

# MISA FERM TS

## PROJEKTABSCHLUSS

Abschlussbericht Projektteil Universität Hohenheim

Zuwendungsempfänger: Universität Hohenheim

Verbundprojekt: MisaFerm TS

Förderkennzeichen: 03VP09082

Bewilligungszeitraum: 01.10.21-31.12.2024

Verfasser:

Ines Lehnert, Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle, Dr. Thorben Schilling

# Inhalt

1. Teil I Kurzbericht.....	1
1.1 Darstellung der Projektergebnisse.....	1
1.1.1 Ursprüngliche Aufgabenstellung.....	2
1.1.2 Ablauf des Vorhabens.....	2
1.1.3 Zusammenfassung der Projektergebnisse am Standort Hohenheim.....	2
2. Teil II Eingehende Darstellung.....	3
2.1 Projektverlauf.....	3
2.1.1 Meilenstein 1 – Standort Riems.....	4
2.1.2 Meilenstein 2 & 3 – Standort Hohenheim.....	4
2.2 Angaben über die Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung.....	15
2.3 Liste der Publikationen.....	15
2.3.1 Konferenzteilnahmen.....	15
2.3.2 Veröffentlichungen.....	16

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Gant-Diagramm - Ursprünglicher Zeitplan.....	4
Abbildung 2	Verlauf des pH-Wertes mit verschiedenen Substratkonzentrationen im Labormaßstab.....	6
Abbildung 3	Verlauf des pH-Wertes in den IBC-Containern mit der optimierten Substratzusammensetzungen in den IBC Containern (durchschnittliche Temperaturen 7 °C)	7
Abbildung 4	Verlauf des pH-Wertes in den IBC-Containern bei winterlichen Temperaturen (durchschnittl. 4 °C).....	8
Abbildung 5	Nachweis der Gramnegativen Bakterien auf Gassner Agar (li) und der Salmonellen auf XLT-4 Agar (re) im Versuchsverlauf bei sommerlicher Witterung mit durchschnittlich 18 °C.....	10
Abbildung 6	Verlauf des pH-Wertes in den IBC-Containern bei sommerlichen Temperaturen (durchschnittl. 18 °C).....	10
Abbildung 7	Nachweis von Mykobakterien auf Middlebrook 7H10 Agar (li) und Salmonellen auf XLT-4 Agar (re) im Versuchsverlauf bei winterlichen Klimabedingungen von rund 4 °C in den IBC-Containern.....	11
Abbildung 8	Nachweis von Mykobakterien auf Middlebrook 7H10 Agar (li) und Salmonellen auf XLT-4 Agar (re) im Versuchsverlauf bei winterlichen Klimabedingungen von rund 4 °C im Feldrandcontainer .....	11

# 1. Teil I Kurzbericht

## 1.1 Darstellung der Projektergebnisse

Flüssige Wirtschaftsdünger fallen in Deutschland in sehr großen Mengen an. Im Rahmen einer nachhaltigen Landwirtschaft sind sie ein wichtiger Bestandteil für das Schließen von inner- und überbetrieblicher Nährstoffkreisläufen. Aber gerade eine überbetriebliche Nutzung von ist mit infektiologischen Risiken verbunden. So können diese Gülle sowohl tier- und humanpathogene Infektionserreger als auch Zoonoseerreger inklusive übertragbarer Antibiotikaresistenzmechanismen enthalten. Durch die Anwendung als organische Düngemittel besteht die Gefahr, dass diese Infektionserreger durch und während der Anwendung zu einem Infektionsrisiko für Mensch und Tier, aber auch zu einer negativen Beeinflussung der Umweltmikrobiome führt (One-Health-Problemkreis). Für die Minimierung dieses Risikos könnte eine praktikable, ohne großen Mehraufwand in die Betriebsroutine der Güllebewirtschaftung integrierbare Methode zur Inaktivierung der Infektionserreger in der Gülle beitragen (**laufende Desinfektion**). Die in diesem Projekt untersuchte milchsaure Fermentation erlaubt eine biologische on-Farm-Behandlung der Gülle unter Zusatz von verfügbaren Kohlenhydratquellen (z.B. Getreide oder Silage etc.). Dieser Vorgang initiiert eine Ansäuerung des Substrates, was wiederum zur Inaktivierung vorhandener Tierseuchenerreger führt. Am Ende entsteht ein Produkt das ohne Zusatz von Chemikalien im Sinne der Hygiene und Epidemiologie als unbedenklich und verkehrsfähig einzustufen ist.

Eine zweite noch wesentlich wichtigere und rechtlich vorgeschriebene desinfizierende Behandlung der flüssigen Fäkalien auf einem tierhaltenden Betrieb besteht im Zusammenhang mit dem Ausbruch von Tierseuchen (**spezielle Desinfektion**). Hier müssen sowohl die Gülle, aber auch alle Futtermittelreste inaktiviert werden, bevor die im Rahmen der Seuchenbekämpfung durchgeführte Sperre der betroffenen Gehöfte aufgehoben werden kann. Diese Zeitspanne ist mit hohen finanziellen Verlusten für die Betriebe verbunden und sollte deshalb durch eine effiziente und zeitlich adäquate Desinfektionsmethode so kurz als möglich sein.

Klassischerweise für die Seuchendesinfektion der Gülle zugelassene Methoden sind die Langzeitlagerung, die chemische Desinfektion oder thermische Verfahren. Alle diese Anwendungen beinhalten sowohl für Landwirte als auch für verantwortliche Tierärzte verschiedene Herausforderungen. So erfordert die Langzeitlagerung ausreichend große Lagerkapazitäten, die gleichzeitig auch gegen externe Einflüsse und die Ausbreitung in die Umwelt geschützt sein muss. Chemische entsprechend kostenaufwendige Verfahren verursachen je nach eingesetztem Desinfektionsmittel ein Risiko für den Anwender und eine aufwendige Entsorgung. Für die thermische Behandlung müssen entsprechende

Einrichtungen vorhanden sein. Auch die Desinfektion von Futterresten zeigt sich nicht weniger aufwändig. Auch hier stellt die milchsäure Fermentation unter Verwendung der am Ausbruchsgehöft vorhandenen Kohlenhydratquellen (Futterreste) eine wertvolle und nachhaltige Alternative dar.

