



Das Lebensmittelministerium



Zur Phytohygiene von Kartoffelabfällen

Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft
Heft 5 – 10. Jahrgang 2005

Freistaat  Sachsen

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

**Dekontamination von bakterielle Ringfäule-infizierten Speisekartoffelpartien durch
mesophile Anaerobbehandlung in Biogasanlagen
(Abschlussbericht)**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Gesamtziel	1
2	Kenntnisstand und Literatur	2
3	Aufgabenstellung und Arbeitsetappen	5
4	Material und Methoden	6
4.1	Infektionsmaterial und Diffusionskeimträger	6
4.2	Laborbiogasanlage	8
4.2.1	Komponenten und Betriebsweise der Laborbiogasanlage	8
4.2.2	Analysen zur Prozesscharakterisierung	9
4.3	Technische Biogasanlage für Praxisversuche	9
4.4	Beschreibung der Fermentationsversuche	10
4.4.1	Laborbiogasanlage	11
4.4.2	Technische Biogasanlage	12
4.5	Diagnose	13
4.5.1	Probengewinnung und -aufbereitung	13
4.5.2	Immunfluoreszenztest (IFA)	14
4.5.3	Immunfluorescence colony staining (IFC)	14
4.5.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	14
4.5.5	Plattentest mit semiselektivem Nährmedium YMM-AB	14
4.5.6	Biotest mit Solanum melongena L.	15
5	Ergebnisse	15
5.1	Voruntersuchungen	15
5.2	Laborbiogasanlage	16
5.3	Praxisversuche in technischer Biogasanlage	21
6	Diskussion und Schlussfolgerungen	21
7	Zusammenfassung	24
8	Literatur	26
9	Projektpartner	28

1 Einleitung und Gesamtziel

Die bakterielle Ringfäule der Kartoffel (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Abkürzung: Cms; im Folgenden auch als „Erreger“ bezeichnet) gehört in allen kartoffelanbauenden Ländern zu den bedeutendsten Krankheiten. Diese Einschätzung gibt LANGERFELD (1989) in einer Literaturstudie nach einer Analyse der Eigenschaften des Erregers und den mit seiner Bekämpfung verbundenen Kosten. In allen europäischen Kartoffelländern und auch in Übersee (USA, Kanada) gehört die bakterielle Ringfäule zu den meldepflichtigen Quarantänekrankheiten. In Deutschland ist der Schaderreger erstmals 1914 von SPIEKERMANN und KOTTHOFF isoliert und wissenschaftlich beschrieben worden. Vorangegangene massive Krankheitsverläufe veranlassten aber bereits 1905 den Regierungsrat OTTO APPEL in seinen Betrachtungen vor Vertretern der angewandten Botanik auf die Beteiligung der „Bakterienringkrankheit“ an den großen Kartoffelepidemien des „vorigen Jahrhunderts“ hinzuweisen. Nach Jahrzehnten des vermeintlichen Fehlens wird der Erreger bei Saatgutverkehrskontrollen im Zeitraum August 1984 bis Februar 1987 in Niedersachsen wieder nachgewiesen und erlangt etwa ab Mitte der 1990er Jahre eine größere Verbreitung (MÜLLER et al., 2002). Die Autoren definieren als Schwerpunkte der Weitergabe einer Infektion klonale Verbindungen und die Verschleppung durch kontaminierte Maschinen und Geräte. Bei Wirtschafts- und Speisekartoffeln ist ein beträchtlicher Anteil der Fälle (ca. 30 %) trotz umfassender Befallsanalyse nicht aufgeklärt. Bundesweit wurden in dieser Zeit Überlegungen angestellt, inwieweit auch Infektionsquellen aus kontaminierten Abfällen der Kartoffel verarbeitenden Industrie stammen können.

Von den zuständigen Pflanzenschutzdiensten der Länder und der Biologischen Bundesanstalt wurde zusätzlich zur bestehenden Verordnung zur Neuregelung pflanzenschutzrechtlicher Vorschriften zur Bekämpfung von Schadorganismen der Kartoffel vom 5. Juni 2001 (BGBl. I S. 1006) – der Kartoffelschutzverordnung – eine Leitlinie zur Durchführung von Maßnahmen zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule erarbeitet. Diese beinhaltet – wie auch in der Kartoffelschutzverordnung festgehalten – eine Befallserhebung und Befallsanalyse, Maßnahmen im Befallsbetrieb und einen gegenseitigen Informationsaustausch. Die Leitlinie gibt darüber hinaus verbindliche Empfehlungen zur fachgerechten Entsorgung der befallenen und wahrscheinlich befallenen Partien. Es wurden Verwendungen festgelegt, die eine Gefährdung der Kartoffelwirtschaft durch mögliche Rückinfektionen ausschließen, zumindest aber das Risiko des erneuten Erregereintrages in die Kartoffelproduktion minimieren.

Die in der Leitlinie aufgezeigten Möglichkeiten lassen beim Anfall größerer Mengen an Rohware schnell Kapazitätsgrenzen erkennen. Bei der Untersuchung von Speisekartoffelpartien fielen in Sachsen aus der Ernte 1999 und 2000 größere Partien mit infizierter Kartoffelrohware an. Daraufhin entstanden bereits im März 2001 erste Überlegungen, inwieweit der Erreger durch eine Anaerobbehandlung (Biogas) wirksam abgetötet werden kann. Im Projekt sollte geprüft werden, ob der Erreger bereits unter mesophilen Temperaturbedingungen bei 36 bis 38 °C abgetötet werden kann.

Mit der Auflage des Projektes sollte ein Beitrag zur fachlichen Bewertung von Behandlungsmaßnahmen bei der Hygienisierung von Kartoffelabfällen geleistet werden, um daraus einheitliche Kriterien für die wirksame Behandlung von Verarbeitungsrückständen aufzustellen.

2 Kenntnisstand und Literatur

Biologie und Diagnose

Der Erreger ist für seine lange Inkubationszeit bekannt. Oft reicht seine Konzentration im Wirtsgewebe nicht aus, um eindeutige Symptome hervorzurufen. Die Gestalt der Bakterien ist vielfach pleomorph, d.h. unterschiedlich, so dass die Beurteilung auch unter Verwendung spezifischer Antikörper im Immunfluoreszenz-Test (IFA) nicht zweifelsfrei ist. Auch bei großen Fortschritten im Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist das zweifelsfreie und damit „justizable“ Erkennen der Krankheit vor allem bei sehr niedrigen Erregerkonzentrationen nach wie vor an mehrere Nachweisverfahren gebunden, die auf unterschiedlichen Testprinzipien beruhen. Der Biotest an empfindlichen Eierfruchtsorten hat auch im 2004 vorgelegten Entwurf der Kommission „zur Änderung der Anhänge der RL 93/85/EWG des Rates...“ seine Bedeutung nicht verloren. Im Bericht erhält dieser an der Sorte „Black Beauty“ durchgeführte Vitalitätsnachweis grundlegende Bedeutung bei der Diagnose pathogener Bakterien. Die Anzahl wissenschaftlicher Arbeiten zur Diagnose ist außerordentlich umfangreich. Auf eine weitere Besprechung muss an dieser Stelle verzichtet werden. Es wird auf die einschlägigen Diagnoseprotokolle der EPPO und EU verwiesen.

Epidemiologie und Infektionsquellen

Neuere epidemiologische Studien zur Biologie des Erregers wie die Existenz weiterer Wirtspflanzen, Überlebensfähigkeit, Weitergabe durch kontaminierte Maschinen und Geräte (indirekter Kontakt) sowie von Knolle zu Knolle (direkter Kontakt) orientieren sich an früheren Einzelbeobachtungen der Praxis. Schon in den 30er und 40er Jahren war bekannt, dass sich der Erreger durch kontaminierte Messer beim Schneiden der Knollen und durch Stechgreifer beim Pflanzen übertragen lässt. Innerhalb eines EU-Projektes wurde die Überlebensfähigkeit von Cms im Boden, im Wasser, auf verschiedenen Materialien und auch unter anaeroben Bedingungen untersucht (VAN DER WOLF et al., 2002). Die Autoren kommen zu der Feststellung, dass der Erreger in mikrobiell komplexen Umweltsystemen wie dem Boden durchaus länger überleben kann als bisher angenommen. Im Wasser überlebt Cms nur relativ kurze Zeit. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen eine vom Gesetz geforderte Anbaupause von vier Jahren auf Flächen mit Befall.

Ein Themenheft der Zeitschrift *Gesunde Pflanze* (2004) enthält fünf sehr praxisnahe Beiträge verschiedener Autoren zur Übertragung von Cms auf gesunde Kartoffelknollen durch Krautübertragung und Lagerkisten mittels simulierter Freiland- und Klimakammerversuche. Die Autoren kommen zu gezielten Aussagen und Bewertungen der Risiken einer Übertragung auf gesunde Knollen. Der Erreger ist nach Simulation verschiedener Lagerbedingungen in der Lage, mehrere Monate auf

Holzboxten zu überdauern. Die Ergebnisse belegen ein nicht zu unterschätzendes Risiko der Weitergabe von Infektionen durch nicht desinfizierte Lager- und Transportbehältnisse. Die Übertragung durch Krautschläger ist dagegen wenig wahrscheinlich.

