Einschätzung der Bearbeiter des Berichtes nur mit einem relativ geringen Gefährdungspotential hinsichtlich zu berücksichtigender Gesundheitsgefahren zu rechnen. Ein Nichtnachweis von Salmonellen in 50 g Schlamm hat seine Berechtigung nur dann, wenn Klärschlämme vor ihrer landwirtschaftlichen Verwertung einem in Anlage 2 genannten Behandlungsverfahren unterzogen wurden. Denn nach Untersuchungen von Gmelin (2009) sind in mindestens

70 % aller nicht weitergehend behandelte Klärschlämme Salmonellen in 50 g nachweisbar. Das würde bedeuten, dass nur maximal 30 % der für die landwirtschaftliche Verwertung vorgesehenen Schlämme verwertet werden dürfen. Wenn für mikrobiologische Parameter wie z. B. *E. coli* und *Enterokokken* Richt- bzw. Grenzwerte angegeben werden, ist nicht nachvollziehbar, warum dies nicht auch für Salmonellen seine Berechtigung hat, zumindest in Substraten wie Klärschlämmen und generell in organischen Düngern, die nicht als Futter- oder Lebensmittel direkt zum Tier bzw. zum Menschen gelangen.

Die Einhaltung vertretbarer Grenzwerte für Salmonellen und *E. coli* im abgabefertigen, qualitätsgesicherten Klärschlamm muss aus Sicht der Seuchenhygiene unbedingt gefordert werden, ansonsten sind Behandlungsverfahren für die Klärschlämme unverzichtbar.

Spezifisch für die Phytohygiene kann geschlossen werden, dass die Behandlungsverfahren nach Anhang 2 der Novellierung der AbfKlärV in der Regel bei Schadorganismen von Pflanzen mit „normaler Widerstandsfähigkeit“ wirksam sein dürften. Zweifel bestehen bei der Langzeitlagerung hinsichtlich einer Inaktivierung von langjährig im Boden überdauerungsfähigen Organismen insbesondere bei den Quarantäneschadorganismen der Kartoffel sowie *Polymyxa betae* (Steinmüller, 2008). Da gezielte Behandlungsverfahren zur Reduktion dieser widerstandsfähigen Quarantäneschadorganismen der Kartoffel nicht zur Verfügung stehen, sollten die besonders risikoreichen Abwässer aus der gewerblichen Kartoffel- und Rübenver- und -bearbeitung vom Eintrag in die Kläranlage bzw. der späteren Verwertung in der Landwirtschaft ausgeschlossen werden. Dies betrifft neben der verarbeitenden Industrie auch Abwässer aus Gewerbebetrieben für das Waschen, die Sortierung und sonstige Verarbeitung von Kartoffeln bzw. Zuckerrüben. Die Rübenbe- und -verarbeitung sollte einbezogen werden, da große Mengen risikoreicher Anhangerde ins Abwasser gelangen und zudem eine weitere Verbreitung des *Beet necrotic yellow vein virus* mit dem Vektor *Polymyxa betae* erfolgen kann. Wenn ein Einleitungsverbot für Abwässer aus dem Kartoffel und Rüben verarbeitenden Gewerbe ausgesprochen wird, führt dies zu einer wesentlichen Reduzierung des Eintrags der widerstandsfähigen Schadorganismen von Kartoffeln und Rüben. Unter diesen Bedingungen können die Behandlungsverfahren nach Anlage 2 auch als wirksam für die Phytohygiene angesehen werden.

Sollte die AbfKlärV zukünftig keine Pflicht zur weitergehenden Klärschlammbehandlung vorschreiben, müssen die bestehenden Anwendungsverbote und -beschränkungen weiterhin zur Risikominderung beitragen. Aus dem Blickwinkel der Phytohygiene ist aber zu beachten, dass die aktuellen Anwendungsbeschränkungen hinsichtlich der Seuchenhygiene wirksam sein mögen, wie z.B. tiefwendende Einarbeitung des Klärschlammes vor der Aussaat, aber dass hierbei keine Risikominderung für Schadorganismen von Pflanzen erreicht wird. Es ist davon auszugehen, dass widerstandsfähige, potentielle Pflanzenpathogene bei tiefwendender Einarbeitung im Wurzelraum ihrer Wirtspflanzen günstige Infektions- und Überdauerungsbedingungen vorfinden werden. Es ist daher von einem nicht näher einschätzbaren Risiko auszugehen.

Ein zeitlicher Abstand zwischen Aufbringung des Klärschlammes und dem Anbau ist aus Sicht der Phytohygiene zu befürworten, um das Risiko von langjährig im Boden überdauerungsfähigen Schadorganismen zu minimieren. Zum Schutz des Kartoffelanbaus wird empfohlen, nach der Ausbringung von Klärschlamm eine mindestens zweijährige Anbaupause vor einem Kartoffelanbau vorzusehen. Diese Anbaupause ist zusätzlich zu dem Einleitungsverbot für Abwässer aus der gewerblichen Bearbeitung von Kartoffeln und Rüben erforderlich, da das Verbot nicht alle Einleitungsmöglichkeiten, wie z.B. Abwässer aus Privathaushalten, abdeckt. Speziell der Kartoffelkrebs ist in vielen Fällen in Haus- und Kleingärten festgestellt worden und die bakterielle Ringfäule der Kartoffel wird inaktiviert, wenn eine Anbaupause von mindestens zwei Jahren eingehalten wird.

Eine quantitative Bestimmung von Indikatororganismen im Klärschlamm vor der Verwertung wird befürwortet. Aus dem Bereich der Phytohygiene wären Samen und austriebsfähige Pflanzenteile für eine Testung geeignet. Die Untersuchung auf Samen und austriebsfähige Pflanzenteile könnte zusätzliche Informationen über den Hygienestatus des Klärschlammes aus phytohygienischer Sicht bereitstellen und Belastungen des Klärschlammes mit Unkrautsamen verhindern. Hinsichtlich Grenzwert und Methode könnten die Vorgaben der BioAbfV herangezogen werden.