### 1.1.1 Ursprüngliche Aufgabenstellung

Zur Etablierung dieser neuartigen alternativen Desinfektionsmethode für Gülle, die entscheidende Vorteile gegenüber den bestehenden bringt, sollten die Prozessparameter Kohlenhydratquelle, Temperatur und Dauer der Fermentation für den Desinfektionserfolg (Reduktion untersuchter Pathogene um vier bis fünf  $\log_{10}$ -Stufen) validiert werden. Ziel war es, einen Desinfektionserfolg bei einer Durchschnittstemperatur von 21 °C in zwei bis drei Wochen und bei einer Durchschnittstemperatur von 10 °C in drei bis acht Wochen zu erreichen. Die Arbeiten des Verbundprojektes waren auf zwei Standorte aufgeteilt. Am Projektstandort FLI in Riems sollten die Erreger der wirtschaftlich besonders relevanten bakteriellen und viralen Erkrankungen unter Laborbedingungen bearbeitet werden. An der Universität Hohenheim sollten Versuche mit ähnlichen, weniger virulenten Erregern, sog. Surrogaterregern im größeren Maßstab und im jahreszeitlichen Verlauf durchgeführt werden, um die Umsetzbarkeit der Methode in die Praxis zu untersuchen.

### 1.1.2 Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde auf drei Jahre mit insgesamt drei Meilensteinen angesetzt und war in insgesamt 24 Arbeitspakete untergliedert. Im ersten Jahr wurden Versuche zur Festlegung von Indikatoren für das Monitoring des Prozesses und der Validierung des Desinfektionserfolges ausschließlich am Standort FLI durchgeführt. Dafür war die an der Universität Hohenheim angestellte Doktorandin im ersten Projektjahr am FLI. Im zweiten und dritten Projektjahr fanden die Validierungsversuche im Feldmaßstab am Standort Hohenheim statt.

### 1.1.3 Zusammenfassung der Projektergebnisse am Standort Hohenheim

Die Umsetzung der Methode der milchsäuren Fermentation von Gülle zur Inaktivierung von Pathogenen in den Feldmaßstab (bis 65 m<sup>3</sup>) wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei wurden die für die Initiierung des Fermentationsprozesses notwendigen Kohlenhydratquellen (Futterreste, andere Reststoffe) im Hinblick auf Eignung und Wirtschaftlichkeit optimiert. Eine Reduktion von Salmonellen um mehr als fünf  $\log_{10}$ -Stufen (entsprechend einer erfolgreichen Desinfektion) konnte bei durchschnittlichen Temperaturen von 15°C innerhalb einer Woche nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass das untersuchte alternative Desinfektionsverfahren im Bereich niedriger Temperaturen (4 °C) nur eingeschränkt wirksam ist (Kältefehler). Eine Validierung der Inaktivierung von Viren im Feldmaßstab konnte aufgrund von labortechnischen Herausforderungen noch nicht eindeutig gezeigt werden.

## 2. Teil II Eingehende Darstellung

### 2.1 Projektverlauf

Im Folgenden sind die durchgeführten Arbeiten entsprechend der ursprünglichen Planung (s. Abb. 1), sowie erforderliche Abweichungen davon dargestellt.

Bei den ersten drei Arbeitspaketen handelte es sich um rein organisatorische Aufgaben.

Das Arbeitspaket vier galt zur Validierung der optimalen Substratzusammensetzung von Rinder-/ Schweinegülle mit entsprechenden Futtermitteln (Quetschgetreide/Heucops) unter Temperaturen von 10 °C und 21 °C. Dazu erfolgte eine quantitative und qualitative Erfassung verschiedener Parameter (aerobe/anaerobe Gesamtkeimzahl, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Clostridiaceae*, Schimmel- und Hefepilze sowie der sporulierenden Sulfidreduzierer; MALDI-TOF) und die Auswahl geeigneter standardisierter Indikatoren.

Das fünfte Arbeitspaket galt der Synchronisation der Arbeiten an beiden Standorten. Die Arbeitspakete sechs bis fünfzehn wurden in Hohenheim bearbeitet.

Zunächst wurde ein „Scale-Up“ in sog. IBC-Containern (1 m<sup>3</sup> Volumen) durchgeführt. Dazu wurden Keimträger genutzt und die Testorganismen mittels kultureller Methoden quantitativ erfasst. Weiterhin wurden die festgelegten Indikatoren im Verlauf bestimmt und auf ihre Praxistauglichkeit hin überprüft. Eine qualitative Bestimmung der Flora sollte mittels MALDI-TOF erfolgen. Da sich die, im ersten Projektjahr festgelegten Parameter als wenig praxistauglich erwiesen, wurde auf die weitere Untersuchung mittels MALDI-TOF verzichtet. Anschließend standen die Inaktivierungsversuche von *M. avium* ssp. *avium* und *Salmonella enterica* sssp. *enterica* Serovar Senftenberg mittels Diffusionskeimträger im Zeitplan.

Im dritten Projektjahr sollten die viralen Erreger inaktiviert werden. Hierzu sollten in Hohenheim sog. Surrogat-Viren eingesetzt werden. Die folgenden Arbeitspakete galten der Inaktivierung des aviären Influenzavirus (Subtyp H4N6, Surrogat für HPAI), des Modified-Vaccinia-Ankara Virus (MVAV, Surrogat für ASPV), des Bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVDV, Oregon C24V, Surrogat für ESPV) und des Equinen Rhinitis A Virus (ERAV, Surrogat für MKSV). Die Viren sollten analog zu den Bakterien in die Güllelager eingebracht und deren Tenazität im Verlauf beobachtet werden. Die Bestimmung des Virustiters sollte durch die Ermittlung des cytopathischen Effektes der untersuchten Viren auf der entsprechenden Zelllinie erfolgen.

Insgesamt sollte die Funktionalität der Methode im jahreszeitlichen Verlauf beobachtet werden. Die im ersten Jahr als geeignet identifizierten Indikatororganismen (gramnegative Bakterien, Laktobazillen) sollten hierfür im zeitlichen Verlauf quantifiziert werden.

Parallel wurden die entsprechenden Arbeitspakete am Standort Riems bearbeitet.