Bei allen Maßnahmen einer komplexen Bekämpfungsstrategie der bakteriellen Ringfäule spielen Fragen von Infektionsmöglichkeiten aus Abfällen der verarbeitenden Industrie eine wichtige Rolle. Nach Erhebungen fallen in Deutschland jährlich zwischen 3 und 4 Mio. t Rückstände wie Schälreste und Gewebwasser aus Kartoffelgewebe an. Weitere Abfallstoffe sind Resterden mit organischen Beimengungen sowie Wasch- und Prozesswasser. Im Sinne einer erwünschten Kreislaufwirtschaft werden die organischen Verarbeitungsrückstände vielfach wieder auf landwirtschaftlichen Nutzflächen ausgebracht. In einer Status-Quo-Analyse erfasste STEINMÖLLER (2003) in 12 kartoffelverarbeitenden Betrieben Daten zu den Produktionsabläufen und analysierte mögliche Risiken der Übertragung von QSO. Die Autorin kommt zu der Schlussfolgerung, dass Abfälle durchaus als „risikoträchtig eingestuft werden müssen“ und verweist auf dringenden Forschungsbedarf. BRÖTHER (2002) widmet sich in mehrjährigen Untersuchungen gezielt dem Nachweis von Cms in unterschiedlichen Kartoffelabfallarten und stellt wiederholt den Erreger der bakteriellen Ringfäule in Pülpe, Erde, Schalenabrieb und Schlamm fest.

Im Düngemittelgesetz (DÜNGMG) und auch in der Bioabfallverordnung (BioAbfV) werden Forderungen bezüglich der phytohygienischen Unbedenklichkeit von Abfällen erhoben. Gegenwärtig erarbeitet eine KTBL-Arbeitsgruppe einen Vorschlag zur Änderung des Anhangs 2. Der Vorschlag betrifft die Hygieneanforderungen an eine Behandlung von Bioabfällen mit Verwertung auf landwirtschaftlich, gärtnerisch und forstwirtschaftlich genutzten Flächen und definiert die phytohygienische Unbedenklichkeit im Rahmen der verwendeten Prüfverfahren.

Eine Fortschreibung der Gesetzgebung ist nur möglich, wenn weitere fachliche Daten zu Behandlungsmaßnahmen erarbeitet und Schwachstellen bestehender Maßnahmen aufgezeigt werden. Die Quarantäneschadorganismen müssen hierbei besondere Berücksichtigung erfahren. Für sie ist in allen Fällen der nachgeordneten Behandlung wie Kompostierung und Anaerobbehandlung eine absolute Abtötung erforderlich. Die Forderung, nur gesundes Material zu verarbeiten, ist wenig praxistauglich, zumal sich eine Kontrolle gerade im Sektor Speise- und Wirtschaftskartoffeln nur auf Stichproben beschränkt.

Phytohygiene in Biogasanlagen

Bei der Verwertung von Bioabfall in Anaerobanlagen können im Behandlungsgut potenziell alle im europäischen Raum vorkommenden phytopathogenen Erreger enthalten sein (UNGER et al., 2002). Um die hygienisierende Wirkung von Biogasanlagen bewerten zu können und damit bei der Produkt- und Prozessprüfung auf vergleichbare Prüfgrößen zurückzugreifen, wurden in den Hinweisen zum Vollzug der Bioabfallverordnung im Anhang 2 mit Tabakmosaikvirus (TMV), dem Erreger der Kohlhernie (*Plasmodiophora brassicae*) und Tomatensamen Testkeime bzw. Leitorganismen be-

nannt, die bei den Prüfungen zu verwenden sind. LORENZ (2004) erweitert die Zahl der oben aufgeführten obligatorischen Testorganismen um das Tabakmauchevirus und um Samen von Sauerampfer. Die Bereitstellung, Aufbereitung und Auswertung der Proben erfolgte in einem Teilvorhaben (TV 3). Die Ergebnisse wurden von MARCINISYN et al. (2004) vorgelegt. Mit dieser Komplexstudie wurden nach dem Leiterregerkonzept stellvertretend für andere Pathogene umfangreiche Daten zur Dekontamination ausgewählter phytopathogener Indikatororganismen erhoben, um die Wirksamkeit der Anaerobbehandlung in Biogasanlagen zu bewerten.

In anderen Literaturquellen finden sich Angaben zu weiteren Phytopathogenen. So untersuchte TURNER et al. (1983) die Abnahme der Keimdichte bzw. Anzahl der Zysten von *Fusarium oxysporum*, *Corynebacterium michiganense* und *Globodera pallida* nach Exposition in kleinen Anaerobfermentern (1 Liter-Glasfermenter, 35 °C ± 2 °C). Im Falle von *C. michiganense* ermittelte er bereits nach fünf Tagen Versuchsdauer eine Abnahme der Keimdichte von 10⁷ auf 10² KBE/ml. Auch für die anderen Pflanzenpathogene beobachtete er eine schnelle und merkliche Reduzierung der Infektionsdichten und postuliert die Anaerobbehandlung als ein brauchbares Mittel zur Vernichtung infektiöser Pflanzenmaterialien.

In enger Verbindung zu der an der Universität Hohenheim bearbeiteten Fragestellung untersuchte RYCKEBOER et al. (2002) auf der Grundlage der deutschen BioAbfV die Abbauraten von TMV, *Plasmodiophora brassicae*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne incognita*, *Ralstonia solanacearum* und Tomatensamen in thermophil (52 °C) arbeitenden Versuchsanlagen. Mit Ausnahme von TMV stellten sie bei allen Pathogenen eine rasche Inaktivierung im anaerob arbeitenden Fermenter fest. Bei Ausgangskonzentrationen zwischen 10⁸ und 10⁶ KBE/ml wurde *R. solanacearum* bereits nach sechs Stunden drastisch abgebaut. Für den Abbau der Pathogene machen die Autoren neben den Temperatureinflüssen auch schwer messbare toxische Einflüsse im Reaktionsmilieu verantwortlich.

Auf mangelnde Daten bei der Anaerobbehandlung im mesophilen Temperaturbereich verweist TERMORSHUIZEN et al. (2000) vom niederländischen Pflanzenschutzdienst und untersucht die Überlebensrate von drei pflanzenpathogenen Pilzen mit persistenten Überdauerungsformen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*, *Sclerotium cepivorum* und *Plasmodiophora brassicae*). Aus Gründen der phytohygienischen Bedeutung für die Niederlande bezieht er neben Leitbakterien aus der Seuchenhygiene auch den Erreger der Schleimkrankheit an Kartoffeln, *Ralstonia solanacearum*, ein. Ein 300 l fassender Reaktor wurde mit einem Mix (1:1, v/v) von Bioabfall und Animpfmasse angesetzt. Während des Füllens wurden Proben der Pathogene (im Falle von *R. solanacearum* ganze und halbierte natürlich infizierte Kartoffelknollen) in unterschiedliche Tiefen eingesenkt. Nach 21 Tagen wurden Flüssigproben entnommen und untersucht. Ähnlich wie TURNER, stellten die Autoren eine rasche Inaktivierung der Pathogene fest. *Ralstonia solanacearum* wie *Salmonella typhimorum* und *Fusarium oxysporum* waren nach der Anaerobbehandlung bei 35 bis 37 °C im Gärrest nicht mehr nachweisbar. Der Vitalnachweis von *R. solanacearum*, also die Präsenz lebender Zellen, wurde nach Ausplattieren auf dem semiselektiven Nährmedium SMSA bestimmt.

3 Aufgabenstellung und Arbeitsetappen

Sachsen gehört zu den Bundesländern, die beträchtliche Kapazitäten in der kartoffelverarbeitenden Industrie aufweisen. Gemessen an der Anbaufläche sind Zufuhren – auch EU-weit – notwendig. Zulieferungen aus Gebieten mit möglicherweise höherem Gefährdungspotential sind dabei nicht auszuschließen. Wie Erfahrungen der vergangenen Jahre zeigten, müssen auch größere Mengen anfallender Rohware nach Erkennen einer Infektion mit Ringfäule sicher und energiesparend entsorgt werden und dürfen nicht zu einem Risiko der möglichen Rückübertragung führen. Wie eingangs festgestellt wurde, reichen die Empfehlungen der Leitlinie u. U. dafür nicht aus. Im Projekt wurde deshalb die Aufgabe einer energiesparenden, aber sicheren Abtötung durch eine Anaerobbehandlung in Biogasanlagen gestellt. Das Projekt zielte neben der bewussten Behandlung auch auf die Bewertung möglicher Infektionsrisiken, die aus der Verarbeitung unerkannt infizierter Kartoffelabfälle in kleineren Kofermentationsanlagen herrührten. Solche Anlagen werden in der Regel mesophil bei etwa 37 °C gefahren.

Die Projektziele lauteten zusammengefasst:

- Entsorgung von bakterielle Ringfäule-befallenen Kartoffelpartien in Biogasanlagen,
- energiesparende Durchführung der Entsorgung im mesophilen Temperaturbereich ohne Verlust der Verfahrenssicherheit und der Unbedenklichkeit der Reststoffe.

Die Laborversuche konnten nur mit einem Partner durchgeführt werden, der über Erfahrungen beim Betreiben einer Biogasanlage verfügte und eine Laboranlage zur Verfügung stellte. Mit der TU Bergakademie Freiberg wurde dazu ein FuE-Vertrag geschlossen, der die Übernahme wichtiger Arbeiten durch das Institut für Wärmetechnik und Thermodynamik sicherte. Die Zusammenarbeit mit der Friweika e.G. Weidensdorf ermöglichte die Nutzung einer großen Biogasanlage für Praxisversuche. Die Ergebnisse der erbrachten Leistungen flossen in den Bericht ein.

Die Arbeitsetappen lassen sich wie folgt aufgliedern:

- Ermittlung der Nachweisgrenze der verwendeten Testverfahren (IFA, PCR, Biotest) im System Gäransatz unter möglicher Einflussnahme inhibitorischer Effekte und mikrobieller Begleitflora,
- Auswahl und Nachbau geeigneter Diffusionskeimträger, Prüfung der Verwendungsfähigkeit unter Praxisbedingungen,
- Vergärungsversuche (batch, d. h. diskontinuierlich, und kontinuierlich) im Laborfermenter der TU Freiberg ab Juni 2002,
- Untersuchungen in einer Biogas-Praxisanlage der Friweika e.G. ab 2003,
- Validierung geeigneter Prüfmethode für Cms nach BioAbfV.