Literatur

- AbfKlärV (1992): Klärschlammverordnung vom 15. April 1992 (BGBl. I S. 912), zuletzt geändert durch Artikel 5 Absatz 12 des Gesetzes vom 24. Februar 2012 (BGBl. I S. 212)
- AbfKlärV (2010): Neufassung der Klärschlammverordnung. 2. Arbeitsentwurf, 20.08.2010, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit; Quelle: <http://archiv.fbk-ev.de/2-arbeitsentwurf-der-klarschlammverordnung/>; Aufgerufen am 14.4.2014
- AbfKlärV (2013): Referentenentwurf für eine Verordnung zur Verwertung von Klärschlamm, 26.06.2014, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit Anonym (unveröffentlicht)
- Ade-Kappelmann, K. (2008): Untersuchungen zur seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Gärresten aus Bioabfällen nach der Behandlung in Anaerobanlagen. Vet.-med. Diss., Freie Universität Berlin
- Anonym (2006 c): Who guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater, excreta and greywater use in agriculture. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, Vol. 4
- Anonym (a)(2010): Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products - Introduction and qualitative risk analysis. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, France, Vol. 1, 2nd edition
- Anonym (2011): Verordnung (EU) Nr. 142/2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren, vom 25. Februar 2011, Amtsblatt der Europäischen Union.
- Appel, B., Böhl, G.-F., Greiner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Hensel, A. (2011): EHEC-Ausbruch 2011: Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette. BfR-Wissenschaft 04/2011.
- Asher, M. J. C., Blunt, S. J (1987): The ecological requirements of *Polymyxa betae*. Proceedings 50th Wintercongress IIRB, Brussels; 45 - 55
- ATV/VKS (1986): Entseuchung von Klärschlamm, 1. Arbeitsbericht der ATV/VKS-Arbeitsgruppe 3.2.2, Korrespondenz Abwasser 33 (1986) S. 1141
- ATV/VKS (1988a): Entseuchung von Klärschlamm, 2. Arbeitsbericht der ATV/VKS-Arbeitsgruppe 3.2.2, Korrespondenz Abwasser 35 (1988) S. 71
- ATV/VKS (1988b): Entseuchung von Klärschlamm, 3. Arbeitsbericht der ATV/VKS-Arbeitsgruppe 3.2.2, Korrespondenz Abwasser 35 (1988) S. 1325
- Avery, L.M., Killham, K., Jones, D.L. (2005): Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 814-822.
- Bartels, G., Backhaus, G. F. (2000): Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt Teil 2. Heft 373. Resistenzprüfungen von Kulturpflanzen im Acker- und Gartenbau gegen Pilze, Bakterien und Viren. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig, S. 59-61
- Basaran-Akgul, N. (2013): Comparative study of thermisch kinetics for *Clostridium sporogenes* PA 3679 inactivation using glass capillary and aluminium tube methods in carrot juice and phosphate buffer. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7 (1), pp. 117-124.
- Bauer, C. (2006): Parasitenstadien als umwelthygienisches Problem. In: SCHNIEDER, T. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Parasitologie, Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, 6. Auflage, 105-118

- Beutin, L., Martin, A. (2011): Outbreak of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal of Food Protection*, Vol. 75; No. 2, 2012, p 408-418.
- BioAbfV (2013) Bioabfallverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. April 2013 (BGBl. I S. 658)
- Bloemhard, C.M.J., Arts, M.W.M.F., Scheepen, P.C., Elema, A.G.(1992): Thermal inactivation of weed seeds and tubers during drying of pig manure. *Neth. J. Agric. Sci.* 40:11-19.
- BMU (2014): <http://www.bmub.bund.de/themen/wasser-abfall-boden/abfallwirtschaft/statistiken/klaerschlamm/>; Zugriff am 27.03.2014
- BMU (2013): <http://www.bmub.bund.de/themen/wasser-abfall-boden/abfallwirtschaft/abfallarten-abfallstroeme/klaerschlamm/>, Zugriff am 27.03.2014
- Bøen, A., Hammeraas, B., Magnisson, C., Aasen, R. (2006): Fate of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* during composting. *Compost Science & Utilization* 14 (2), 142 - 146
- Böhm, R. (2002 a): Aspekte der Seuchenhygiene und Anforderung an die Verwertung von Klärschlamm, Kompost und Gülle. In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL) (Hrsg.): *Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm, Gülle und anderen Düngern unter Berücksichtigung des Umwelt- und Verbraucher-schutzes*, KTBL-Schrift 404, KTBL, Darmstadt, 61-84
- Böhm, R. (2004): Investigations on microbial indicators and/or test-organisms in supervision of hygienic safety in co-digestion of animal slurry, biowastes and/or animal byproducts. In: MADEC, F.; G. CLEMENT (Eds.): *Animal production in Europe: The way forward in a changing world*, In between Congress of the International Society for Animal Hygiene, St. Malo, France, 11th - 13th October 2004, Vol. 1, 283-284
- Böhm, R. (2006): Seuchenhygienische Anforderungen an organische Düngemittel - Schwerpunkt kommunale Klärschlämme. Vortrag auf der BMU-Fachtagung „Perspektiven der Klärschlammverwertung - Ziele und Inhalte einer Novelle der Klärschlammverordnung“, 06. und 07. Dezember 2006, Bonn
- Böhm, R. (2007): Seuchenhygienische Anforderungen an organische Düngemittel - Schwerpunkt kommunale Klärschlämme. In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) (Hrsg.): *Perspektiven der Klärschlammverwertung*, KTBL-Schrift 453, KTBL, Darmstadt, 41-55
- Bradbury, M., Greenfield, P.; Midgleya, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoopb, F., Brown, J.L. (2012): Draft Genome Sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the Common Nontoxic Surrogate for Proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology*; Vol. 194, Nr. 6, 1631-1632
- Breitenbücher, K. (1983): *Aerob-thermophile Stabilisierung von Abwässerschlämmen*. Hohenheimer Arbeiten, Schriftenreihe der Universität Hohenheim, Reihe Agrartechnik, Heft 125, Hrsg. E. Moser, Verlag Eugen Ulmer, S. 155
- Bröther, H. (2002): Übertragungsmöglichkeiten von bakteriellen Quarantänekrankheiten durch Abprodukte der Kartoffelverarbeitung. Wintertagung der AG Kartoffelzüchtung und Pflanzguterzeugung am 20./21. November 2002, Göttingen
- Brown, J.L., Tran-Dinh, N., Chapman, B. (2012): *Clostridium sporogenes* PA 3679 and Its Uses in the Derivation of Thermal Processing Schedules for Low-Acid Shelf-Stable Foods and as a Research Model for Proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*; 4(2012); 779-792
- Bruns, C., Gottschall, A., Zeller, W., Schueler, B., Vogtmann, H., (1993). Survival rates of plant pathogens during composting of biogenic wastes in commercial composting plants under different decomposition conditions. In: Paoletti MG, Foissner W, Coleman D, eds. *Soil Biota, Nutrient Cycling and Farming Systems*. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers/ CRC Press, 42-51.