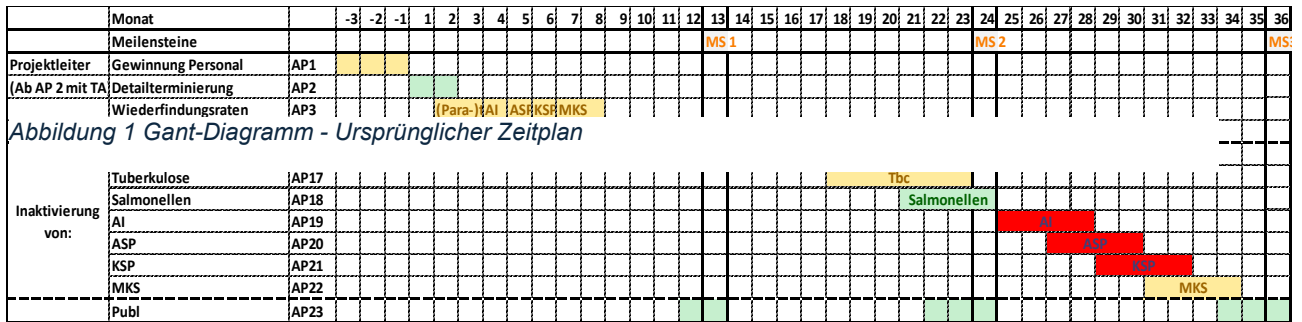
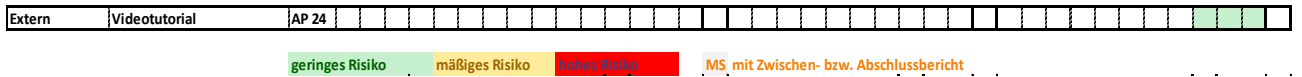
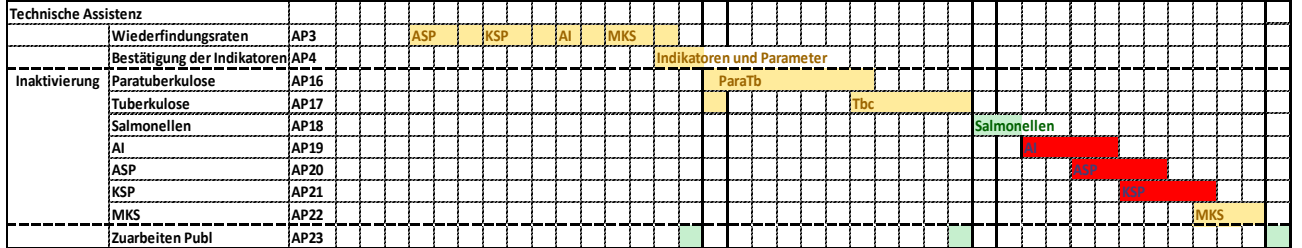
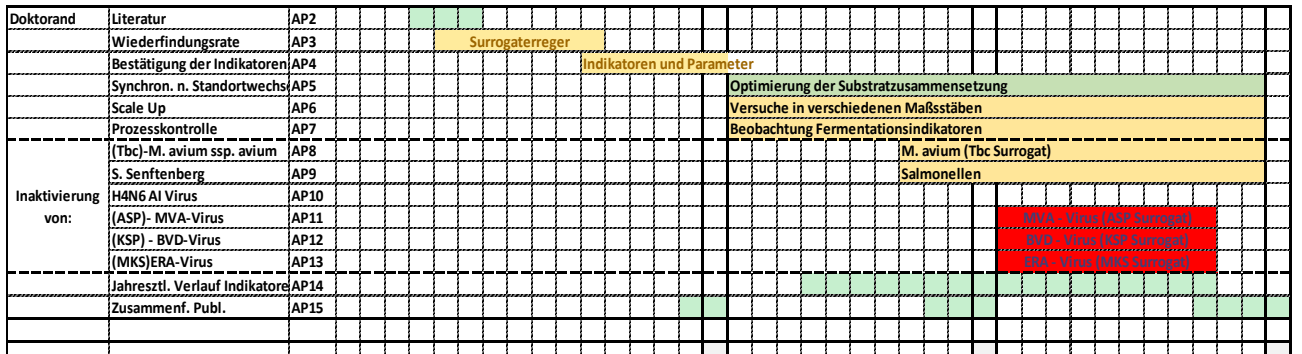
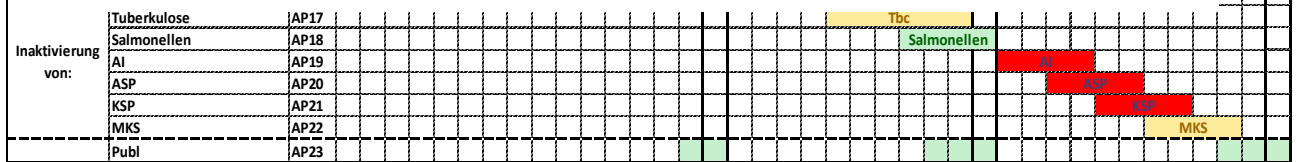


Abbildung 1 Gant-Diagramm - Ursprünglicher Zeitplan



geringes Risiko    mäßiges Risiko    hohes Risiko    MS mit Zwischen- bzw. Abschlussbericht

### 2.1.1 Meilenstein 1 – Standort Riems

Die Bearbeitung der Arbeitspakete zum Erreichen des ersten Meilensteins, erfolgten ausschließlich am Standort Riems. Auf diese wird in diesem Bericht nicht näher eingegangen.

### 2.1.2 Meilenstein 2 & 3 – Standort Hohenheim

An der Universität Hohenheim wurden die bereits im Labormaßstab durchgeführten Versuche im vergrößerten Maßstab („Up-Scaling“) umgesetzt. Die anstehenden Aufgaben wurden auf zwei weitere Meilensteine aufgeteilt. Zur Erreichung des zweiten Meilensteins wurden die Arbeitspakete 5 bis 9 bearbeitet. Um den dritten Meilenstein zu erreichen, wurden die Arbeitspakete 10 bis 15 und abschließend die standortübergreifenden Arbeitspakete 23 und 24 durchgeführt.

Die Arbeiten am Standort Hohenheim gliederten sich in drei unterschiedliche Schritte. Zunächst wurden die Ergebnisse der Etablierung der milchsauen Fermentation von

Rindergülle unter Verwendung von Quetschhafer basierend auf den am FLI durchgeführten Laboruntersuchungen auch an der Universität Hohenheim erfolgreich reproduziert (AP 5). Im nächsten Schritt wurden die technischen und laborspezifischen Grundlagen zur Etablierung der milchsäuren Fermentation im vergrößerten Feldmaßstab (IBC-Container mit 1 m<sup>3</sup> Volumen) geschaffen (AP 6 & AP 7). Zum Abschluss wurden die Inaktivierungsversuche unter annähernden Real-Maßstab-Bedingungen im jahreszeitlichen Verlauf bei wechselnden Temperaturen durchgeführt (AP 8 & AP 9).