4 Material und Methoden

4.1 Infektionsmaterial und Diffusionskeimträger

Für die Versuche mit Bakteriensuspension verwendeten wir einen laboreigenen Cms-Stamm mit der Bezeichnung KLM 50, den wir von der BBA, Kleinmachnow bezogen. Kartoffelknollen der Sorte „Satina“ wurden mit diesem Stamm künstlich inokuliert (MÜLLER, pers. Mitteilung) und für die Versuche mit Frischmaterial genutzt.

Für das Arbeiten mit einem QSO war es notwendig einen Probebehälter zu nutzen, der das Ausreten der Bakterien in den gesamten Reaktionsraum verhinderte, den stofflichen Austausch und damit den Eintrag aller Reaktionsbedingungen mit dem umgebenden Milieu aber zuließ. Ein weiterer wichtiger Grund war das sichere Wiederfinden der definierten Erregerkonzentration. Für diesen Zweck wurden verschiedene Keimträger mit diffusionsoffener Membran erprobt. Die Eignung der Diffusionskeimträger prüfte RAPP (1995) in Versuchen zur Angleichung der elektrischen Leitfähigkeit und des pH-Wertes. Nach 30 bzw. 78 Stunden Expositionszeit war das Gleichgewicht von Innen- und Außenlösung hergestellt.

Diffusionskeimträger nach RAPP

Der Diffusionskeimträger nach RAPP ist im Anhang 2 der BioAbfV im methodischen Vorgehen bei der direkten Prozessprüfung genannt. Dieser Keimträger besteht aus zwei zusammengeklebten Polycarbonat-Sterilfiltrationsvorsätzen der Firma Sartorius mit einem Durchmesser von 25 mm. Die Eingangs- und Ausgangsöffnungen wurden entfernt, so dass eine Öffnung von ca. 16 mm Durchmesser entstand. In die darunter befindliche Filterunterstützung wurde ebenfalls eine Öffnung von ca. 6 mm Durchmesser gebohrt.



Abbildung 1: Modifizierter Diffusionskeimträger nach RAPP

Zwischen die Filterunterstützung wurde ein Polycarbonatmembranfilter wahlweise mit den Porengrößen 0,2 und 0,45 μm eingelegt. Die Keimträger wurden vor jedem Einsatz mit einem Desinfektionsmittel behandelt und anschließend bei 121 $^{\circ}\text{C}$ autoklaviert. Die Befüllung erfolgte über den geöffneten Keimträger mit Hilfe einer Pipette.

Der Diffusionskeimträger nach RAPP wurde aufgrund seiner Größe nur im Technikumsversuch genutzt.

Diffusionskeimträger nach ROTH

Insbesondere im geplanten Praxisversuch war es erforderlich einen kleinen Probekörper zu verwenden, der den gesamten Reaktionsraum durchlaufen konnte. Für das Projekt wurden Keimträger von der Firma Dr. Roth BioTest – Biologisches Umweltlabor – aus Leipzig bezogen. Dieser Keimträger besteht aus einem kleinen runden Kunststoffgefäß (H 15 mm, \varnothing 11 mm) und fasst ca. 1 ml Flüssigkeit. Zur Einstellung des spezifischen Gewichts wurde ein Eisenplättchen angebracht. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Keimträger beim Durchlaufen des Fermenters einen „Schwebzustand“ erhalten. Nach Befüllen mit dem Testorganismus wurden die Kunststoffgefäße mit einer Polyethersulfonmembran abgedeckt und an den Rändern verschweißt. Die Porengröße der Membran war in allen Versuchen 0,2 μm .

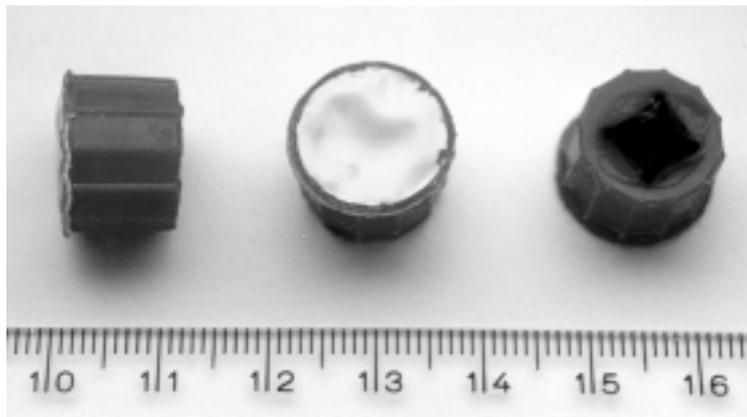


Abbildung 2: Diffusionskeimträger vom Dr. Roth BioTest Biologisches Umweltlabor Diffusionskeimträger aus Eppendorf – Safe Twist – Reaktionsgefäß mit anhängendem Schraubdeckel

Bei der Suche nach einem geeigneten Keimträger wurde auch ein Eppendorf-Reaktionsgefäß „Safe Twist“ mit anhängendem Schraubdeckel verwendet. Um die Diffusion zu ermöglichen wurde eine Öffnung von 6 mm Durchmesser in den Deckel gestanzt. Die Polycarbonat-Filtermembran wurde durch Aufschrauben des Deckels fixiert. Zum Einstellen des spezifischen Gewichtes wurden Schaumpolystyrolstücke in das Gefäß gebracht und an der Deckelhalterung ein Stück Eisendraht befestigt.

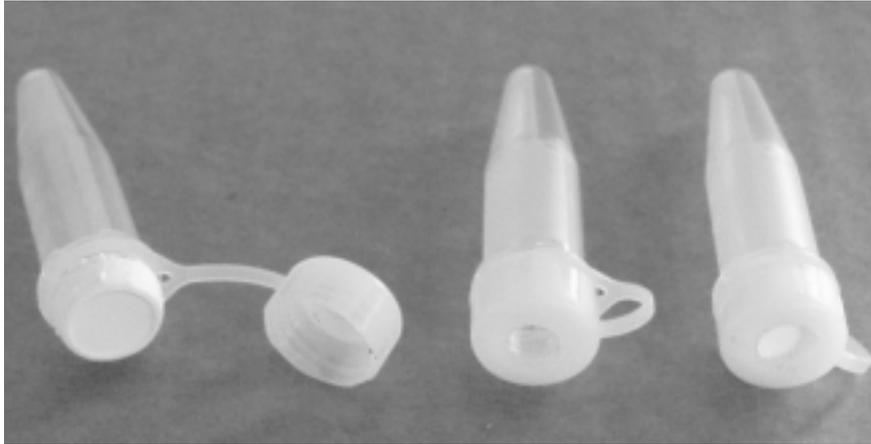


Abbildung 3: Diffusionskeimträger aus Eppendorf - Reaktionsgefäß "Safe Twist" mit anhängendem Schraubdeckel

4.2 Laborbiogasanlage

4.2.1 Komponenten und Betriebsweise der Laborbiogasanlage

Für die Untersuchungen zur Vergärung kamen zwei Fermenter zum Einsatz.

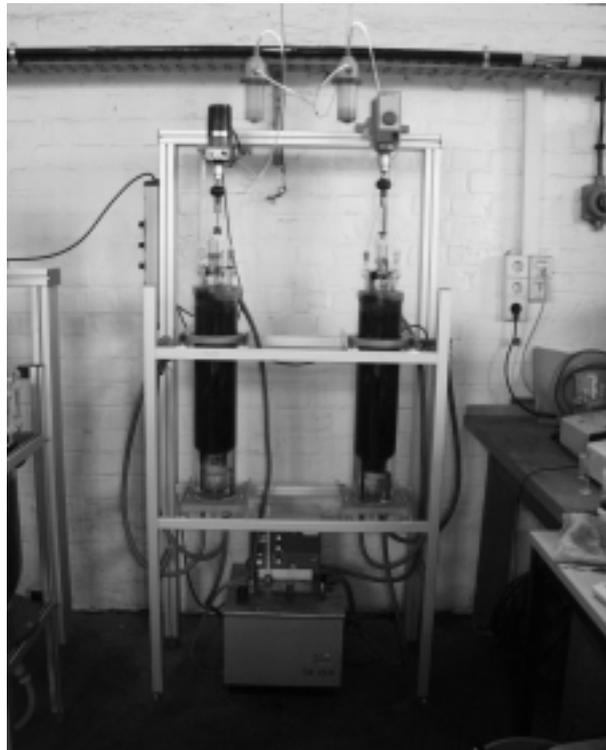


Abbildung 4: Laborbiogasanlage TU Bergakademie Freiberg

Der Fermenter ist in einem Aluminiumgestell gelagert und besteht aus zwei ineinander gesetzten Glaszylindern, in deren Zwischenraum Wasser zur Temperierung des Fermenterinhaltendes zirkuliert. Mit einem Thermostat wird die gewünschte Temperatur beider Behälter eingestellt. Der innere Glaszylinder hat ein Fassungsvermögen von ca. 3,2 l. Davon werden effektiv 3 l mit Substrat befüllt. Die Fermenter sind als Rührfermenter konzipiert und jeweils mit einem senkrechten bis zum Behälterboden reichenden Rührstab mit fünf Propellerrührelementen ausgestattet.

Die Zugabe von Frischsubstrat erfolgt manuell über einen Trichter, der in eine Öffnung des Fermenterdeckels eingesetzt wird. Das ausgefaulte Substrat wird über die am Boden befindliche Ablassereinrichtung (Schlauch) aus dem Fermenter entfernt. Die Gasleitungen der Fermenter führen das erzeugte Biogas über ein Perlgefäß zur Visualisierung des Gasvolumenstromes in den Außenbereich der Versuchshalle. Proben wurden gesammelt und der Methangehalt mittels Flammenionisationsdetektor durch Einzelmessungen bestimmt.

