

**Fragen zu *Cl. botulinum*, die vom Fachverband Biogas (Referent Herrn David Wilken vom 1.6. 2010) gestellt wurden:**

1. dass sich pathogene Clostridien beim Aufschluss der Gärsubstrate vermehren
2. dass eine Hygienisierung bei 70°C nicht gegen Clostridien hilft. (Clostridien und Toxine werden bei der Hygienisierung inaktiviert, Sporen nicht, falls diese überhaupt vorher im Prozess gebildet wurden)
3. dass Gärreste auch von *Clostridium botulinum* zu erheblichen Teilen kontaminiert sind und
4. dass Siliergut mit pathogenen Clostridien über den aeroben Pfad (!) der Ausbringung von Gärresten kontaminiert werden kann. (Bisher wurde die Pfade "tote Tiere in der Silage (z.B. Mäuse)" oder "Fäkalien von Fleischfressern (z.B. Fuchskot)" für die Verbreitung von Botulismus angenommen.)



## 1. Vermehrung von pathogenen Clostridien im Gärsubstrat

Clostridien sind weltweit vorkommende Bodenbakterien. Sie persistieren besonders in feuchten Böden und sind speziesabhängig regelmäßige Bewohner des Magen-Darm-Traktes von Mensch und Tier. Die Persistenz von *C. botulinum* im Boden ist abhängig vom jeweiligen metabolen Subtyp. Während die Gruppe der proteolytischen Stämme (ABF) eher in trockenen Böden (pH um 7,5) vorkommen, sind die Vertreter der saccharolytischen Gruppe (BEF) eher in feuchten Böden, die reich an organischem Material sind, zu finden. *C. botulinum* Gruppe III –Stämme (CD) finden sich eher in Süßwassersedimenten und als Darmbewohner von Kleinsäugetern, Vögeln und auch Rindern. Allgemein sind Clostridien am Abbau organischer Substanzen beteiligt. Sie besitzen proteolytische, saccharolytische, cellulolytische und harnsäurespaltende Enzyme. Da die Degradierung von organischem Material (tierischer und pflanzlicher Herkunft) ihre evolutionäre Aufgabe ist, gibt es keinen Grund, warum sie Gärsubstrate nicht aufschließen sollten. Das gilt sowohl für die apathogenen als auch die pathogenen Clostridien. Klocke et al. (2007) fanden in ihren Untersuchungen an Tankreaktoren, dass der größte Teil der operationalen taxonomischen Einheiten ihrer molekularbiologischen Untersuchungen sich mit 35% auf die Gruppe der Clostridien mit der größten Biodiversität fokussierte. Der größte Teil von ihnen ist jedoch apathogen und als Hydrolysierer von Substraten in Biogasanlagen erwünscht. Clostridien sind in der Mikrobiota von Biogasfermentoren ein bedeutender Bestandteil. Sie schließen für die Methanogenen die Kohlenstoffquellen durch ihre proteolytischen und saccharolytischen Enzyme auf. Ca. 200 Clostridienarten sind derzeit bekannt, davon sind 35 Arten pathogen und von denen sind wiederum 15 Arten potente Toxinbildner. Dieser unerwünschte Anteil für Mensch und Tier gefährlicher Clostridien kann sich auf Basis

der verwendeten Substrate vermehren. Unter diesen ist *C. botulinum* mit seinen verschiedenen Toxovaren (A-G) der Bildner von äußerst toxischen Toxinen. Neben diesen nur einen Toxintyp produzierenden Stämmen existiert eine Vielzahl von Mischtypen, die mehrere Neurotoxine gleichzeitig bilden können. Bereits geringe Mengen des Botulinumtoxins können zum Tode durch Atemlähmung führen. *C. botulinum* (Ausnahme Typ E) vermehrt sich bei Temperaturen oberhalb von 20 °C und bildet dann auch Toxine. Die Sporen überstehen 100°C und höhere Temperaturen (Böhnel, 2002). In Staub, Wasser oder Pflanzenmaterial können die Sporen über weite Entfernungen transportiert werden. Kontaminierte Regionen können Kontaminationsquelle für benachbarte Gebiete sein, von woraus die Sporen über Wasser (Auswaschung) oder Staub übertragen werden (Smith und Sugiyama 1988). So können Menschen, Haus- und Wildtiere in früher nicht kontaminierten Gebieten gefährdet werden (Long und Tauscher, 2006).