Zuerst erfolgte die Etablierung der Versuche zum Ablauf der Fermentationsmethode. Im Anschluss lag der Versuchsschwerpunkt auf der Optimierung der für die Initiierung der milchsäuren Fermentation geeigneten Kohlenhydratquellen. Bei der Auswahl dieser Kohlenhydratquellen wurde v.a. auf die Verfügbarkeit, Eignung und auch Kosten für die Praxisanwendung geachtet. Weitere praxisnahe Testparameter waren verschiedene Einflussfaktoren wie die Belüftung, die Durchmischung der Substrate und die Temperaturabhängigkeit des Prozesses. Als Indikatoren für die erfolgreich, prozessaktivierte Fermentation wurden die bereits im ersten Meilenstein am Standort Riems festgelegten Parameter eingesetzt. Die signifikante Absenkung des pH-Wertes, eine fortlaufende Reduktion gramnegativer Bakterien und eine Vermehrung der säureproduzierenden Laktobazillen wurden als geeignet ermittelt und in den Up-Scaling-Untersuchungen ebenfalls verwendet

#### Meilenstein 2 Inaktivierung bakterieller Erreger mittels milchsaurer Fermentation

##### *Ergebnisse Arbeitspaket 5 (AP 5): Synchronisation nach Standortwechsel*

Im ersten Schritt wurden Versuche in verschiedenen Labormaßstäben durchgeführt. Hierfür wurde die zuvor im Rahmen der Laborarbeiten in Riems ermittelte Substratkonstellation Gülle mit 10 % Quetschhafer genutzt und die Übertragbarkeit des Prozesses durch wiederholende Versuche überprüft. Die Durchführung der Versuche erfolgte zur Verifizierbarkeit im Triplet. Simultan zu den Versuchsansätzen mit der genannten Substratvariation wurde generell ein Triplet aus reiner Gülle zur Kontrolle mitgeführt. Erste Versuche zur Methodenetablierung an der Uni Hohenheim wurden mittels 120 ml-Bechern durchgeführt. Hierzu wurden die luftdicht verschließbaren Becher mit dem Substrat gefüllt und im Verlauf von vier Wochen bei Raumtemperatur beprobt. Es wurde ein Triplet an Bechern verwendet, welches wöchentlich für die Beprobung geöffnet wurde und jeweils fünf weitere Triplets, welche bis zum jeweiligen Beprobungstag verschlossen blieben. Weiterhin wurden für beide Ansätze Triplets mit reiner Gülle zur Kontrolle beprobt. Die Probenahmen erfolgten wöchentlich an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21 und 28. Dabei wurde der pH-Wert bestimmt, um den laufenden Fermentationsprozess zu überprüfen. Dieser sollte rasch von einem Niveau von pH 8 auf Werte unter pH 5 fallen. Simultan wurde in diesen Versuchen überprüft, inwieweit Sauerstoff einen Einfluss auf die Fermentation hatte. So wurde der pH-Verlauf sowohl bei den, bis zur

jeweiligen Beprobung verschlossenen, als auch bei den wöchentlich geöffneten Bechern verglichen. Der Versuch zeigte einen im Verlauf stetig fallenden pH-Wert in den Versuchsansätzen. Nach 14 Tagen war dieser auf 5,5 gesunken. Hierbei konnte kein Unterschied im Verlauf des pH-Wertes zwischen den beiden Ansätzen (mit und ohne Sauerstoffzufuhr) nachgewiesen werden. Während so die Versuche im kleinen Maßstab (120 ml-Becher) synchronisiert werden konnten, kam es in den vergrößerten Labormaßstäben (mit 4 L Laborfermentern und 12 L Kanistern) nicht zur gewünschten pH-Wert-Absenkung und folglich nicht zu einem erfolgreichen Fermentationsablauf. Diese Ansätze waren simultan zu den Versuchen im Becher durchgeführt worden. Jedoch wurde hier neben der Kontrollgruppe mit reiner Gülle nur ein Versuchstriplet mit der oben genannten Substratzusammensetzung untersucht. Sowohl die Fermenter, als auch die Kanister boten die Möglichkeit der Probenahme ohne Sauerstoffzufuhr durch ein Ablassventil. Als Grund für die ausbleibende pH-Absenkung, wurden prägnante Sink- und Schwimmschichten, welche sich unter anderem durch die Zugabe des Quetschhafer gebildet hatten, ermittelt. Diese verhinderten eine verifizierende Beprobung der nicht homogenen Masse und führte zu unstimmigen Ergebnissen. Weiterhin zeigte sich die Beprobung der luftdicht verschlossenen Kanister durch das Ablaufventil als erschwerend, da es durch den Quetschhafer zu Verstopfungen kam. Für qualitativ stimmigere Ergebnisse wurden Versuche in diesen Maßstäben ausgesetzt. Um der Phasenbildung entgegenzuwirken und eine bessere und konstantere Durchmischung zu gewährleisten, wurde die Substratzusammensetzung angepasst. Versuche hierzu wurden zunächst wieder in den verschließbaren 120 ml-Bechern durchgeführt. Der Anteil des zugefügten Quetschhafer wurde versuchsweise reduziert und die schnellverfügbare Kohlenhydratquelle Zucker im 10 %-igen Anteil zugegeben. Durch diese Optimierung konnte eine signifikante pH-Wert Absenkung erreicht werden (s. Abb. 2).

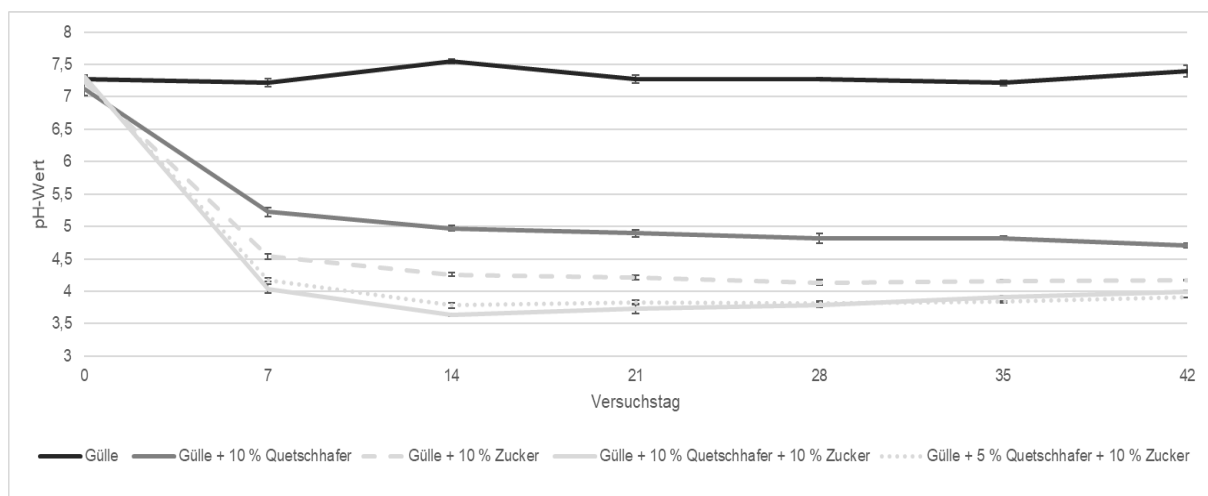


Abbildung 2 Verlauf des pH-Wertes mit verschiedenen Substratkonzentrationen im Labormaßstab