Weitere Angaben zur Mess-, Steuer- und Regelungstechnik sind der Dokumentation der TU Freiberg zu entnehmen.

4.2.2 Analysen zur Prozesscharakterisierung

Von Seiten der TU Bergakademie Freiberg wurden Daten erfasst, die den Prozess der Gärung beschreiben.

Bestimmung des TS/oTS-Gehaltes

Es wurde der Trockensubstanzgehalt und der organische Anteil vom Ausgangs- und Endsubstrat im Trockenschrank und Muffelofen bestimmt.

Bestimmung des C/N-Verhältnisses

Elementaranalyse

Bestimmung flüchtiger Fettsäuren (speziell Essig- und Propionsäure)

Flüchtige Fettsäuren im ausgefaulten Material wurden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ermittelt.

Bestimmung des Ammoniumstickstoffes

Der Ammoniumstickstoffgehalt des Gärsubstrates wurde mittels Schnelltest der Fa. Merck bestimmt.

4.3 Technische Biogasanlage für Praxisversuche

Für die Versuche stand ein 1997 in Betrieb genommener 150 m³-Rohrreaktor (Abbildung 6, siehe auch Titelbild) der Friweika e.G. in Weidensdorf zur Verfügung, der zur Behandlung von Kartoff-

fehlend eingesetzt wird. Der Fermenter arbeitet im Durchflussverfahren. Dabei wandert das Substrat in einer Pfropfenströmung durch den Behälter. Die Verweilzeit liegt bei 30 bis 50 Tagen. Für die Untersuchungen wurde diese Anlage mit einer Prozesstemperatur von 38 bis 39 °C betrieben. Zum Einfüllen und Abscheiden der Diffusionskeimträger wurden vom Betreiber der Anlage entsprechende technische Einrichtungen angebracht (Abbildung 7).

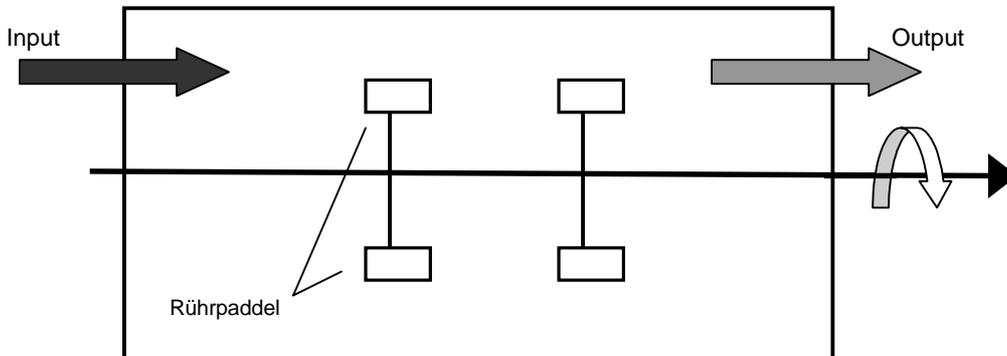


Abbildung 5: Schema des Durchflusses in einem liegenden Fermenter mit Längsachse



Abbildung 6: Fermenter in der Friweika e.G.



Abbildung 7: Sieb zum Auffangen der Diffusionskeimträger

4.4 Beschreibung der Fermentationsversuche

Es wurden Fermentationsversuche unter anaeroben, mesophilen Bedingungen mit Cms-infizierter Kartoffelmasse (Gemisch von Gärsubstanz mit kontaminierten Kartoffeln) und mit Bakteriensuspension befüllten Diffusionskeimträgern in einer Laborbiogasanlage und einer großtechnischen Biogasanlage durchgeführt. Anschließend wurden der Gärrest bzw. der Inhalt der Diffusionskeimträger auf das Vorhandensein der Keime überprüft.

4.4.1 Laborbiogasanlage

Die mesophile Behandlung (34 bis 36 °C) wurde sowohl im Batchbetrieb (diskontinuierlich) als auch im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt.

Zum Start des anaeroben Fermentationsprozesses diente ausgefaultes Substrat vom Bodenablass des mesophilen UASB (upflow anaerobic sludge bed)-Abwasserfermenters der Friweika e.G.

Das Animpfmaterial hatte folgende Eigenschaften:

- Temperatur beim Befüllen 30,5 °C (ursprünglich 32 °C im UASB-Fermenter)
- Leitfähigkeit 4,2 mS/ cm
- pH- Wert 6,75
- Trockensubstanzgehalt 7,1 %

Am folgenden Tag wurde begonnen, den beiden Fermentern Frischsubstrat (zerkleinerte, rohe Kartoffeln) zuzugeben. Nach zwei Tagen setzte die Gasbildung langsam ein. Im Batchbetrieb (diskontinuierlich) wurden in mehreren Schritten insgesamt 500 ml Gärsubstanz aus dem 3-L-Fermenter abgelassen und in fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 100 ml Cms-kontaminierte Kartoffelmasse dem Prozess zugeführt. Nach der Beschickung lief die Anlage 28 Tage lang ohne weitere Zufuhr.

In den kontinuierlichen Gärversuchen mit Diffusionskeimträgern wurde den beiden Fermentern täglich Frischsubstrat zugegeben. Nach Erreichen des maximalen Füllstandes erfolgte einmal wöchentlich das Ablassen einer größeren Menge ausgefaulten Substrates (entsprechend der in dieser Woche insgesamt zugeführten Substratmenge). Abbildung 8 zeigt das Anbringen von Diffusionskeimträgern an der Rührachse der Laborfermenter. Das kurzzeitige Öffnen der Behälter zum Anbringen bzw. Entnehmen der Keimträger hatte keine Auswirkungen auf die Stabilität des anaeroben Prozesses.



Abbildung 8: Einsetzen der Diffusionskeimträger in die Zwischenräume der Rührelemente der Laboranlage

In den Zwischenräumen der Röhrelemente wurden jeweils ein bis drei Keimträger angebracht. Damit belief sich die Anzahl der Keimträger pro Fermenter bis zu zwölf Stück.

Zusammengefasst galten für den Betrieb der Laboranlage folgende Bedingungen:

- mesophiler Temperaturbereich bei 34 bis 36°C
- optimaler pH-Wert-Bereich bei 6,5 bis 8,0
- einstufige Prozessführung
- Batch- und kontinuierlicher Betrieb (täglich ein- bis mehrmalige manuelle Substratzugabe und -entnahme, kein Wochenendbetrieb)
- Raumbelastung entsprechend der Prozessstabilität (beurteilt nach pH-Wert und Methangehalt zwischen 0,5 und 4 kg oTS/(m³ d)
- das Faulraumvolumen im Fermenter beträgt bei kontinuierlicher Fahrweise etwa 0,0029 m³
- Rührbetrieb erfolgte in Intervallen
- Rührintensität nach Bedarf (Auflösung von Sink- und Schwimmschichten)
- Probennahme für Analyse von TS, oTS, freien Fettsäuren, pH-Wert und Ammoniumgehalt

Über den Zeitraum der Versuche existiert eine exakte technische Dokumentation, die den Prozess der Anaerobbehandlung charakterisiert. Die Messung des Temperaturverlaufes, der Raumbelastung, des pH-Wertes, des Methangehaltes, der freien Fettsäuren Essig- und Propionsäure, die Ermittlung der Abbauraten der organischen Substanz und weiterer Werte belegen einen durchgehenden anaeroben Fermentationsprozess in allen Versuchen.

4.4.2 Technische Biogasanlage

Wie im Kap. 4.3 beschrieben, wurde nach anfänglichen Versuchen mit Keimträgern nach RAPP der oben dargestellte Eigenbau aus Eppendorf-Reaktionsgefäßen verwandt. Die Keimträger wurden über eine Pumpe in den Reaktor eingebracht und über ein Sieb aus dem Gärrest aufgefangen. Das Schwimmverhalten wurde der Dichte im Substrat angepasst, um das Aufschwimmen bzw. Absinken zu verhindern. Trotz verschiedener technischer Eingriffe gelang es nicht, die Keimträger entsprechend der vorgegebenen Verweilzeiten der Gärmasse mit 30 bis 50 Tagen im Reaktor zu halten. Vielfach wurden die Gefäße beim Durchgang durch den Fermenter auch beschädigt, so dass eine Auswertung der Versuche nur bedingt vorgenommen werden konnte.



Abbildung 9: Kleiner Diffusionskeimträger im Schwimmversuch. Zur Beschwerung wurde ein Draht am Deckel befestigt. In der Spitze des Behältnisses klemmten Polystyrolstücke, die das Eintauchen der Membran im Substrat sicherten

4.5 Diagnose

Für den Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) wurden Verfahren gewählt, die in der Richtlinie 93/85/EWG des Rates vom 4. Oktober 1993 zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel angeführt sind. Es wurde nach den optimierten Diagnoseprotokollen der bereits in Umlauf gebrachten Änderungen (2004 im Entwurf) der Anhänge o. g. Richtlinie der Kommission gearbeitet. Das sind der Immunfluoreszenztest (IFA), der Eierfrucht- bzw. Biotest, der Ausstrich auf Nährmedium (Plattentest) und die Polymerasekettenreaktion (PCR). Auf eine detaillierte Beschreibung der Methoden kann verzichtet werden, da diese in der Richtlinie exakt beschrieben sind. Es sind hier lediglich Besonderheiten angefügt, die die Untersuchungsbedingungen im Labor beschreiben.