- Bulling, E. (1988): Die Rolle von Klärschlamm in der Epidemiologie von Zoonosen. In: Bericht des 2. Hohenheimer Seminars: „Entseuchung von Klärschlamm“ - Erfahrungsberichte aus der Praxis, 23. - 24. Februar 1988, Hohenheim, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. (DVG) (Hrsg.), Gießen, 5-24
- Byun, B. Y., Cho, H.-Y., Hwang, H.-J., Mah, J.-H., Tang, J., Kang, D.-K. (2011): Optimization and evaluation of heat-shock condition for spore enumeration being used in thermal-process verification: Differential responses of spores and vegetative cells of *Clostridium sporogenes* to heat shock. *Food Science and Biotechnology*, June 2011, Volume 20, Issue 3, pp 751-757
- Capizzi-Banas, S., Deloge, M., Remy, M. and Schwartzbrod, J. (2004) Liming as an advanced treatment for sludge sanitisation: helminth eggs elimination—*Ascaris* eggs as model. *Water Research* 38(14-15): 3251-3258
- Carducci, A.; Arrighi, S., Ruschi, A. (1995): Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from activated sludge wastewater treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* 21, No. 3, 207-209
- Carducci, A.; Tozzi, E., Rubulotta, E., Casini, B., Cantiani, L., Rovini, E., Muscillo, M., Pacini, R. (2000): Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Research* 34, No. 4, 1173-1178
- Carrington, E. G. (1977): The contribution of sewage sludges to the dissemination of pathogenic microorganisms in the environment. *Water Research Centre, Stevenage Laboratory, Hertfordshire, England*
- Chale-Matsau, J. R. B. (2005): Persistence of Human Pathogenes in a Crop Grown from a Sewage Sludge Treated Soil. Ph.D. Thesis, University of Pretoria
- Chytil, K., 1987: Untersuchungen zur Verschleppung von Ackerunkräutern, insbesondere durch Müllkomposte und Klärschlämme. Veröffentlichungen der Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft, Heft 6. Dissertation.
- Ceustermans, A.; Ryckeboer, J., Geeraerd, A.H., Springael, D. (2011): Overview and prediction of hygienisation during anaerobic digestion and pasteurization process. In: Untersuchungen zum phytosanitären Risiko bei der anaeroben Vergärung von pflanzlichen Biomassen in Bioanlagen. KTBL-Fachgespräch 14. Nov. 2011, Berlin. Hrsg.: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL), Darmstadt
- Christian-Bickelhaupt, R., Klopp, r., Kranert, M., Linssen, K., Litz, N., Mönicke, R., Robecke, m., Schaaf, H., Schmelz, K.-G., Skark, Ch. (2008): Organische Schadstoffe in Klärschlämmen und anderen Düngemitteln. Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V. (DWA)
- Czajkowska, D., Boszczyk-Maleszak, H., Sikorska, I., Sochaj, A. (2008): Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* Strains in Wastewater and in Activated Sludges from Dairy Sewage Treatment Plants. *Polish Journal of Microbiology* 2008, Vol. 57, No 2, 165-171
- Curtis, K. (1921): The Life-History and Cytology of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.), Perc., the Cause of Wart Disease in Potato. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 1921, Vol 210:409-478
- DGHM (2007 + 2010): Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. Eine Empfehlung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) Präambel für Richt- und Warnwerte der DGHM (Stand 30.11.2007) (Arbeitsgruppe Mikrobiologische Richt- und Warnwerte)
- Dickens, J.S.W., Wright, A.J.; Reed, P.J. (1995): Survival of *Polymyxa betae* during processing of vegetables and sugarbeet