Die Methodik der Zellkultur und die in Riems genutzten Zelllinien wurden in Hohenheim übernommen. Weiterhin wurden die Viren in den Kulturen vermehrt und deren Titer bis hin zu einem Titer von  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ ml optimiert, um eine spätere Wiederfindung und eine entsprechende Reduktionsrate nach erfolgter Inaktivierung durch die Fermentationsprozesse gewährleisten zu können

Zudem wurden mehrere Protokolle zur Re-Isolierung des Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) erprobt. Dadurch konnte eine erfolgreiche Wiederfindung der Viren im Labormaßstab erreicht werden.

### Ergebnisse Arbeitspaket 6 (AP 6): Scale-Up

Anschließend an die standortbezogene Methodenetablierung und -optimierung im Labormaßstab erfolgte das „Scale-Up“. Hierzu wurden die Versuche mit der optimierten Substratzusammensetzung, also der Kombination von Gülle, Quetschhafer und Zucker (s. AP 5), in den vergrößerten Maßstab mit 1 m<sup>3</sup> IBC-Containern überführt. Es wurden drei IBC-Container mit zwei verschiedenen Substraten (Gülle mit 5 % Quetschhafer und 10 % Zucker sowie Gülle mit 2,5 % Quetschhafer und 10 % Zucker gefüllt. Als Kontrolle galt die Füllung mit reiner Gülle. Dazu wurden die beiden Konstellationen von sowie beprobt. Aus den Beprobungen dieses ersten Versuches konnte, simultan zu den Laborversuchen, eine erfolgreiche Ansäuerung der Substratzusammensetzung unter den, für die Inaktivierung erforderlichen pH-Wert von 5, bei durchschnittlichen Realtemperaturen von 7 °C, nach 10 Tagen nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich zwischen den Versuchsgruppen mit 5 % und 2,5 % Quetschhaferanteil kein signifikant unterschiedlicher Verlauf. Deshalb wurde der Ansatz der Gülle mit dem, auf ein Viertel reduzierten Anteil an Quetschhafer (Gülle mit 2,5 % Quetschhafer und 10 % Zucker) die weiteren Versuche festgelegt. (s. Abb. 3).

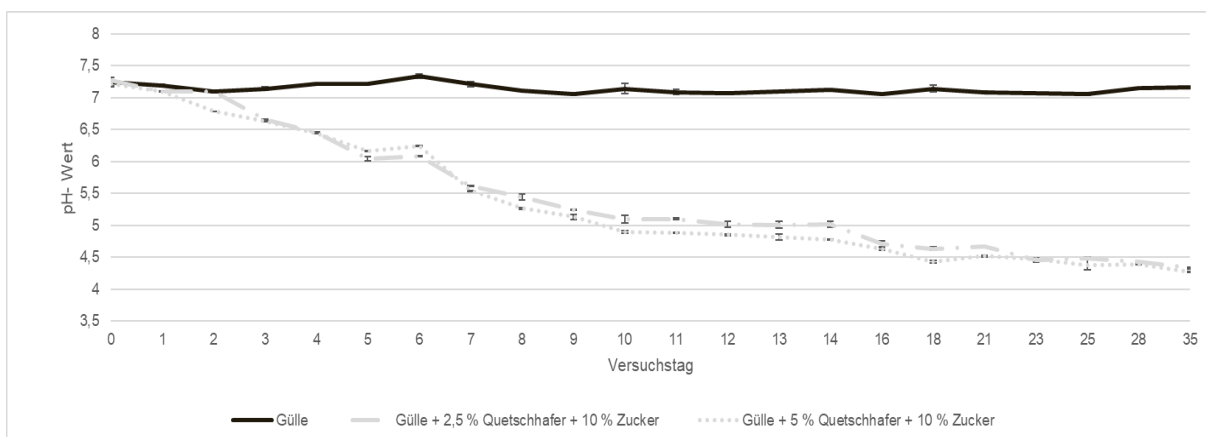


Abbildung 3 Verlauf des pH-Wertes in den IBC-Containern mit der optimierten Substratzusammensetzungen in den IBC Containern (durchschnittliche Temperaturen 7 °C)

### Ergebnisse Arbeitspaket 7 (AP 7): Prozesskontrolle

Letztendlich konnte durch die Zugabe des Zuckers und die Reduktion des Quetschhaferanteils eine rasche pH-Wertabsenkung, als Indikator für den Fermentationsablauf dokumentiert werden. Der pH-Wert konnte über drei Wochen auf einem niedrigen angesäuerten Niveau (unter pH 5) gehalten werden (s. Abb.3 & Abb. 4). Die Ursache dieser pH-Absenkung und damit der Beweis einer erfolgreich abgelaufenen milchsäuren Fermentation konnte durch die Analyse der für den Labormaßstab erarbeiteten Indikatoren (Anstieg der Laktobazillen, Verringerung der gramnegativen Bakterien und pH-Wert) kultur-bakteriologisch nachgewiesen werden.