Notermans (1978, 1981) beschreibt einen *C. botulinum* Typ B- Ausbruch in den Niederlanden durch kontaminierten Biertreber, nach dem Kühe dieses Bestandes *C. botulinum* Typ B noch länger als 8 Wochen nach Absetzen des kontaminierten Futters ausgeschieden haben. Dieser Subtyp konnte so die nähere Umgebung inklusive die Grasflächen des Bestandes, die zur Silagebereitung dienten, kontaminieren. Silage von diesen Grasflächen enthielt dann ebenfalls den Erreger.

Die Typen *C. botulinum* Typen A, C, D haben auch ihr Habitat im MDT. Gleichermäßen findet man *C. haemolyticum*, *C. tetani*, *C. perfringens* A, B, C, D, E und *C. novyi*. Durch als Dünger verwendete Fäkalien werden sie in den Boden verbracht, reichern sich hier durch permanentes Ausbringen an und werden mit Wasser und durch Wind weiter verschleppt.

## 2. Effekt der Hygienisierungstemperatur auf Clostridien

Wegen Ihrer Versporungskapazität sind *Clostridium* spp. sehr resistent gegenüber Umweltfaktoren. Sporen können viele Jahre in der Umwelt überdauern. Das betrifft *Clostridium* spp. wie *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauvoei* (Hirsh and Zee, 1999). *Clostridium tyrobutyricum* verursacht z. B. ökonomische Verluste in der Milchindustrie (Dasgupta and Hull, 1989). Silagen können die Quelle für Sporen dieser Clostridienspezies im MDT der Rinder und damit in ihrer Milch sein, wenn Gärreste als Dünger eingesetzt werden.

Allen Clostridien ist gemeinsam, dass sie unter anaeroben Bedingungen leben (für viele ist Sauerstoff toxisch, manche sind aerotolerant. *C. botulinum* benötigt für seine Vermehrung und Toxinbildung nur ein sauerstoffarmes Mikromilieu. Die Geschwindigkeit der Vermehrung und die Toxinmenge hängen immer von der Ausgangskeimmenge ab. Das gilt bereits für die im Substrat enthaltenen Sporen. Diese werden unter widrigen Bedingungen gebildet. Sporen sind hypometabole Dauerformen, die Jahrzehnte, Jahrhunderte, Jahrtausende überdauern können. Sie widerstehen Umwelteinflüssen, insbesondere hohen Temperaturen sehr gut. Unter für sie günstigen Bedingungen keimen sie dann wieder aus und können sich dann massiv vermehren. Ungünstige Bedingungen, die zur Versporung führen sind z. B. Nährstoffmangel, Sauerstoff, ungünstige pH-Werte, Antibiotika. Vegetative (stoffwechselaktive Stäbchenform) Formen der Clostridien und auch ihre Toxine (Eiweiße) sind gegenüber einer Hygienisierungstemperatur von 70°C empfindlich. Bagge (2009) stellte in ihren Untersuchungen fest, dass eine Hitzebehandlung auf 70°C über 60 min keine Sporenbildenden Bakterien wie *Bacillus* spp. und *Clostridium* spp. inaktivieren kann. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Maranon et al. (2006) nach zweistündiger Erhitzung auf

70°C mit Rindergülle festgestellt. Sporen überdauern aber diese Temperatur und sterben selbst nach Kochen über 3h nicht ab. Dagegen hilft die Hygienisierungstemperatur also nicht. Zu den Sporenbildnern gehören auch solche, die schwere Erkrankungen verursachen können. Und diese können auch in dem Substrat sein, das für die Gasproduktion verwendet wird. In Schweden gibt es darum die offizielle Regelung, dass Gärreste nur auf Ackerland ausgebracht werden dürfen, nicht auf Grünland (Bagge, 2009).

Die Versporung benötigt nicht viel Zeit. In einer Clostridienkultur liegen versporte und vegetative Erreger auch immer gleichzeitig vor. Das kann man überprüfen, indem man das Material bei 70°C eine Stunde erhitzt und dann die Sporen auskeimen lässt. Aktuelle Arbeiten (Watcharasukarn et al. 2009) belegen, dass *C. perfringens* als sogenannter Indikatorkeim für Biogasanlagen in den Fokus genommen, durch Erhitzen auf 55 (0, 2, 10, 30, 40, 60 min und nach 3, 5, 10, 24, 48 h) und 70°C (1, 3, 5, und 24 h) bei einer Zugabe von  $10^3$ - $10^4$  KbE/g Rinderkot um weniger als eine Zehnerpotenz zu reduzieren waren. 0, 1, 3, 5, 7, 10, und 15 d bei 37°C inkubierte ebenfalls künstlich kontaminierte Fäkalproben hatten demgegenüber über diesen langen Zeitraum einen Abfall von 1,35 Zehnerpotenzen. Da es sich um Proben ohne jeden Nährsubstratzusatz handelte, dürfte der Keimabfall bei 37°C dem geschuldet sein. Hung et al. (2007) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass in Abhängigkeit von der Influxrate in den Reaktor der Clostridienanteil an der gesamten mikrobiellen Population bis auf 68% anstieg. Wenn also Nährstoffe da sind, werden sie zur Proliferation verwendet. Diese Ergebnisse wurden mittels molekularbiologischer Methoden (FISH) gesichert. Sahlström (2003) spricht das hygienische Risiko von Gärresten nach Ausbringung als Dünger an. Aus ihrer Sicht ist dieses schwer abzuschätzen, sollte aber nicht vernachlässigt werden. Untersuchungen von