- Drča, M. (2007): Seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an einer mesophil betriebenen Biogasanlage zur Verwertung von Speiseresten in Verbindung mit methodischen Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen und Escherichia coli aus biologischem Material. Vet.-med. Diss., Universität Leipzig
- DWA (2010): - Arbeitsbericht Stand der Klärschlamm-Desinfektion im Jahr 2010 ATV/VKS
- Elorrieta, M. A., Suarez-Estrella, F., Lopez, M. J., Vargas-Garcia, M. C., Moreno, J (2003): Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. Agriculture, Ecosystem and Environment 96 (2003) 141-146
- Elphinstone, J. (2001): Monitoring and control of the potato brown rot. Information des British Potato council, 2001
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009): Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. The EFSA Journal
- EPPO (2013): EPPO LA1 and A2 list of pests recommended for regulations as quarantine pests. EPPO-Standard PM 1/2 (22). <https://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm>; Zugriff: 20. März 2014
- Fayolle, L., Noble, R. Coventry, E., Aime, S., Alabouvette, C. (2006): Eradication of *Plasmodiophora brassicae* during composting of wastes. Plant Pathology 55, 553-8
- Feachem, R.G. (1983): Sanitation and Disease - Health Aspects of Excreta and Wastewater Management; John Wiley & Sons, Chichester, UK
- Flores, A. und Perez, J. M. (1999): Cytotoxicity, apoptosis, and in vitro DNA damage induced by potassium chromate. Toxicol. Appl. Pharmacol. 161: 75-81.
- Fong, T.-T.; Phanikumar, M. S., Xagorarakis, I., Rose, J. B. (2010): Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. Applied and Environmental Microbiology 76, No.3, 715-723
- Folders, J., Algr, J., Roelofs, M. S., van Loon, L. C., Tomassen, J., Bitter, W. (2001): Characterization of Pseudomonas aeruginosa Chitinase, a Gradually Secreted Protein. Journal of Bacteriology Dec. 2001 p. 7044-7052
- Forsythe, S. J. (2010): The Microbiology of Safe Food. Wiley-Blackwell, Chichester u. a., United Kingdom, 2nd Edition
- Gallert, C.; Fund, K., Winter, J. (2005): Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. Applied Microbiology and Biotechnology 69, No. 1, 106-112
- Garcia, A. V., Charrier, A., Schikora, A., Bigeard, J., Pateyron, St., de Tauzia-Moreau, M. L., Evrard, A., Mithöfer, A., Martin-Magniette, M. L., Virlobeux-Payant, I., Hirt, Heribert (2013): Salmonella enterica flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-triggered immunity in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant (2013)
- Ghaly, A. E., Alkoik, F., Snow, A. (2006): Inactivation of Botrytis cinerea during thermophilic composting of greenhouse tomato plant residues. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 133
- Gmelin, S. (2009): Untersuchungen zur Häufigkeit des Vorkommens von Salmonella enterica in kommunalen Klärschlämmen aus verschiedenen Kläranlagen der Bundesrepublik Deutschland mit verschiedenen Nachweismethoden. Diplomarbeit, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim

- Gözalan, F. (2004): Untersuchungen zum Vorkommen antibiotikaresistenter Isolate von *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* aus Kommunal- und Schlachthofabwasser. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim
- Guzmán, C.; J. Jofre; M. Montemayor; Lucena F. (2007): Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology* 103, No. 6, 2420-2429
- Haible, C. (1989): Hygienisch-Mikrobiologische Untersuchungen über die Langzeitlagerung von Klärschlamm. Dissertation Vet.-Med. Justus-Liebig Universität Gießen 1989.
- Hartwig, G., von der Linden, H., Skrobisch H. P. (2009): Grundlagen der thermischen Konservierung. B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG. Hamburg
- Haumacher, R.; Philipp W.; Marschang R., Böhm R. (2005): Untersuchungsprogramm zur Feststellung von Keimkonzentrationen und Viren an unterschiedlichen Arbeitsbereichen im Klärwerk Gut Großlappen. Bericht zum Forschungsvorhaben, Auftraggeber: Landeshauptstadt München, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim
- Haumacher, R., Schnauffer, St., Philipp, W., Pietsch, M. (2012): Hygieneaspekte organischer Düngemittel und ihre Anwendung. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben der BLE: Förderkennzeichen: 2811HS016. <http://download.ble.de/GGTSPU-styx2.bba.de-3620-9101172-Z0QPaCXcMp3IjuLA-DAT/11HS016/11HS016.pdf> (22.02.2014)
- He, X. G., Cheng, L., Zhang, D. Y., Xie, X. M., Wang D. H., Wang, Z. (2011): One-year monthly survey of rotavirus, astrovirus and norovirus in three sewage treatment plants (STPs) in Beijing, China and associated health risk assessment. *Water Science & Technology* 64, No. 6, 1202-1210
- Heinemeyer, E.-A., Luden, K., Monazahian, M. (2013): Zum Risiko der Ausbreitung von *E. coli* / EHEC O104:H4 stx2 positiven Bakterien über Kläranlagen während der EHEC-Epidemie 2011 in Norddeutschland. *Gesundheitswesen* 75 (8-9), p 512-514.
- Heijbroek, W. (1987): Dissemination of Rhizomania by water, soil and manure. *Proceedings of the 50th Winter Congress of JJRB (Brussels)* 2, 35 - 44
- Hewitt, J., Bell, D., Simons, G. C., Rivera-Aban, M., Wolf, S., Greening, G. E. (2007): Gastroenteritis Outbreak Caused by Waterborne Norovirus at a New Zealand Ski Resort. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec. 2007, Vol. 73, No. 24, p. 7853-7857
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H., Cliver, D. (1999): Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiology Letters* 178 (1999) 251-257.
- Himathongkham, S., Riemann, H., Bahari, S., Nuannualsuwan, S., Kass, P., Cliver D. (2000): Survival of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in Poultry Manure and Manure Slurry at Sublethal Temperatures. *Avian Diseases* 44:853-860, 2000
- Höll K. (2010): Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung. 9. Auflage, editiert von Reinhard Nießner. Walter de Gruyter & Co. KG, Berlin/New York
- Hoferer, M. (2001): Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben und alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. Dissertation Vet.-Med. FU Berlin 2001.
- Holler, C., Koschinsky, S., Witthuhn, D. (1999): Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from municipal sewage. *Lancet* 353, 2039