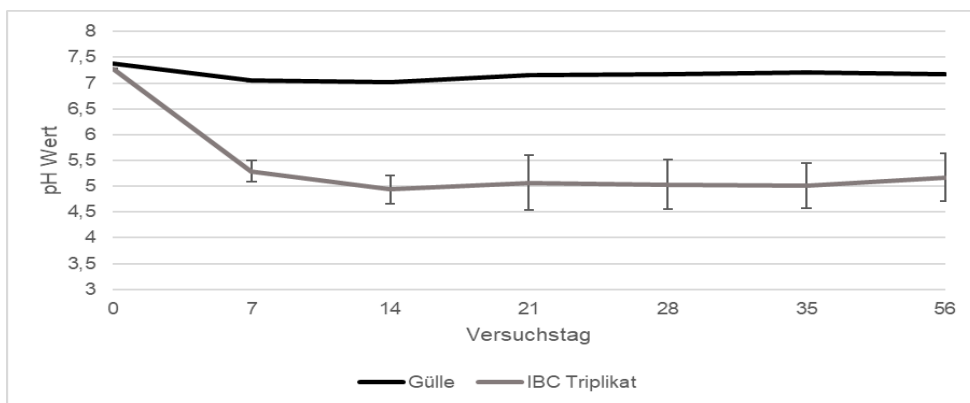


Abbildung 4 Verlauf des pH-Wertes in den IBC-Containern bei winterlichen Temperaturen (durchschnittl. 4 °C)

### Ergebnisse Arbeitspaket 8 (AP 8): Inaktivierung von *M. avium* ssp. *avium* (Diffusionskeimträger)

Für die Inaktivierungsversuche der Pathogene sollten Diffusionskeimträger eingesetzt werden. Diese sollten nach entworfenen Modellen mit Hilfe von 3D-Druck hergestellt werden. Aufgrund der zu geringen Präzession bei der Ausführung der 3D-Stanzungen, musste bei der Herstellung jedoch eine Alternative gesucht werden. Aus kommerziell erhältlichen, angepassten Polycarbonat-Sterilfiltrationsvorsätzen und Polycarbonat-Hülsen wurde durch die technische Abteilung der Uni Hohenheim, geeignete Keimträger hergestellt. Diese konnten für die weiteren Untersuchungen zur Inaktivierung von bakteriellen Pathogenen in der Gülle erfolgreich verwendet werden.

Die Arbeiten mit Mykobakterien waren aufgrund deren langsamen Wachstumsverhalten zeitlich aufwendiger anzulegen. Die Anzucht des *M. avium* ssp. *avium* zeigte sich erfolgreich. Weiterhin konnten Reisolationsversuche aus der Gülle durchgeführt werden.

## Ergebnisse Arbeitspaket 9 (AP 9): Inaktivierung von *Salmonella* Serovar Typhimurium Zoosaloral H

Erste Validierungsversuche zur Inaktivierung von Salmonellen verliefen im Labormaßstab. Anschließende Experimente im größeren Maßstab sollten mit der optimierten Substratzusammensetzung erfolgen. Aus Gründen der Praktikabilität im Rahmen der Identifizierung auf den eingesetzten Nährmedien wurde der ursprünglich eingeplante Bakterienstamm *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg durch den Impfstamm *Salmonella* Serovar Typhimurium Zoosaloral H ersetzt.

### Zusammenfassung Meilenstein 2

Im angestrebten Zeitraum sollten bakterielle Erreger mittels milchsaurer Fermentation im Güllesubstrat inaktiviert werden. Dies wurde im Labormaßstab, nach der ausführlichen Optimierung des Substrates ermöglicht. Für diese Anpassungen wurden in ausführlichen Versuchen verschiedene Substratkonstellationen erprobt, um hier die bestmöglichen Voraussetzungen für die Inaktivierung zu schaffen. Aufgrund des benötigten Zeitaufwandes und der weiterhin verbleibenden Aufgaben wurde für den Projektteil des Standorts Hohenheim ein Verlängerungsantrag bis 31.12.2024 gestellt und genehmigt.

### Meilenstein 3: Inaktivierung viraler Tierseuchenerreger durch milchsäure Fermentation

Im dritten Jahr erfolgten weitere Versuche mit bakteriellen Erregern, um die übrigen Ziele des zweiten Meilensteins zu erreichen. Neben einem Versuch unter sommerlichen Bedingungen wurde anschließend, im Rahmen der Projektverlängerung ein weiterer Versuch unter winterlichen Bedingungen im Feldmaßstab durchgeführt. Durch die Projektverlängerung konnte der Versuchsansatz mit 1 m<sup>3</sup> fassenden IBC-Containern durch einen organisatorisch aufwendigeren Ansatz in einem 65 m<sup>3</sup> fassenden Gülle-Feldrand-Container ergänzt werden (s. Ergebnisse Arbeitspaket 14).

Bei der ersten Durchführung wurde der bereits im Labormaßstab geprüfte Ansatz mit dem Testorganismus *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral H in den Feldmaßstab übertragen. Von der erstellten Bakteriensuspension mit 10<sup>8</sup> KBE/ ml wurden 20 ml in die, von der technischen Abteilung der Universität Hohenheim gefertigten Keimträger gegeben. Anschließend wurden diese in die IBC-Container eingebracht. Der Versuchsansatz beinhaltete die simultane Behandlung von drei Versuchscontainern, welche mit der erprobten Substratzusammensetzung (Gülle mit 2,5 % Quetschhafer und 10 % Zucker) befüllt wurden, sowie das Beprobieren eines weiteren Kontroll-Containers, welcher ausschließlich Gülle enthielt. Die mit den Bakterien versehenen Keimträger wurden für jeden Probetag im Triplet geführt und so in alle vier Container eingebracht. Eine Beprobung erfolgte im Verlauf von vier Versuchswochen einmal pro Woche an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21 und 28. Die Beprobung

beinhaltete die Entnahme des Keimträger-Triplets, sowie eine pH-Messung des Substratmilieus der IBC-Container. Der Keimträgerinhalt wurde anschließend quantitativ auf die verbleibende Koloniezahl an Salmonellen untersucht. Zusätzlich wurden die weiteren Testparameter pH-Wert und die quantitative Menge an Laktobazillen, sowie gramnegativer Bakterien zur Überprüfung des ablaufenden Fermentationsprozesses bestimmt. Die Durchschnittstemperatur betrug im Verlauf der vier Versuchswochen rund 18 °C. Bereits nach sieben Tagen konnten keine Salmonellen mehr aus den Keimträgern isoliert werden (s. Abb. 5).