### 3. Clostridium botulinum in Gärresten

Clostridium botulinum ist ein ubiquitäres Gram-positives, Sporenbildendes, obligat anaerobes Bakterium, das primär sein Habitat im Boden, im Staub und anderen organischen Matrices besitzt. Der Erreger bildet Toxin, besser Toxine während des Wachstums in der vegetativen Form, die dem Auskeimen aus der Spore folgt. Er benötigt dazu organisches Material und Anaerobiose. Optimales Wachstum erfolgt bei 25-35°C und bei einem pH-Wert von 5,7-6,2 ist die Toxinproduktion optimal, hängt vom Proteingehalt im Substrat ab (Stringer et al. 1999). Alle tierischen Proteine eignen sich dazu. Besonders potente Toxine werden durch den Umsatz von Vogel-, Säuger- und Invertebratenprotein gebildet. Das Toxinbildungsvermögen ist in den verschiedenen Toxintypen unterschiedlich genetisch kodiert. Bei den Typen A, B, E, F ist die Kodierung chromosomal, bei den Typen C und D an Bacteriophagen-Infektionen der Erreger gebunden (Eklund et al. 1987, Rocke 1993). Die Abbaurate lebender, insbesondere pathogener Bakterien in Biogasanlagen hängt von vielen Faktoren wie Temperatur, Verweildauer, pH, volatile Fettsäuren, Batch- oder kontinuierliches Verfahren, von den Erregerspezies und ihren Antagonisten sowie den verfügbaren Nährstoffen. Entscheidend ist immer die Konzentration von pathogenen Bakterien, die initial in das System eingebracht wird. (Farrah and Bitton, 1983; Kearney et al., 1993a; Larsen, 1995). *C. perfringens* wird häufig als Indikatorkeim zur Prüfung des Verhaltens von Sporenbildnern in Biogasanlagen verwendet. Colleran (2008) konnte weder unter mesophilen noch unter thermophilen Bedingungen eine Reduktion des Indikatorkeims *C. perfringens* feststellen. Aus umfangreichen Untersuchungen zu Verweildauer und Umständen der Erregervermehrung im Magen-Darm-Trakt (MDT) ist bekannt, dass unter den Bedingungen einer ungestörten Mikroflora (Eubiose) *C. botulinum*-Keime nur bei Aufnahme sehr hoher Dosen kolonisieren können. In der Regel liegt bei diesen

Patienten eine Dysbakteriose vor. Kolonisationsbotulismus kommt beim Menschen hauptsächlich in der Form des Säuglingsbotulismus, in manchen Fällen auch bei Erwachsenen nach Anwendung von Breitbandantibiotika vor (Midura 1996). Bei Rindern tritt der viszerale (Kolonisations-) Botulismus als Kolonisationsbotulismus auf. Die Kinder infizieren sich durch die Aufnahme von Sporen über Staub, Boden, Wasser oder Honig. Rinder infizieren sich durch Aufnahme von Sporen über die Futtermittel. Die Sporen keimen aus und vermehren sich unter dysbiotischen Bedingungen im Dickdarm. In den USA kommt die Mehrzahl der Säuglingsbotulismus-Fälle in den Bundesstaaten Californien, Utah und Südost- Pennsylvania vor. Das hängt vermutlich mit der hohen Konzentration von Botulinum-Sporen im Boden dieser Länder zusammen (Golding et al. 1997).