4.5.1 Probengewinnung und -aufbereitung

Fermenter mit Gäransatz und infizierten Kartoffeln (diskontinuierlicher Betrieb, Batchversuche)
Zirka 200 ml der Gärsubstanz wurden bei den wöchentlichen Probenahmen mit einem Schlauch aus dem Fermenter abgelassen und in einem Plastikgefäß aufgefangen. Nach gekühltem Transport wurden jeweils 150 ml Probe 10 min mit 180 g bei 8 °C zentrifugiert. Dabei setzten sich grobe Bestandteile ab. Nach Dekantieren der Probe erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter Verwendung des Überstandes für 15 min. mit 7 000 g und 8 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml 0,01 M Phosphatpuffer aufgenommen. Die Aufbewahrung der Probe erfolgte in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei 6 °C im Kühlschrank.

Fermenter mit Diffusionskeimträgern (kontinuierlicher Betrieb)

Der gesamte Inhalt des Keimträgers wurde mit 100 ml 0,05 M Phosphatpuffer 30 min. geschüttelt. Nach Überführung der Probe in den Zentrifugenbecher schloss sich die Zentrifugation wie oben beschrieben an. Bei Verwendung von Bakteriensuspension wurde diese nach der Entnahme aliquotiert und ebenfalls im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt.

4.5.2 Immunfluoreszenztest (IFA)

Die Durchführung erfolgte nach oben beschriebener Richtlinie. Folgende Bedingungen charakterisieren den Test:

- Polyklonales Antiserum aus Kaninchen, BBA (Rohloff)
- Auswertung bei 1000-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop Axiolab in den Verdünnungsstufen 1/1; 1/10; 1/100 und 1/1000

4.5.3 Immunfluorescence colony staining (IFC)

Der Test ermöglicht den Nachweis auf Nährmedien gewachsener Kolonien mit einem farbstoffmarkierten Antikörper. In ersten Versuchen wurde die Eignung des IFC zum Nachweis überlebender Erregerzellen geprüft. Der Test ist bereits 1987 von VAN VUURDE beschrieben und zur Isolation pathogener, aber auch kreuzreagierender Bakterienarten empfohlen. Die aktuell angewandte Methode wurde von Müller, BBA Kleinmachnow übernommen.

4.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Durchführung erfolgte nach oben beschriebener Richtlinie.

Folgende Bedingungen charakterisieren den Test:

- Reinigung der DNA in Minisäulen der Fa. Quiagen mit DNeasy Plant Kit
- PCR in 50 µl-Ansätzen in 200 µl-Eppendorf-Reaktionsgefäßen im UNO-Thermoblock oder T3-Thermocycler von Biometra durchgeführt
- Ansatz mit optimiertem Mix mit Primern nach MILLS und nach PASTRIK
- Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen

4.5.5 Plattentest mit semiselektivem Nährmedium YMM-AB

Von der aus den Diffusionskeimträgern gewonnenen Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis 1:1000 hergestellt. Sowohl von der unverdünnten Probe, als auch von jeder Verdünnungsstufe wurden 50 µl Suspension auf der Platte mit einer Öse verteilt. Mit der benetzten Öse wurde eine zweite Platte bestrichen.

Es wurde das YMM-Medium mit Zusatz von Antibiotika nach JANSING verwendet, welches mit dem validierten Selektivnährmedium MTNA nahezu identisch ist.

4.5.6 Biotest mit *Solanum melongena* L.

Neben dem Plattentest hatte der Biotest auf *Solanum melongena* ‚Black Beauty‘, der Aubergine oder Eierfrucht pflanze, besondere Bedeutung zum Nachweis überlebender und noch lebensfähiger Bakterien.

Folgende Bedingungen charakterisieren den Test:

- Anzucht der Pflanzen im 9er Topf, Pflanzen vor dem Test ein bis zwei Tage trocken gehalten
- Inokulation von 12 Pflanzen je Probe, Positiv- und Negativkontrollen. Durchführung der Tests in klimatisierten Wuchskammern (14 h Tag 20 – 21 °C; 10 h Nacht 19 – 20 °C), ca. 7 000 Lux
- Rücktests mittels IFA, PCR und Plattentest an oberflächensterilisierten Stängelstücken, entnommen oberhalb des ersten Laubblattansatzes
- Bei Rücktests Anreicherung des Pflanzensaftes durch Zentrifugation 5 min 7 000 g. Das Pellet wurde mit 1 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2 aufgenommen



Abbildung 10: *Solanum melongena* L. mit typischen Symptomen, verursacht durch Cms

5 Ergebnisse

5.1 Voruntersuchungen

In Vorläufertests (Tabelle 1) wurde untersucht, ob der Gärrest Einfluss auf die Nachweissicherheit in der PCR hat oder ob inhibitorische Effekte die Nachweisgrenzen im System nachteilig beeinflussen.

Tabelle 1: Feststellung der Nachweisgrenze für Cms mit der PCR

	10 ⁶ KBE/ml	10 ⁵ KBE/ml	10 ⁴ KBE/ml	10 ³ KBE/ml	10 ² KBE/ml
Cms-Stamm	+	+	+	-	-
Cms-kontaminierte Gärsubstanz	+	+	+	-	-

KBE = koloniebildende Einheiten

In einem weiteren Ansatz (Tabelle 2) wurde die Empfindlichkeit des Biotests unter unseren Versuchsbedingungen geprüft.

Tabelle 2: Nachweisgrenze für Cms im Eierfruchttest an Aubergine, *Solanum melongena* L.

KBE/ml	Eierfruchttest			Aubergine in Aubergine	
	Symptome nach vier Wochen	IFA	PCR	Symptome nach vier Wochen	IFA/PCR
10 ⁶	+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+
10 ²	-	+	+	+	+
10 ¹	-	-	-	-	-

Auswertung

Die geforderte Nachweisgrenze in der PCR bei 10⁴ KBE/ml wurde erreicht (Tabelle 1). Inhibitorische Effekte traten nicht auf. Gleichfalls wurden unter den optimalen Wachstumsbedingungen im Biotest bis zu 10² koloniebildende Einheiten (KBE) von Cms je Milliliter nachgewiesen. Wurde bei der Konzentrationsstufe 10² KBE der aufkonzentrierte Saft der nach vier Wochen entnommenen Stängelstücke nochmals in neue Auberginenpflanzen gegeben (Aubergine in Aubergine), so konnten auch in dieser Verdünnung die typischen Symptome reproduziert werden (Tabelle 2).

5.2 Laborbiogasanlage

Fermenter befüllt mit Gärsubstanz und Cms-infizierter Kartoffelmasse:

Versuchsbeschreibung (1): 2,5 l Gärsubstanz + 0,5 l zerkleinertes und wenige Tage im Kühlschrank gelagertes, künstlich kontaminiertes und nachweislich infiziertes Frischsubstrat aus Kartoffelstücken. Batch-Betrieb, wöchentliche Entnahme von Proben.

Ergebnisse: Tabelle 3

Tabelle 3: Ergebnisse Batchversuch

Probenahmezeitpunkt	Proben-Nr.	PCR	Biotest		
			Symptome	IFA	PCR
1 Woche	54	+	-	-	-
2 Wochen	56	+	-	-	-
3 Wochen	58	+	-	-	-
4 Wochen	60	-	-	-	-

Auswertung: Noch nach drei Wochen ist der Nachweis von Cms in der PCR positiv. Im Biotest können bereits nach einer Woche keine vitalen Bakterien mehr nachgewiesen werden.

Fermenter mit Diffusionskeimträgern, die mit Frischsubstraten befüllt sind:

Versuchsbeschreibung (2): Vortest zur Eignung der Keimträger nach RAPP, **Membran 0,2 µm**. Befüllung der Keimträger mit Bakteriensuspension (ca. 10⁸ KBE / ml) in Probe 63 und 66 und mit künstlich kontaminiertem Frischsubstrat aus Kartoffelstücken (siehe 5.3.1). Kontinuierlicher Betrieb der Anlage, Entnahme von Proben nach zwei Tagen und einer Woche.

Ergebnisse: Tabelle 4

Tabelle 4: Eignungstest Diffusionskeimträger

Kurzbeschreibung/ Probennahme nach	Proben-Nr.	IFA	PCR	Biotest		
				Symptome	IFA	PCR
Cms-Bakterien-Suspension / 2 Tagen	63	+	+	-	-	-
Cms-Bakterien-Suspension / 1 Woche	66	+	+	-	-	-
Cms-Kartoffelmasse/ 2 Tagen	64	+	+	-	-	-
Cms-Kartoffelmasse/ 1 Woche	65	+	+	-	-	-

Auswertung: Technische Eignung der Keimträger für weitere Tests gegeben. Kein Austreten von Probenmaterial in umgebende Gärlösung festgestellt.

Versuchsbeschreibung (3): Keimträger nach RAPP, Membran 0,45 µm. Befüllung mit künstlich kontaminiertem Frischsubstrat aus Kartoffelstücken (siehe 5.3.1) und Gärsubstanz im Verhältnis 1:1.

Ergebnisse: Tabelle 5

Tabelle 5: Diffusionskeimträger nach RAPP mit einem Gemisch aus Cms-kontaminierter Kartoffel und Gärsubstanz im Verhältnis 1:1

Probenahme nach	Proben-Nr.	IFA	PCR	Biotest		
				Symptome	IFA	PCR
vor Zugabe	68	+	+	+	+	+
1 Woche	70	+	+	-	-	-
2 Wochen	72	+	+	-	-	-
3 Wochen	77	+	+	-	-	-
4 Wochen	79	-	+	-	-	-

Fermenter mit Diffusionskeimträgern, die mit Bakteriensuspension befüllt sind:

Versuchsbeschreibung (4): Keimträger nach RAPP bzw. aus Eppendorf-Reaktionsgefäßen, Membran 0,2 µm. Befüllung mit Bakteriensuspension definierter Zellzahl. Kontinuierlicher Betrieb der Anlage, wöchentliche Entnahme von Proben bis zu einer Verweilzeit von vier Wochen.