- Hopkins, K.L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S.A., Lucarelli, C., Porrero, M.C., Jakubczak, A., Threlfall, E.J. ; Mevius, D.J. (2010): Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Eurosurveillance* (2010).
- Hoppenheidt, K., Krist, H., Tronecke, D. (2008): Ökotoxikologische und hygienische Aspekte der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung. In: Internationales Klärschlamm-Symposium, Wege zu einer verantwortungsvollen Klärschlammentsorgung, 30. Juni - 2. Juli 2008, Fürstenfeld, Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, 95-106
- Hosni, A.A., Shane, W.T., Szabo, J.G., Bishop, P.L. (2009): The disinfection efficacy of chlorine and chlorine dioxide as disinfectants of *Bacillus globigii*, a surrogate for *Bacillus anthracis*, in water networks: A comparative study. *Can. J. Civ. Eng.* 36: 732-737 (2009).
- Idelmann, M. (2005): Hygienisierung von Kompost. Möglichkeiten zum Nachweis einer erfolgreichen Abtötung von Pathogenen und Unkrautsamen. Diss. Schriftenreihe des Fachgebietes Abfalltechnik Hrsg.: Prof. Dr.-Ing. Arnd I. Urban, Kassel
- IPPC (1997): International Plant Protection Convention. FAO. <https://www.ippc.int/about/convention-text>; (aufgerufen am 04.04.2014)
- ISPM 11 (2013): Pest risk analysis for quarantine pests, including analysis of environmental risks and living modified organisms; /<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm11>, (aufgerufen am 04.04.2014)
- Jefremenko, T. S., Jakovleva, V. A. (1981): Destruction of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in waste products of potato processing industry. *Mikologija i Fitopatologija* 1981, 6, Band 15, S. 501-504
- Juhnke, D. (2004): Untersuchungen zum Mechanismus der Chromatentgiftung in *Ralstonia metallidurans*. Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Halle/Saale
- Karuniawati, A. (2001): Untersuchungen von Umweltproben auf „viable but not culturable“ Salmonellen und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart
- Klages, S., Schultheiß, U., Frei, T., Becker, C., Döhler, H., Schneider, U., Haberkern, B. (2009): Anforderungen an die Novellierung der Klärschlammverordnung unter besonderer Berücksichtigung von Hygieneparametern. Umweltbundesamt. Dessau-Roßlau
- Koch, K., Strauch, D. (1981): Inaktivierung von Polio- und Parvovirus im Klärschlamm durch Kalkbehandlung. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 174: 335-347
- Koch, C. & Wilke, B.-M. (1998): Wirkung von ausgewählten PAK, PCB und Schwermetallen auf Bodenmikroorganismen und Wildpflanzen. *Bodenökologie & Bodengenese* Heft 26: 142-151
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., Sela, S. (2009): Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. *Applied and Environmental Microbiology*
- KTBL (2008): Gutachten: Anforderungen an die Novellierung der Klärschlammverordnung unter besonderer Berücksichtigung von Hygieneparametern; 20.6.2008
- Lang, A. (1988 a): Physikalische Entseuchungs- und sonstige Verfahren - Hygiene - Thermische Konditionierung. In: Bericht des 2. Hohenheimer Seminars: „Entseuchung von Klärschlamm“ - Erfahrungsberichte aus der Praxis, 23. - 24. Februar 1988, Hohenheim, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. (DVG) (Hrsg.), Gießen, 220-230

- Langerfeld, E. (1984): *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. - Zusammenfassende Darstellung des Erregers des Kartoffelkrebses anhand von Literaturberichten. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 219
- Leschber, R.; Niemitz, W. (1996): Klärschlamm-Mengen und -Beschaffenheit. In: Abwassertechnische Vereinigung e. V. (Hrsg.): ATV-Handbuch Klärschlamm, Ernst & Sohn Verlag für Architektur und technische Wissenschaften GmbH, Berlin, 4. Auflage, 79-109
- Lesemann, D.-E., König, R. (1988): Pflanzenpathogene Viren in Oberflächengewässern. In: Viren und Plasmide in der Umwelt. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 78, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York
- He, W. J., Vinjé, J., Van de Heide, R., de Roda Husman A. M., Leenen E. J. T. M., Koopmans M. P. G. (1999): Molecular Detection of Norwalk-Like Calici-viruses in Sewage. Applied and Environmental Microbiology 65, No. 12, 5624-5627
- Leist, N., Gießler, S. (1998): Über Samen in Klärschlämmen und ihr Absterbeverhalten bei verschiedenen Schlammbehandlungen. VDLUFA.Schriftenreihe 49, Kongressband 1998
- Lodha, S., Sharma, S. K., Aggarwal, R. K. (2002): Inactivation of *Macrophomina phaseolina* propagules during composting and effects of compost on dry root rot severity and on seed yield cluster bean. European Journal of Plant Pathology 108, 253-61
- Mannion, C., Lynch, P.B., Egan, J., Leonard, F.C. (2007): Seasonal effects on the survival characteristics of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in pig slurry storage. Journal of Applied Microbiology 103 (2007) 1386-1392
- Mayr, C. F. (2002): Nachweis von luftgetragenen Viren an Standorten der Abfall- und Abwasserentsorgung. Agrarwiss. Diss., Universität Hohenheim
- McDonnell, M. B. & Kavanagh, J. A. (1980): Studies on *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in Ireland. Journal of Life Sciences, Royal Dublin Society, 1(2), 177-182.
- Meyer, J. (2002): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an drei Güllebehandlungsanlagen unter Berücksichtigung von *Cryptosporidium* spp.) Vet.-med. Diss., Freie Universität Berlin
- Miles, S.; Takizawa, K., Gerba, C., Pepper, I. (2011): Survival of infectious prions in Class B biosolids. Journal of Environmental Science and Health, Part A 46, No. 4, 364-370
- Mitscherlich, E., Marth, E.H. (1984): Microbial survival in the environment: Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health. Springer-Verlag, Berlin / New York.
- Möller, U. (1988): Entseuchung von Klärschlamm - Eine Standortbestimmung 1987. Korrespondenz Abwasser 35, Nr. 1, 24-30
- Monteith, H.D., Shannon, E.E., Derbyshire, J.B. (1986): The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. J. Hyg., Camb. (1986), 97, 175-184
- Müßig, M. (2004): Solare Klärschlamm-trocknung auf den Inseln Pellworm, Sylt und Föhr am Beispiel der Kläranlagen Pellworm, Wenningstedt, Utersum und Wyk. Abschlussbericht, BMELV
- Müllhandbuch: Quelle: http://www.muellhandbuchdigital.de/doi/MuA_5026/dokument.html.
- Müller, P., Parusel, R. (1998): Investigation and control of potato brown rot in Germany, especially in Bayern. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 28, 519-524