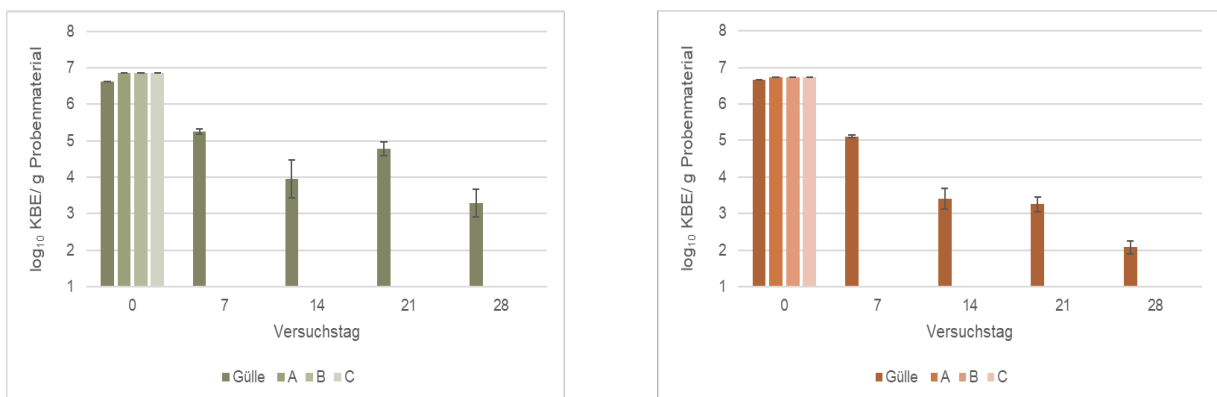


Abbildung 5 Nachweis der Gramnegativen Bakterien auf Gassner Agar (li) und der Salmonellen auf XLT-4 Agar (re) im Versuchsverlauf bei sommerlicher Witterung mit durchschnittlich 18 °C

Auch die Indikatorparameter bestätigten den rasch anlaufenden und konstant bestehenden Fermentationsprozess, welcher das Milieu im Substrat auf ein pH-Niveau zwischen pH 4 und 5 absenken und erhalten konnte (s. Abb. 6)

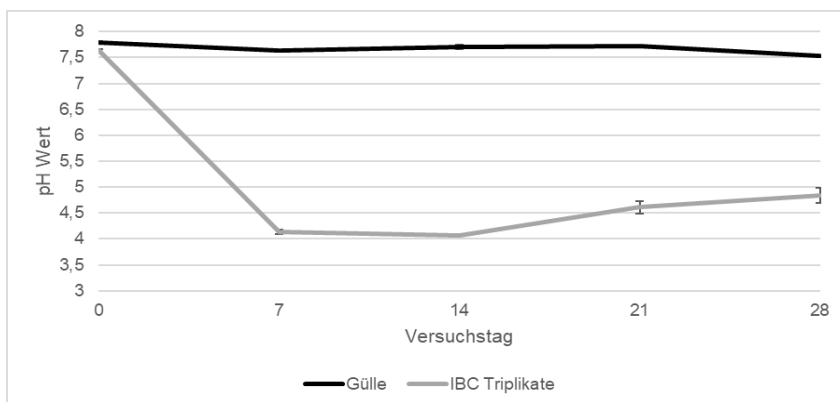


Abbildung 6 Verlauf des pH-Wertes in den IBC-Containern bei sommerlichen Temperaturen (durchschnittl. 18 °C)

Der zweite Durchgang zur Inaktivierung von Bakterien mit der Methode der milchsauernden Fermentation erfolgte erneut mit *Salmonella* Thypimurium Zoosaloral H ( $10^8$  KBE/ ml), und ergänzend mit *Mycobacterium avium* ssp. *avium* ( $10^7$  KBE/ ml). Zusätzlich zu den IBC-Containern, welche identisch zum vorgehenden Versuch geführt wurden, erfolgte die simultane Beprobung eines 65 m<sup>3</sup>-Feldrand-Container, welcher mit 50 m<sup>3</sup> derselben Substratzusammensetzung (Gülle mit 2,5 % Quetschhafer und 10 % Zucker) gefüllt und mit

Keimträger-Triplets versehen wurde. Neben der identisch zum vorhergehenden Versuch ablaufenden Beprobung wurde der Verlauf des pH-Wertes bis einschließlich Tag 56 und die quantitative bakterielle Bestimmung im Feldrandcontainer bis einschließlich Tag 35 analysiert. Dieser Versuchsansatz verlief unter winterlichen Bedingungen bei durchschnittlich rund 4 °C. Der erfolgreiche Fermentationsprozess aus dem sommerlichen Versuch konnte hier weder in den IBC-Containern noch im Feldrandcontainer bestätigt werden. So sank weder der pH-Wert unter das Niveau von 5, noch konnte eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion der inkubierten Bakterien erreicht werden. Die inkubierte Zahl der Mykobakterien reduzierte sich zwar im Verlauf, jedoch innerhalb von 35 Tagen nur um ein bis zwei log-Stufen. Außerdem war ebenso eine Reduktion der Bakterienzahl in der Kontrollgruppe, um nahezu eine log-Stufe zu vermerken. Bei den Salmonellen konnte im Verlauf der Probenahme kaum eine Veränderung der Zahl an Bakterien identifiziert werden. Zudem unterschied sich die Zahl an KBE/ g in den Keimträgern der Versuchsgruppe kaum von den Keimträgern, welche aus dem Kontroll-Container isoliert wurden. Zusammenfassend konnte in diesem Versuch nur ein sehr geringer, durch milchsäure Fermentation, reduzierender Effekt auf die Bakterienzahl nachgewiesen werden (s. Abb. 7 und Abb.8).

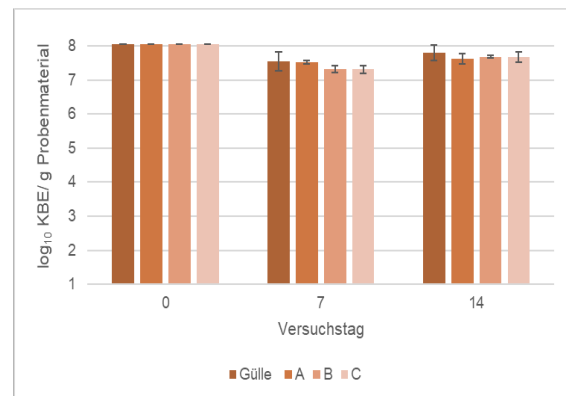
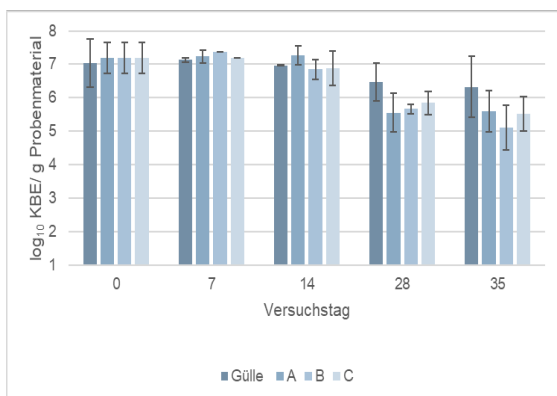