Bei einem vermehrten Eintrag von *C. botulinum* in die Biogasanlage durch Gülle ist damit zu rechnen, dass diese in der Gülle als Sporen vorliegen, da bis zum Einbringen in den Güllebehälter das Kot-Harn-Gemisch mit Sauerstoff kontaktiert und demzufolge die Sporenbildung einsetzt. Da in der Mehrzahl der deutschen Rinderbestände die Nachgeburten in die Gülle verbracht werden und nicht für deren unschädliche Entsorgung gesorgt wird, dürfte sich hier ein Nährsubstrat ansammeln, das bei entsprechender Umwelttemperatur zur Erregervermehrung führen kann. Diese Gülle gelangt in die Biogasanlage. Bestenfalls bleibt die Sporenzahl konstant. Unter Verwendung bestimmter Kosubstrate (Lebensmittelabfälle, Schlachthofabfälle, etc.) kann es bei Temperaturen oberhalb von 20°C zur Vermehrung kommen. Gale (2002) weist in seinen Untersuchungen zur Dekontamination von Fleisch in Biogasanlagen darauf hin, dass *C. botulinum* – Sporen durch die Fermentierung nicht inaktiviert werden. Schlüter et al. (2008) konnten auf der Basis von Genomanalysen aus der ersten landwirtschaftlichen Biogasanlage, die in Bielefeld-Jöllenbeck 2007 errichtet wurde, die gesamte mikrobielle DNA analysieren. Die 500 kW-Anlage bestand aus zwei Fermentern und einem Vorratsbehälter, wurde kontinuierlich mit Maissilage (63%),

grünem Roggen und 2% Gefügelgülle beschickt. Hinsichtlich der Erstbeschickung mit Mikroorganismen lagen keine Informationen vor. Die von ihnen analysierte Mikrobiota bestand aus Vertretern methanogener Mikroorganismen als auch Vertretern der Gruppe der Bacteria. Von letzter Gruppe nimmt die Klasse der Clostridia den größten Teil ein. Das Genus *Clostridium* ist in der Ordnung *Clostridiales* mit der größten Häufigkeit vertreten (2848 von 5706 reads). In der untersuchten Probe wurden als pathogene *Clostridium* –Spezies *C. tetani* und *C. novyi* nachgewiesen. Es handelte sich wohlgerneht bei der untersuchten Probe um kein Material, das im Verdacht stand, die mögliche Ursache für ein clostridienbedingtes Erkrankungsgeschehen zu sein. Noch nicht publizierte Ergebnisse einer Gärrestprobe aus einer Biogasanlage, die der Ausgangspunkt für einen Kolonisationsbotulismus in Thüringen war, ergaben anlässlich der zeitgleichen Untersuchung einer Pansensaftprobe eines verendeten Tieres einen wesentlich größeren Anteil von *C. botulinum* an den ermittelten reads. Mit nahezu 30% aller reads machten die Clostridien den Löwenanteil in der untersuchten Mikrobiota aus. An pathogenen Clostridien konnte *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. septicum*, *C. tetani*, *C. novyi* und *C. perfringens* nachgewiesen werden. Im Pansensaft der verendeten Kuh konnten *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. C. tetani* und *C. novyi* ermittelt werden. Die Untersuchung von Gärresten aus 2 Regionen (Region 1: 30 Anlagen, Region 2: 26 Anlagen) ergaben für Region 1: 40% Typ C und 6,7% Typ D. Für Region 2: 7,7% Typ A, 11,2% Typ C, 23,1% Typ D. Diese Ergebnisse unterstreichen den Handlungsbedarf.

#### 4. Kontamination von Siliergut mit *C. botulinum* -Sporen

Über Oberflächenpolymere können Bakteriosporen adhären. Sie adhären an Bodenpartikel, an Grashalme. Laut Düngemittelverordnung muss die letzte Ausbringung von organischen Düngern drei Wochen vor dem Grasschnitt erfolgen. Sporen könnten somit am Blattgut und an Bodenpartikeln adhären und damit in das Siliergut gelangen. Auch wenn ordentlich bei der Silierung gearbeitet wird, der pH-Wert schnell sinkt, das Milieu anaerob ist, die Sporen beeindruckt das nicht. Sie warten auf ihre Chance. Und diese kommt: Es ist die hochleistende Milchkuh, die im Leistungshoch drei-viermal am Tag gemolken wird, mit einer nicht wiederkäuergerechten Ration gefüttert wird und unter azidotischen oder alkalotischen Pansenproblemen leidet.

#### 5. Referenzen

Bagge, E. (2009): Hygiene aspects of the biogasbprocess with emphasis on spore-forming bacteria. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2009.

Boehnel, H. 2002 Household biowaste containers (bio-bins)–potential incubators for *Clostridium botulinum* and botulinum neurotoxins. *Water, Air, and Soil Pollution* 140, 335–341.