- Muniesa, M., Jofre, J., Garcia-Aljaro, C., Blanch, A.R. (2006): Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 7141-7149.
- Murphy, A. M., Bal, A. K., Hampson, M. C. (1982): Incorporation of uridine diphospho-N-acetyl-D-glucosamine in the resting sporangium wall of *Synchytrium endobioticum*. *Experimentia* 38 (1982): 244-246
- Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J. (2005): Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology* 96 (2005) 135-143
- Nielson, S., Willoughby, N. (2005): Reduction of pathogenic micro organisms in sludge reed bed systems. *Proceedings of the 9th European Biosolids Conference*, 14-17 November 2004, Paper 08
- Niepold, F., Stachewicz, H. (2004): PCR-detection of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.. *Journal of Plant Diseases and Protection* 111 (4), 313-321, 2004.
- Noble, R., Elphinstone, J. G., Sansford, C. E., Budge, G. E., Henry, C. M. (2009): Management of plant health risk associated with processing of plant-based wastes: a review. *Bioresources Technology* 100 (2009) 3431-3446
- Noble, R., Dobrivin-Pennington, A., Pietravalle, S., Weekes, R., Henry, C. M. (2011): Indicator organisms for assessing sanitation during composting of plant wastes. *Waste Management* 31, 1711-1719
- OEPP/EPPO, 1999: EPPO Standards, Phytosanitary Procedures PM 3/59 (2), *Synchytrium endobioticum*: soil tests and descheduling of previously infested plots. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29, 225-231.
- Paungfoo-Lonhienne, Ch., Rentsch, D., Robatzek, S., Webb, R. I., Sagulenko, E., Näsholm, T., Schmidt, S., Lonhienne, Th.G. A. (2010): Turning the Table: Plants Consume Microbes as a Source of Nutrients. *PLoS ONE*. July 2010. Vol 5. Issue 7.
- Paluszak, Z., Kolacz, R., Philipp, W., Kolodziej, P. (2003): Das Verhalten von EHEC (*E. coli* O157) bei der Klärschlammkompostierung. *Tierärztl. Umschau* 58, 607-611 (2003).
- Philipp, W. (1981): Vergleichende hygienische Untersuchungen über die Wirkung der Klärschlammpasteurisierung vor und nach der mesophilen, anaeroben, alkalischen Schlammfäulung. *Vet.-med. Diss. Justus-Liebig-Universität Gießen*
- Philipp, W.; A. Lang (1988): Vergleichende Untersuchungen zur Anreicherung von Salmonellen aus Klärschlämmen und organischen Düngern. *Tierärztliche Umschau* 43, Nr. 11, 721-727
- Philipp, W., Rapp, A., Kegele, J., Vanden Bosche, G., Strauch, D. (1992): Einfluß der Langzeitlagerung von Gülle auf die Tenazität von Krankheitserregern. *Tierärztl. Umschau* 47, 521-524 (1992)
- Philipp, W. (2010): Notwendigkeit und Wege der Hygienisierung von Bioabfällen und Klärschlämmen. Vortrag auf dem DWA-Seminar: Landwirtschaftliche und landschaftsbauliche Verwertung von Klärschlämmen und Bioabfällen, 19. - 20. Mai, Marburg
- Prażmo, Z.; E. KRYSIŃSKA-TRACZYK; C. SKÓRSKA; J. SITKOWSKA; G. CHOLEWA; J. DUTKIEWICZ (2003): Exposure to Bioaerosols in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Annals of Agricultural Environmental Medicine* 10, 241-248
- Puig, M., Jofre, J., Lucena F., Allard a., Wadell G., Girones R. (1994): Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 60, No. 8, 2963-2970
- QLA (2013): Qualitäts- und Prüfbestimmungen für Klärschlämme. VDLUFA-QLA Gesellschaft für Qualitätssicherung Landbauliche Abfallverwertung mbH, Rheinbach.