Ergebnisse: Tabellen 6 bis 8

Tabelle 6: Diffusionskeimträger nach RAPP mit einer Cms-Bakteriensuspension 10⁷ KBE/ml - Rückteste unter Einbezug eines Plattentests mit semiselektivem Nährmedium YMM-AB

Entnahmezeitpunkt	Proben-Nr.		IFA / PCR	1. und 2. Biotest (von Aub in Aub)	YMM-AB		
					Cms-ähnliche Kolonien	IFA	PCR
vor Zugabe	81	1	+	+	n.d.*	n.d.*	n.d.*
1 Woche	82	1	+	-	+	+	-
		2	+	-	-	-	-
2 Wochen	83	1	+	-	+	+	+
		2	+	-	+	+	+
		3	+	-	+	+	-
3 Wochen	84	1	+	-	-	-	-
		2	+	-	+	+	-
		3	+	-	-	-	-
4 Wochen	85	1	+	-	+	+	+
		2	+	-	-	-	-
		3	+	-	+	+	+

*n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 7: Diffusionskeimträger aus Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit einer Cms-Bakteriensuspension 10^7 KBE/ml - Rückteste unter Einbezug eines Plattentests mit semiselektivem Nährmedium YMM-AB

Entnahmezeitpunkt	Proben-Nr.		IFA / PCR	1. und 2. Biotest (von Aub in Aub)	YMM-AB		
					Cms-ähnliche Kolonien	IFA	PCR
vor Zugabe	86	1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
1 Woche	87	1	+	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-
2 Wochen	88	1	+	-	+	+	+
		2	+	-	+	-	+
		3	+	-	+	+	-
3 Wochen	89	1	+	-	+	+	+
		2	+	-	+	-	-
		3	nicht durchführbar				
4 Wochen	90	1	+	-	+	-	-
		2	+	-	+	+	-
		3	+	-	+	-	+

Tabelle 8: Diffusionskeimträger nach RAPP mit einer Cms-Bakteriensuspension (10^8 KBE/ml) - Rückteste unter Einbezug eines Plattentests mit semiselektivem Nährmedium YMM-AB. Nachweis der Pathogenität.

Entnahmezeitpunkt	Proben-Nr.		IFA / PCR	Biotest	Plattentest YMM-AB		
					Cms-ähnliche Kolonien	PCR	Pathotest
vor Zugabe	92	1	+	+	+	+	+
1 Woche	93	1	+	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	-
		3	+	-	+	-	-
2 Wochen	94	1	+	-	-	-	-
		2	+	-	+	-	-
		3	+	-	-	-	-
3 Wochen	95	1	+	-	-	-	-
		2	+	-	+	+	+
		3	+	-	-	-	-
4 Wochen	96	1	+	-	+	+	+
		2	+	-	+	+	+
		3	+	-	+	+	+

Auswertung:

In den Versuchen war es möglich, die Proben aus den Keimträgern neben der bisher üblichen Testung auch auf das semiselektive Nährmedium YMM-AB zu übertragen, ohne dass es zum starken Wachstum saprophytischer Begleitflora kam. Vereinzelt wuchsen auf den Platten Cms-ähnliche Kolonien, die mittels IFA – sicherer aber in der PCR – als *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepe-donicus* identifiziert wurden. Bei den Versuchen in Tabelle 8 wurde die Pathogenität dieser abisolierten Bakterien nach Passage auf antibiotikafreiem Nährmedium bestätigt.

Der direkte Biotest mit Gärresten aus den Keimträgern war wie in allen vorangegangenen Versuchen negativ. In Tabelle 6 und 7 wurde ein 2. Biotest durchgeführt (vgl. Voruntersuchungen Kap. 5.1, Nachweisgrenze im Eierfruchttest). Auch unter diesen ausgezeichneten Bedingungen einer selektiven Anreicherung im Bioindikator, der Eierfrucht (*Solanum melongena*), kam es zu keinem Positivnachweis von Cms.

Versuchsbeschreibung (5): Keimträger nach RAPP, Membran 0,2 µm. Befüllung mit Bakterien-suspension von 10⁴ bis 10⁸ KBE/ml. Kontinuierlicher Betrieb der Anlage, Entnahme der randomisierten Proben nach einer Verweilzeit von vier Wochen.

Ergebnisse: zwei Versuche, zusammengefasst in Tabelle 9

Tabelle 9: Diffusionskeimträger nach RAPP mit Cms-Bakteriensuspension in verschiedenen Erregerdichten

KBE/ml	Proben-Nr.	YMM-AB		Eierfruchttest		
		Kolonien	PCR	Symptome	IFA	PCR
10 ⁴	401,424, 426	+	–	–	–	–
	400, 402, 425	–				
10 ⁵	403, 404, 428, 429	+	–	–	–	–
	427	–				
10 ⁶	406, 407, 408, 431,	+	–	–	–	–
	430, 432	–				
10 ⁸	409, 433, 434	+	–	–	–	–
	410, 411, 435	–				

Auswertung:

Im Plattentest wuchsen bei einigen Proben vereinzelt Kolonien. In der Rücktestung mit der PCR und im Biotest wurde kein Cms nachgewiesen.

5.3 Praxisversuche in technischer Biogasanlage

Versuchsbeschreibung (6): Keimträger nach ROTH, Membran 0,2 µm. Befüllung mit Bakterien-suspension von 10⁸ KBE/ml.

Anmerkung: Der Versuch wurde beim vorzeitigen Ausstoß der Mehrzahl der Keimträger abgebrochen. In keinem Fall gelang es, die angestrebte Verweilzeit von 28 Tagen zu erreichen. Einzelne, bereits nach wenigen Stunden ausgetretene Keimträger wurden dem Prozess wieder zugefügt.

Ergebnisse: Tabelle 10

Tabelle 10: Diffusionskeimträgern nach ROTH mit einer Cms-Bakteriensuspension (10⁸ KBE/ml)

Proben-Nr.	Zahl der Keim-träger	Verweilzeit	YMM-AB		Biotest		
			Kolonien	PCR	Symptome	IFA	PCR
200 – 209	10	12 Tage	+	–	–	–	–
251 – 260	10	17 Tage	+	–	–	–	–

Auswertung:

In allen Fällen wuchsen im Plattentest auf YMM-AB Kolonien, die aber in keinem Falle als Cms identifiziert werden konnten. Da bei der Entnahme der Suspension vielfach eine Beschädigung der semipermeablen Membran zu beobachten war, ist das Eindringen von Fremdbakterien als wahrscheinlich anzunehmen. Möglicherweise haben diese das gesuchte Zielobjekt auch überwachsen. Auch ein zweiter Versuch führte zu einem ähnlichen, nur bedingt auswertbaren Ergebnis.

6 Diskussion und Schlussfolgerungen

Die biotechnologische Aufbereitung von Abfällen (Kompostierung oder Vergärung) muss zu einem sicheren, phytohygienisch unbedenklichen Produkt (Komposte oder Gärrückstände) führen (LORENZ et al., 2000). In einer ökologisch sinnvollen Kreislaufwirtschaft sind dabei alle Fragen zur Abtötung von Quarantäneschadorganismen mit besonderer Sorgfalt zu betrachten. Die Hygieneanforderungen zur Behandlung von Bioabfällen mit einer Wiederverwendung auf landwirtschaftlich, gärtnerisch und forstwirtschaftlich genutzten Flächen sind in der Bioabfallverordnung hinterlegt. Alle Angaben zur „phytohygienischen Unbedenklichkeit“ beruhen – stellvertretend für andere Schadorganismen – auf dem Leiterregerkonzept. In einem derzeit diskutierten Entwurf zur Änderung des Anhang 2 (Phytohygiene) der BioAbfV wird nach o. g. Prinzip ein gleiches Sicherheitsniveau auch für die Anaerobbehandlung gefordert. Auch wenn der Kenntnisstand über die Tenazität von pflanzlichen Schaderregern in Anaerobanlagen aktuell erweitert wurde (LORENZ, 2004), liegen nur wenige

Daten zur Bewertung von Quarantäneschadorganismen, insbesondere *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, dem Erreger der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel, vor.

Die Kartoffelwirtschaft verfügt im Bundesland Sachsen über beträchtliche Verarbeitungskapazitäten. Zufuhren an Speise- und Wirtschaftskartoffeln sind erforderlich. Auch wenn umfangreiche Kontrollen der Pflanz- und Speisekartoffelaufwüchse seitens der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft erfolgen, ist die Möglichkeit einer Kontamination von verarbeiteten Partien mit Cms nicht auszuschließen. Wie im Kapitel 3 unter der Aufgabenstellung festgehalten, sollten im Projekt energiesparende Möglichkeiten zur Entsorgung befallener Partien überprüft werden. Die Wahl der Prüfung fiel bewusst auf eine mesophile Temperaturführung, die in einzelbetrieblichen und gemeinschaftlichen Kofermentationsanlagen der Landwirtschaft in der Regel genutzt werden. Das Bakterium *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* zeichnet sich nicht durch besondere Merkmale einer hohen Überlebensfähigkeit aus. Es bildet keine Dauerorgane und verliert bei Temperaturen um 50 °C (thermaler Tötungspunkt) seine Lebensfähigkeit. Wie in zahlreichen Untersuchungen sichergestellt (RYCKEBOER, 2002) führen im Prozess der mesophilen Anaerobbehandlung auch toxisch verlaufende Prozesse und das Zerbrechen der zellulären Strukturen zum Tod des Erregers. Eine mesophile Temperaturführung erlaubte auch Rückschlüsse auf das Verhalten des Erregers bei suboptimalen Reaktionsbedingungen in Vergärungsanlagen mit thermophiler Prozessführung bei Temperaturen > 50 °C. Diese können eine kürzere Verweildauer der Abfallmatrix („kalter Durchzug“) oder auch eine Unterschreitung der Temperatur sein.