Colleran, E. (2008): Hygienic and sanitation requirements in biogas plants treating animal manures or mixtures of manures and other organic wastes. [homepage2.nifty.com/biogas/cnt/refdoc/whrefdoc/d13path.pdf](http://homepage2.nifty.com/biogas/cnt/refdoc/whrefdoc/d13path.pdf).

Dasgupta, A.P., Hull, R.R., 1989. Late blowing of Swiss cheese: Incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 44, 82–87.

Eklund, M. W., F.T. Poysky, K. Oguma, H. Iida, K. Inoue (1987): Relationships of bacteriophages to toxin and hemagglutinin production by *Clostridium botulinum* types C and D and its significance in avian botulism outbreaks. In: *Avian Botulism: An international perspective* (ed. Eklund & Dowell, Jr),

Farrah, S.R., Bitton, G., 1983. Bacterial survival and association with sludge flocs during aerobic and anaerobic digestion of wastewater sludge under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 174–181.

Gale, P. (2002): Risk Assessment: Use of composting and biogas treatment to dispose of catering waste containing meat. Report No: DEFRA, ul Gale  
Contract No: 12842-0, WRc-NSF Ltd, Henley Road, Medmenham, Marlow, Buckinghamshire SL7 2HD. Telephone: + 44 (0) 1491 636500 Fax: + 44 (0) 1491 636501.

Golding, J., P. M. Emmett, I.S. Rogers, (1997): Does breast feeding protect against non-gastric infections? *Early Human Development* 49(Suppl), S105–S120.

Hirsh, D.C., Zee, Y.C., 1999. *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science, Inc.

Hung, C.-H., K.-S. Lee, L.-H. Cheng, Y.-H. Huang, P.-J. Lin, J.-S. Chang (2007): Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 75:693–701.

Kearney, T.E., Larkin, M.J., Levett, P.N., 1993a. The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 86–93.  
Larsen, H.E., 1995. Bakteriologiske risici ved anvendelse af husdyrgødning og affald. *Rev. DanskVet. Tidsskrift.* 78, 763–766. (in Danish, with English summary).

Klocke, M., P. Mähnert, K. Mundt, K. Souidi, B. Linke (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 139–151.

Long, S. C., T. Tauscher (2006): Watershed issues associated with *Clostridium botulinum*: A literature review. *Journal of Water and Health*, 04.3, 277-288.

Maranon, E., L. Castrillon, J.J. Fernandez, Y. Fernandez (2006) Anaerobic mesophilic treatment of cattle manure in an upflow anaerobic sludge blanket reactor with prior pasteurization. *J. Air & Waste Manage Assoc.* 56: 137-143.

Midura, T. (1996): Update: infant botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 119–125.

Notermans S, Breukink HJ, Wensing T, Wagenaar G. (1978). Incidence of *Clostridium botulinum* in the rumen contents and faeces of cattle fed brewers' grains naturally contaminated with *Clostridium botulinum*. *Neth. J. Vet. Sci.* 103:1327-1333.

NOTERMANS S, DUFRENNE J, OOSTEROM J. (1981) Persistence of *Clostridium botulinum* Type B on a Cattle Farm After an Outbreak of Botulism. *Appl. Env. Microbiol.*, 41 (1), 179-183

Rocke, T. E. 1993 *Clostridium botulinum*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2nd edn. (ed. Gyles, C. L. & Thoen, C. O.), pp. 86–96. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.

Sahlström, L. (2003): A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology* 87: 161–166.

Schlüter, A., T. Bekel, N. N. Diab, M. Dondrup, R. Eichenlaub, K.-H. Gartemann, I. Krahn, L. Krause, H. Krömeke, O. Kruse, J. H. Mussnug, H. Neuweger, K. Niehaus, A. Pühler, K. J. Runte, R. Szczepanowski, A. Tauch, A. Tilker, P. Viehöver, A. Goesmann (2008): The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136, 77–90.

Smith, L. D. S. & Sugiyama, H. 1988 *Botulism: The Organism, its Toxins, the Disease*, 2nd edn. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.

Stringer, S. C., Haque, N. & Peck, M. W. 1999 Growth from spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in heat-treated vegetable juice. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2136–2142.

Watcharasukarn, M., P. Kaparaju, J.-P. Steyer, K. A. Krogfelt, I. Angelidaki (2009): Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as Indicator Organisms in Evaluating Pathogen-Reducing Capacity in Biogas Plants. *Microb. Eco.* 58:221–230.

Die Fragen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Monika Krüger, Universität Leipzig, beantwortet. 11. Juni, 2010