- http://www.qia.de/sites/www.qia.de/files/haupt_seite/2009/10/QP_Klaerschamm.pdf: (aufgerufen 23.03.2014).
- Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Leonard, F. C., Fitzpatrick, E. S.; Fanning, S.; Hartigan, P. J. (2011): Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Wiley-Blackwell, Chichester u. a., United Kingdom, 2nd Edition
- Reddy, N. R., Marshall, K. M., Morrissey, T. R., Loeza, V., Patazca, E., Skinner, G. E., Krishnamurthy, K., Larkin, J. W. (2013): Combined High Pressure and Thermisch Processing on Inactivation of Type A and Proteolytic Type B Spores of *Clostridium botulinum*. Journal of Food Protection, Vol. 76, No. 8, 2013, 1384-1392
- Reinthaler, F. F.; Posch, J.; Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., Marth, E. (2003): Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Research 37, No. 8, 1685-1690
- Rheinheimer, G. (1991): Mikrobiologie der Gewässer. 5. Überarbeitete Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart 1991
- Ruiz-Herrera, J. (2012): Fungal Cell Wall: Stucture, Synthesis and Assambly. Second Edition. Taylor & Francis Group
- Sahlström, L. (2003): A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plant. Bioresource Technology 87 (2003) 161-166.
- Sauerbrei, A., Wutzler, P. (2009): Testing thermisch resistance of viruses. Arch. Virol. (2009) 154:115-119
- Schikora, A., Carreri, A., Charpentier, E., Heribert, H. (2008): The Dark Side of the Salad: Salmonella typhimurium Overcomes the Innate Immune Response of Arabidopsis thaliana and Shows an Endopathogenic Lifestyle. Plos One. Vol 3. Issue 5.
- Schirm, V. (2005): Entwicklung einer sicheren Methode zur Bioabfallhygienisierung mit Kalk. INAUGURAL-DISSERTATION. Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schlundt, S., Toyofuku, H., Jansen, J., Herbst, S.A. (2004): Emerging foodborne pathogens. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz 2004 23 (2), 513-533.
- Selbitz, H.-J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P. (2011): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9. Auflage, Enke.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., Poolman, B. (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59.201-222
- Skowron, K., Oslzewska, H., Skowron, K.J., Paluszak, P., Breza-Boruta, B. (2013): Hygienic aspects of cattle slurry storage as the most popular and cheapest method of handling liquid animal excrements. Ann. Anim. Sci. Vol. 13, No. 3 (2013) 597-609
- Smith, E. M. and Gerba, C. P. (1982): Development of a Method for detection of human Rotavirus in Water and Sewage. Appl. Environ. Microbiol. 43(6):1440-1450
- Spaull, A.M., McCormack, D.M. (1989): The incidence and survival of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) in various sewage sludge treatment processes. Nematologia 34, 452-461
- Spaull, A. M., McCormack, D.M., Pile, E. B. (1989): Effects of various sewage sludge treatment processes on the survival of potato cyst-nematodes (*Globodera* Spp.) and the implications for disposal. Water Science and Technology 21, 909 - 916
- Stachewicz, H. (2003): Auf Befall mit Kartoffelkrebs achten. Kartoffelbau 54 (5), 200 - 203

- Stampi, S.; G. DE LUCA; O. VAROLI; F. ZANETTI (1999): Occurrence, Removal and Seasonal Variation of Thermophilic Campylobacters and Arcobacter in Sewage Sludge. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin 202, Nr. 1, 61-75
- Steinmüller, S., Müller, P., Pietsch, M. (2006): Phytohygienische Anforderungen an Klärschlämme-Regelungsnotwendigkeiten und -möglichkeiten. Veröffentlicht in: Perspektiven der Klärschlammverordnung. KTBL-Schrift 453/2006
- Steinmüller, S.; P. Müller, C. Büttner (2007): Effect of composting and pasteurisation on two important quarantine pests of potato. Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University, 72/2, 341-351
- Steinmüller, S. (2008): Literaturbasierte Risikoanalyse zur Klärschlammverwertung in der Landwirtschaft bezogen auf die Verbreitung von Quarantäneschadorganismen (unveröffentlicht). Ggf. hier die geplante Veröffentlichung zitieren.
- Steinmüller, S., Bandte, M., Büttner, C., Müller, P. (2012): Effects of sanitation processes on survival of *Synchytrium endobioticum* and *Globodera rostochiensis*. Eur J Plant Pathol (2012) 133:753-763. DOI 10.1007/s10658-012-9955-y
- Steinmüller, S., Müller, P., Bandte, M., Büttner, C. (2013): Risk of dissemination of *Chlavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* with potato wastes. European Journal of Plantpathology 137:573-584
- Stopforth, J. D., Ikeda, J. S, Kendall, P. A., Sofos, J. N. (2004): Survival of acid-adapted or nonadapted *Escherio coli* O157:H7 in apple wounds and surrounding tissue following chemical treatments and storage. International Journal of Food Microbiology 90 (2004) 51-61
- Stottmeister, R.-D. (1989): Untersuchungen von Belebtschlämmen zur Erfassung von Biomasse, Energieladungszustand und Populationszusammensetzung mit neuen gas- und flüssigchromatographischen Methoden. Naturwiss. Diss., Technische Universität Braunschweig
- Strauch, D.; Berg, T. (1980): Mikrobiologische Untersuchungen zur Hygienisierung von Klärschlamm. 6. Mitteilung: Mikrobiologische Untersuchungen an einem Verfahren zur Schlammverfestigung mit Branntkalk. gwf-Wasser/Abwasser 121 , Nr. 10, 493-495
- Strauch, D.; Berg, T.; Fleischle, W. (1980 a): Mikrobiologische Untersuchungen zur Hygienisierung von Klärschlamm. 3. Mitteilung: Versuche bei der Mietenkompostierung von Stroh mit Faulschlamm. gwf-Wasser/Abwasser 121, Nr. 6, 298-301
- Strauch, D. (1981): Hygienische Gesichtspunkte der Lagerung und Ausbringung von Stallmist und Gülle. Der Tierzüchter 33, Nr. 4, 149-150
- Strauch, D. (1991): Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. Revue scientifique et technique Office international des Épizooties 10, No. 3, 813-846
- Suarez-Estrella, F., Vargas-Garcia, C., Lopez, M. J., Capel, C., Moreno, J. (2007): Effect of hoticultural waste composting on infected plant residues with pathogenic bacteria and fungi: Integrated and licalized sanitation. Waste Management 27 (2007) 886-892
- Teltsch, B., Kedmi, S., Bonnet, L., Borenzstajn-Rotem, Y., Katzenelson, E. (1980): Isolation and identification of pathogenic microorganisms at wastewater-irrigated fields: Ration in air and wastewater. Applied and Environmental Microbiology 39, NO. 6, 1183-1190
- Termorshuizen, A. J., Volker, D., Blok, W. J., Ten Brummeler, E., Hartog, B. J., Janse, J. D., Knol W., Wennekerm, M. (2003): Survival of human and plant pathogens during anaerobic mesophilic digestion of vegetable, fruit, and garden waste. European Journal of Soil Biology 39, 165 - 171