Die Nutzung einer Laborbiogasanlage in der TU Bergakademie Freiberg bot bei der Gesamtheit der Versuche den Vorzug exakter und überschaubarer Versuchsanstellungen. Die Kontrolle zahlreicher prozesscharakterisierender Parameter dokumentierte einen stabilen anaeroben Fermentationsverlauf. Bei den Versuchen in der Praxisanlage der Friweika e.G. Weidensdorf beeinträchtigten mechanische Beschädigungen an den Keimträgern und unkalkulierbare Strömungsverhältnisse (Verweilzeiten) die Versuchsauswertung.

Die Versuche in der Laborbiogasanlage folgten keinem einheitlichen Versuchsdesign und haben den Charakter einer Beobachtungsstudie. Fasst man vergleichbare Versuchsansätze zusammen (Abbildung 9), so ist festzustellen, dass in keinem Falle der Nachweis über den Biotest direkt aus dem Gärrest zu einem positiven Ergebnis führte; d. h. überlebende und virulente Bakterien wurden im verwendeten Indikator zu allen Entnahmezeitpunkten nicht nachgewiesen. Dies trifft auch für alle anderen Versuche zu, die in dieser Gegenüberstellung nicht mit erfasst sind. Schon nach einer Exposition von einer Woche ist der Erreger im mesophilen Temperaturbereich (34 °C bis 36 °C) nicht mehr nachweisbar. Dies traf für bakterienhaltigen Gewebeprei mit unbekanntem Keimzahlen aus künstlich infizierten Kartoffeln ebenso zu wie für Bakteriensuspensionen im Keimträger-Versuch mit Zellzahlen bis zu 10⁸ KBE/ ml. Die Ergebnisse der PCR und IFA konnten zum Nachweis überlebensfähiger Bakterien nicht genutzt werden und sind in der Abbildung 9 auch nicht

enthalten. Bei nahezu allen Expositionszeiten war der Test positiv, Erreger-DNA oder auch abgestorbene Zellen waren immer nachzuweisen.

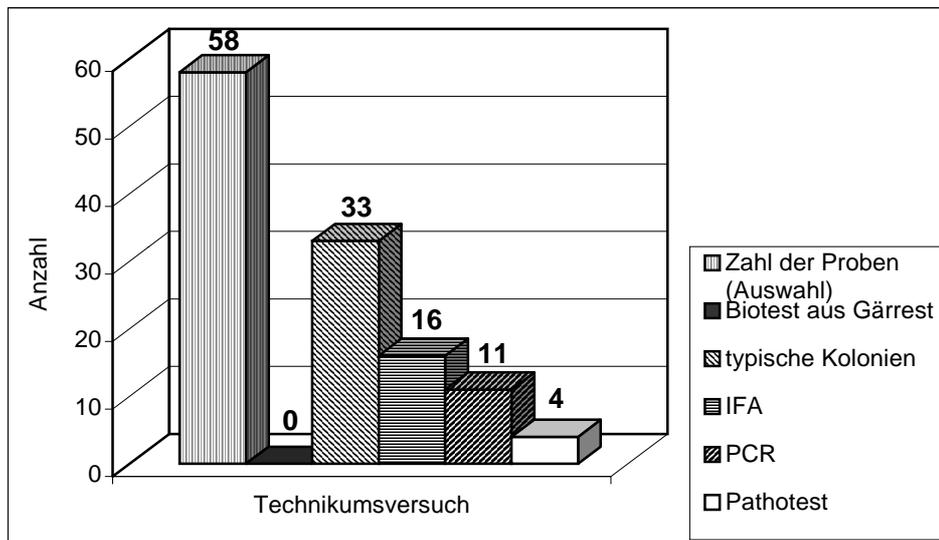


Abbildung 9: Zusammenfassung vergleichbarer Versuche zum Nachweis überlebensfähiger Bakterien (Cms) im Laborfermenter (Technikumsversuche) – Beschreibung vgl. Text

Im späteren Versuchsablauf wurde gezielt versucht, durch Ausplattieren auf semiselektiven Nährmedien auch wenige überlebende Bakterien zu gewinnen. Verdächtige Kolonien wurden auf einem Universalmedium vermehrt und mittels PCR und IFA als Cms detektiert. In einigen Versuchen wurde auch ein Pathogenitätstest durchgeführt, der die Virulenz der als Cms erkannten Bakterien bestätigte. Damit ist der Nachweis erbracht, dass in einzelnen Fällen auch nach Expositionszeiten von vier Wochen wenige Bakterienzellen den Prozess der mesophilen Vergärung aktiv überstehen können. Zieht man in Betracht, dass die Nachweisgrenze im Biotest etwa zwischen 10^2 und 10^3 KBE/ml liegt, unter Umständen auch niedrigere Keimdichten nachgewiesen werden können (ZIELKE und NAUMANN 1984), so ist sicher, dass das Infektionspotential nach mesophiler Anaerobbehandlung zwar stark reduziert, eine vollständige Inaktivierung aber nicht erreicht wurde. Zu gleicher Schlussfolgerung gelangt man auch, wenn die nicht immer sicher ansprechbare Zahl verdächtiger Kolonien als Berechnungsgrundlage verwendet wird. Diese Versuchsergebnisse wurden erst im letzten Drittel der Projektzeit erzielt. Versuche zur Quantifizierung der Überlebensrate schlugen im ersten Ansatz fehl. Ein weiterer sensitiver Vitalnachweis – das Immunfluoreszenz-Colony-staining (IFC) mit Möglichkeiten zum selektiven Nachweis lebensfähiger Zellen – schlug in ersten Versuchen aus Gärrestproben fehl.

Angaben zur Vergleich von Überlebensraten verschiedener Phytobakterien bei mesophilen Temperaturen in Anaerobanlagen sind selten oder vielfach nicht publiziert. TURNER et al. (1982) beschreibt den raschen Abbau von *Corynebacterium michiganense* (alte Nomenklatur, jetzt *Clavibacter michiganensis*). Bereits nach wenigen Tagen waren im Plattentest keine Bakterien mehr nachweisbar.

Zu gleicher Schlussfolgerung gelangt auch TERMORSHUIZEN et al. (2000) für *Ralstonia solanacearum*, dem Erreger der Schleimkrankheit. In den Versuchen im 300 Liter fassenden Laborfermenter lag die Überlebensrate nach Verweildauer bis zu 21 Tagen unter 0,1 %. Bei Temperaturen um 52 °C studierten RYCKEBOER et al. (2002) das Verhalten von *Ralstonia solanacearum* und stellte einen Abbau innerhalb weniger Stunden fest.

Fasst man alle vorliegenden Ergebnisse zusammen und stellt sie der zitierten Literatur gegenüber (vgl. auch Kapitel 2: Kenntnisstand und Literatur) so kann übereinstimmend festgehalten werden, dass im Prozess der mesophilen Anaerobbehandlung

- der Erreger der bakteriellen Ringfäule zwar drastisch reduziert wird,
- einzelne Bakterienzellen aber nach unseren Untersuchungen überleben können und ihre Pathogenität behalten haben.

Die in unseren Versuchen erzielten Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den Angaben in der Literatur. Sie lassen sich möglicherweise mit der Verwendung eines selektiven Nährmediums erklären, das auch ein sehr langsames Wachstum der Kolonien sicherte. Es wurde auch nicht in allen Versuchen Cms rückisoliert. In einer geplanten Studie mit vereinheitlichtem Versuchsdesign könnte die Überlebensrate besser quantifiziert werden.

Da für Quarantäneschaderegner eine absolute Abtötung gefordert wird, ist bei der Behandlung bakterielle Ringfäule-infizierter Kartoffelpartien eine alleinige mesophile Anaerobbehandlung unzureichend und birgt ein Restrisiko der Weitergabe von Bakterien in sich.

7 Zusammenfassung

Die Bekämpfung der Quarantänekrankheit „bakterielle Ringfäule der Kartoffel“ (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, Cms) beinhaltet neben der allgemeinen Befallserhebung, der Befallsanalyse, den Maßnahmen im Befallsbetrieb und dem gegenseitigen Informationsaustausch auch die fachgerechte Entsorgung der befallenen und wahrscheinlich befallenen Partien. In einer Leitlinie wurden Verwendungen festgelegt, die eine Gefährdung der Kartoffelwirtschaft durch mögliche Rückinfektionen ausschließen, zumindest aber das Risiko des erneuten Erregereintrages in die Kartoffelproduktion minimieren. Die aufgezeigten Möglichkeiten lassen beim Anfall größerer Mengen an Rohware schnell Kapazitätsgrenzen erkennen. In einem Forschungsprojekt wurde unter Beteiligung von wissenschaftlichen und Praxispartnern geprüft, ob bereits unter mesophilen Temperaturbedingungen (36 bis 38 °C) eine Inaktivierung des Erregers Cms in Biogasanlagen erreicht werden kann. Damit sollte ein Beitrag zur fachlichen Bewertung von Behandlungsmaßnahmen bei der Hygienisierung von Kartoffelabfällen geleistet werden.

Die Versuche wurden unter Kontrolle der Gärbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Raumbelastung, Methangehalt, freie Fettsäuren) im 3 l fassenden Laborfermenter durchgeführt. Anfangs wurden diese Fermenter mit infizierter Kartoffelrohmasse befüllt. Im weiteren Verlauf wurden Diffusionskeimträger aus Polycarbonat nach RAPP (15 ml, Porengröße der Membran 0,2 µm) stationär in die Zwischenräume der Rührelemente eingehängt. Diese waren mit Cms-kontaminierter Kartoffelrohmasse und Gärsubstanz im Verhältnis 1:1, später aber mit Bakteriensuspension verschiedener Konzentrationsstufen befüllt. Es gelangten auch kleinere Diffusionskeimträger (1 ml) nach ROTH und Eigenanfertigungen zur Anwendung. Für Praxisversuche stand ein Fermenter mit 150 m³ zur Verfügung.