- Tobi, D., Böhm, R. (2009): Uptake of *Salmonella enterica* in Monocotyledonous and Dicotyledonous model plants. In: Proceedings of the XIV ISAH Congress 2009, Sustainable Animal Husbandry: "Prevention is better than cure", 19th to 23rd July, Vechta, 681-683
- Tomlinson, J.A., Faithfull, E., Flewett, T.H., Beards, G. (1982): Isolation of infective tomato bushy stunt virus after passage through the human alimentary tract. *Nature* 300, 637-638
- Trüpschuch, S. (2010): Characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:I:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the *thrW* tRNA locus. *International Journal of Medical Microbiology*
- Turner, J. (1996): Population decline of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) in field soils in Northern Ireland. *Annals of Applied Biology* 129, 315 - 322
- Unger, J.G., Pietsch, M. (2002): Pflanzengesundheitliche Risiken von Klärschlamm, Kompost und anderen organischen Düngern. In: Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm, Gülle und anderen Düngern unter Berücksichtigung des Umwelt- und Verbraucherschutzes, KTBL-Schrift 404, 323-333
- van Dorst, H.J.M. (1988): Surface water as source in the spread of cucumber green mottle mosaic virus. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 36, 291-299
- Vernozy-Rozand, C., Montet, M.P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Bouvet, J., Mazuy-Cruchaudet, C., Richard, Y. (2002): Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 93, 473-478.
- Wasiak, K. (2009): Untersuchungen zur Inaktivierung von ausgewählten Krankheitserregern und Indikatororganismen im Boden bei der Anwendung von thermischen Verfahren und Kalk. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. Fachbereich Veterinärmedizin
- Weinhappel, M.; C. Leonhardt; M. Gansberger; A. Brandstetter; P. Liebhard (2011): Untersuchungen zur Verbreitungsgefahr von samenübertragbaren Krankheiten und Unkrautarten durch Fermentationsprodukte aus Biogasanlagen in Österreich. In: Untersuchungen zum phytosanitären Risiko bei der anaeroben Vergärung von pflanzlichen Biomassen in Bioanlagen. KTBL-Fachgespräch 14. Nov. 2011, Berlin. Hrsg.: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL), Darmstadt
- Wiechmann, B.; Dienemann, C., Kabbe, C., Brandt, S., Vogel, I., Roskosch A. (2012): Klärschlamm Entsorgung in der Bundesrepublik Deutschland. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau
- Wullenweber, M.; Agbalika, F. (1984): Enterovirus types in samples of activated sewage sludge. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene B* 178, Nr. 5-6, 522-526
- Zangerl, P. (2007): Maßnahmen zur Kontrolle mikrobiologischer Gefahren. In: KRÖMKER, V. (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch der Milchkunde und Milchhygiene, Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, 180-188
- Zucker, B.-A., Müller, W., Schlenker, G. (2011): Kompendium der Tierhygiene. Lehmanns Media, Berlin

Anhang I

Protokoll zur Isolierung von Dauersori aus Krebskompost (Krebskompost)

40 g Krebskompost und 100 ml Leitungswasser im Becherglas 1 h rühren

(Magnetrührer)



Probe durch Siebkombination geben

(Maschenweite: 210 µm, 125 µm, 75 µm, 25µm)



im 25 µm Sieb aufgefangenes Material in ein Becherglas überführen



Aufgefangene Probe in zwei Zentrifugenröhrchen verteilen und

mit Leitungswasser auf 25 ml auffüllen



in jedes Zentrifugenröhrchen 2 g Kaolin geben



10 Sek. homogenisieren und anschließen 5 min bei 1050 g zentrifugieren



Überstand verwerfen, Pellet mit

15 ml gesättigter Kalziumchloridlösung je Zentrifugenröhrchenresuspendieren



10 Sek. homogenisieren und anschließend 5 min bei 1050 g zentrifugieren



Überstand in 25 µm Sieb überführen, sofort gut durchspülen und

mit ca. 50 ml Wasser in Becherglas überführen



Dauersori-Suspension bis zum Auszählen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahren

Anhang II

Protokoll Tube-Test nach Potocek (OEPP/EPP0, 1999)

2 Tage vor Versuchsansatz:

von allen Kartoffelknollen Keime bzw. Triebe entfernen



Tube an der Kartoffel so ansetzen, dass er eine Keimanlage am Kronenende umhüllt



die präparierten Kartoffelknollen bei 4 °C aufbewahren



Konzentration der Dauersori im Quarzsandpräparat ermitteln (durch Isolation und Auszählen der Dauersori)

Tag des Versuchsansatzes:

Quarzsandpräparat mit Komposterde im Verhältnis 1:1 mischen



Kompostgemisch in die Tuben einfüllen, dabei leicht andrücken, 2 cm Gießrand belassen



Tuben in Klimakammer aufhängen ($16\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / 12 h Licht) und Gießrand mit VE-Wasser füllen



in den ersten 4 - 6 Wochen gut feucht halten (ca. 3x wöchentlich gießen)



ab der 7. Woche 2x wöchentlich gießen



Während der ganzen Zeit durchgewachsene Triebe regelmäßig abschneiden,
um die Bildung neuer Triebe an der Basis anzuregen



Bonitur nach 10 -12 Wochen