Jeweils nach ein, zwei, drei und vier Wochen (Technikumsversuche) wurde das Infektionspotential der eingebrachten Proben im Direktnachweis mittels IFA, PCR und Biotest an Eierfruchtpflanzen (Bioindikator) geprüft. Beim Ausbleiben von Symptomen am Bioindikator wurden alle Pflanzen im IFA und PCR rückgetestet und teilweise vom Presssaft der Eierfruchtpflanzen ausgehend ein 2. Biotest angesetzt. Im späteren Verlauf der Untersuchungen wurden die in die Keimträger eingebrachten Bakteriensuspensionen nach den entsprechenden Verweilzeiten im Plattentest auf Selektivmedien ausgestrichen, verdächtige Kolonien passagiert und mittels der PCR und im Bioindikator untersucht. Versuche zur Etablierung des Colony staining direkt aus dem in die Fermenter eingebrachten Untersuchungsgut schlugen fehl.

Bei den verschiedensten Ansätzen (infizierte Kartoffelrohmasse, Erregersuspension) erfolgte mit der PCR ein Positivnachweis. Mit diesem Verfahren ist allerdings auch der Nachweis nicht lebensfähiger Bakterien möglich. In keinem dieser Fälle war der Biotest an Eierfruchtpflanzen positiv, d. h. lebensfähige Bakterien wurden im Direktnachweis nicht gefunden. Wurden die Diffusionskeimträger mit Bakteriensuspensionen von 10⁷ bzw. 10⁸ KBE/ml befüllt, ließen sich in einzelnen Fällen auch noch nach Verweilzeiten von vier Wochen erregertypische Kolonien auf einem Selektivmedium isolieren. Diese isolierten Kolonien waren im Rücktest in der PCR positiv und führten im Biotest an Eierfruchtpflanzen zu erregertypischen Symptomen.

Im Technikumsversuch konnte damit gezeigt werden, dass unter den Bedingungen der mesophilen Vergärung zwar eine deutliche Befallsreduzierung zu beobachten ist, einzelne Bakterien aber überlebten und ihre Pathogenität behielten. Die Anwendung mesophiler Temperaturbedingungen in einer Biogasanlage kann demzufolge nicht für die Hygienisierung von bakterielle Ringfäulebelasteten Kartoffelpartien eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Praxisversuche konnten für eine Aussage nur bedingt genutzt werden.

8 Literatur

- APPEL, O.; (1905): Neuere Untersuchungen über Kartoffel- und Tomatenerkrankungen. Jahresbericht der Vereinigung der Vertreter der angewandten Botanik 3, 122-136
- BIOABFALLVERORDNUNG; BGBl. I-Nr. 65, vom 28. September 1998, S. 2955
- BRÖTHER, H. (2003): Übertragungsmöglichkeiten von bakteriellen Quarantänekrankheiten durch Abprodukte der Kartoffelverarbeitung. Wintertagung der AG Kartoffelzüchtung und Pflanzguterzeugung am 20./21. November 2002, Göttingen
- JANSING, H. (1991): Nachweismethoden für *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, Erreger der bakteriellen Ringfäule an Kartoffeln. Dissertation. Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen
- LANGERFELD, E. (1989): Die bakterielle Ringfäule der Kartoffel (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* Davis et al.) aus biologischer, epidemiologischer, ökologischer und ökonomischer Sicht. Eine Literaturstudie. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzd. 41:153-159
- LORENZ, H.; CHAMSAI, J.; HELLWALD, K.-H.; BUCHENAUER, H. (2000): Untersuchungen zur Phytohygiene bei der anaeroben Vergärung am Beispiel ausgewählter Prüforganismen. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. 376 S. 542 (Zusammenfassung)
- LORENZ, H. (2004): Überprüfung der phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus der anaeroben Behandlung von Bioabfällen. Abschlussbericht. FuE-Vorhaben FKZ 200 33 331, BMVEL
- MARCINISYN, E.; PEITZMEIER, M. und HECKMANN, J. (2004): Überprüfung der phyto- und seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Vergärungsrückständen aus der anaeroben Behandlung von Bioabfällen. TV 3 – Praxisuntersuchungen. Abschlussbericht. FuE-Vorhaben FKZ 200 33 331, BMVEL,
- ORIGINALBEITRÄGE Themenheft Bakterielle Ringfäule, Gesunde Pflanze 56, H. 4-5 2004
- RAPP, A. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Biogemeinschaftsanlagen. Dissertation, Universität Hohenheim, 155 S. und Anhang
- RYCKEBOER, J.; COPS, S. AND COOSEMANS, J. (2002): The Fate of Plant Pathogens and Seeds during Anaerobic Digestion and Aerobic Composting of Source Separated Household Wastes Compost Science & Utilisation 10 No. 3, S. 204 - 216
- STEINMÖLLER, S.; BÜTTNER, C. (2003): Bewertung des Risikos der Verschleppung von Quarantäneschadorganismen mit Abfällen aus den kartoffelverarbeitenden Betrieben Abschlussbericht für das Forschungsvorhaben 02 HS 028, BMVLE
- TURNER, J.; STAFFORD, D.A.; HIGHER, D.E. und CHLARKSON, J. (1983): The reduction of three pathogens (*Fusarium*, *Corynebacterium* and *Globodera*) in anaerobic digesters *Agricult. Wastes* 6 S. 1 - 11
- TERMORSHUIZEN, A.J.; VOLKER, D.; BLOCK, W.J.; BRUMMELER, E. T.; HARTOG, B.J.; JANSE, J.D.; KNOL, W. und WENNEKER, M. (2000): Survival on human and plant pathogens during anaerobic mesophilic

digestion of vegetable, fruit, and garden waste Jahresbericht Biological Farming Systems, Wageningen

UNGER, J.-G.; PIETSCH, M. (2002): Pflanzengesundheitliche Risiken von Klärschlamm, Kompost und anderen organischen Düngern Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft, KTBL-Schrift 404 S. 323 – 333

VAN DER WOLF, J.M.; K. MANSFELD GIESE, P. MÜLLER, R. KARJALAINEN, D. STEAD: Epidemiological studies for control of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot in potato 15th Triennial conference of The European Association for Potato Research (EAPR), Proceedings Book, Hamburg, 14.- 19. Juli 2002, S. 142

www.plant.wageningen-ur.nl/projects/ringrot

ZIELKE, R und NAUMANN, K. (1984): Untersuchungen zur Erfassung des latenten Befallstadiums von *Corynebacterium sepedonicum* (SIECK. et KOTTH.) SKAPT. et BURKH. im Kartoffelgewebe. Zbl. Mikrobiol. 139 S. 267 – 280

9 Projektpartner

Wir danken Herrn Erik Ferchau und Frau Dr. Wesolowski von der Technischen Universität Bergakademie Freiberg, Institut für Wärmetechnik und Thermodynamik, für die ideenreiche Zusammenarbeit.

Herr Kern, Frau Ritzkat und Herrn Dr. Frenzel von der Friweika e.G. Weidensdorf sei für die großzügige Unterstützung bei der Anlage und Betreuung der Versuche ganz herzlich gedankt.

Frau Dr. Petra Müller von der BBA Kleinmachnow unterstützte uns wesentlich durch viele Anregungen bei der Versuchsplanung und mit hilfreichen Diskussionen.

Wir erfuhren viele und nützliche Details von Herrn Dr. Werner Philipp von der Universität Hohenheim, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik und bedanken uns weiterhin bei Herrn Dr. Roth vom Biologischen Umweltlabor BioTEST Leipzig für die Bereitstellung der Diffusionskeimträger.

Herr Enrico Bär und Team, LfL FB 5, stellte die Anzucht der benötigten Testpflanzen sicher.

Impressum

- Herausgeber:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden
Internet: www.landwirtschaft.sachsen.de/lfl
- Autoren:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
Fachbereich Pflanzliche Erzeugung
Dr. Wolfram Wiedemann / Olaf Enderlein
Alttrachau 7
01139 Dresden
Telefon: (03 51) 8 53 04-23 Telefax: (03 51) 8 49 05 70
e-mail: wolfram.wiedemann@fb4a.lfl.smul.sachsen.de
- Redaktion:** siehe Autoren
- Endredaktion:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
Thomas Freitag, Ramona Scheinert
Telefon: (03 51) 26 12-1 38
Telefax: (03 51) 26 12-1 51
E-mail: thomas.freitag@pillnitz.lfl.smul.sachsen.de
- Redaktionsschluss:** November 2004
- Satz:** Christlich-Soziales Bildungswerk Sachsen e. V. Miltitz
- Druck:** Sächsisches Digitaldruck Zentrum GmbH Dresden
- Auflage:** 130 Exemplare
- Bezug:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
Öffentlichkeitsarbeit
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden
Fax: 0351 / 2612 - 151
E-Mail: poststelle@pillnitz.lfl.smul.sachsen.de
- Schutzgebühr:** 12,78 EUR

Diese Broschüre wurde auf chlorfrei gebleichtem sowie alterungsbeständigem Papier (ISO 9706) gedruckt. Die Alterungsbeständigkeit beträgt laut Zertifikat mehr als 200 Jahre.

Für alle angegebenen E-Mail-Adressen gilt:
Kein Zugang für elektronisch signierte sowie für verschlüsselte elektronische Dokumente

Verteilerhinweis

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern im Zeitraum von sechs Monaten vor einer Wahl zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen. Erlaubt ist jedoch den Parteien, diese Informationsschrift zur Unterrichtung ihrer Mitglieder zu verwenden.