Abbildung 7 Nachweis von Mykobakterien auf Middlebrook 7H10 Agar (li) und Salmonellen auf XLT-4 Agar (re) im Versuchsverlauf bei winterlichen Klimabedingungen von rund 4 °C in den IBC-Containern

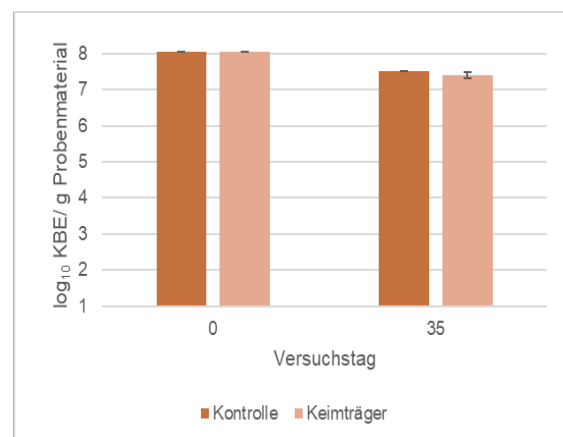
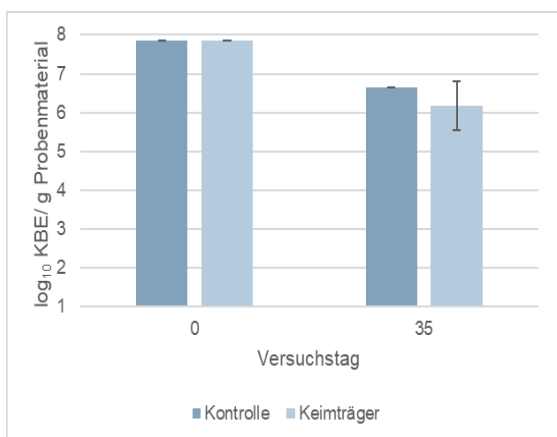


Abbildung 8 Nachweis von Mykobakterien auf Middlebrook 7H10 Agar (li) und Salmonellen auf XLT-4 Agar (re) im Versuchsverlauf bei winterlichen Klimabedingungen von rund 4 °C im Feldrandcontainer

### Zusammenfassung Ergebnisse Arbeitspakete 10 bis 13:

Arbeitspaket 10 (AP 10): Inaktivierung des Aviären Influenza Virus (Surrogat Subtyp H4N6)

Arbeitspaket 11 (AP 11): Inaktivierung des Modified-Vaccinia-Ankara Virus (MVAV)

Arbeitspaket 12 (AP 12): Inaktivierung des Bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVDV, Oregon C24V)

Arbeitspaket 13 (AP 13): Inaktivierung des Equinen Rhinitis A Virus (ERAV)

Für die Durchführung der Inaktivierungsversuche mit viralen Erregern erfolgten zunächst umfangreiche Voruntersuchungen. So wurden die für die einzelnen Viren geeignete Zelllinien getestet. Dabei war es wichtig die optimale Kombination und entsprechenden Virus zu finden, die es erlaubten, die Viren in ausreichenden Titern und damit ausreichenden Mengen für die weiteren Versuche zu vermehren. In nächsten Schritten wurden unterschiedlich Laboransätze zur Re-Isolierung der Viren aus der Matrix Gülle untersucht und optimiert.

Letzteres zeigte sich als komplexer und herausfordernder als ursprünglich geplant. Verschiedene, bereits als erfolgreich veröffentlichte Methoden zur Re-Isolierung wurden ausgetestet und weitere Methoden überprüft. Das Hauptproblem bestand darin, dass die zelltoxischen Inhaltsstoffe keine auswertbaren Ergebnisse bei der Wiederfindung auf den eingesetzten Zellkulturen erlaubten. Die Ergebnisse waren aufgrund dessen verfälscht und nicht verwertbar. Letztendlich fehlte hier eine geeignete Methode zur quantitativen Wiederfindung der Viren aus der Matrix Gülle.

Für die Versuchsdurchführung im Feldmaßstab sollten, wie bereits beschrieben, spezielle Keimträger (unterschiedlicher Aufbau zu den Keimträgern für Bakterien) eingesetzt werden. Diese dienen dazu, dass die Viren unter den Umgebungsbedingungen in den Prozess eingebracht werden können, ohne dass es zu einer Freisetzung der Viren und damit zu möglichen Gesundheitsrisiken durch Umweltwirkungen der Viren kommen kann. Weiterhin kann durch den Keimträgerinsatz auch die Problematik der Wiederfindung aus der Gülle umgangen werden, indem diese mit den Prüfviren nur in Pufferlösungen befüllt werden könnten, welche die pH-Bedingungen ebenso an die Umgebung anpassen, jedoch nicht durch zelltoxische Güllepartikel verschmutzt wurden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die milchsäure Fermentation der Gülle auch zu einer entsprechenden Absenkung des pH-Wertes in diesen Keimträgern führte. Die Verwendung der Keimträger zur Ausbringung der Viren in die IBC-Container und den Feldcontainer scheiterte jedoch final daran, dass die Anschaffung der entsprechend benötigten Filterpapiere in der passenden Porengröße und der benötigten Menge das gegebene Budget enorm überschritten hätten. Demnach fehlte eine realisierbare Möglichkeit, die Inaktivierung der Virusisolate ohne riskante Umweltwirkung im Feldmaßstab zu überprüfen.

Der Schwerpunkt der weiteren Arbeiten wurde damit auf die bakterielle Inaktivierung im Feldmaßstab gesetzt.

Ergebnisse Arbeitspaket 14 (AP 14): Verlaufsuntersuchungen (Jahreszeitlicher Verlauf während AP 8-13 durch Betrachtung Indikatoren)

Die Versuche im Feldmaßstab wurden sowohl unter sommerlichen und unter winterlichen Außenklimabedingungen durchgeführt. Insgesamt wurden drei Durchgänge mit den bereits in den einzelnen Arbeitspaketen 8 – 13 beschriebenen Substratzusammensetzungen durchgeführt. Diese wurden im Verlauf von der einfachen Kombination von Gülle mit 10 % Quetschhafer, über Gülle mit 10 % Quetschhafer und 10 % Zucker und Gülle mit 5 % Quetschhafer und 10 % Zucker auf die finale Konstellation aus Gülle mit 2,5 % Quetschhafer und 10 % Zucker optimiert. Ein Versuch fand unter sommerlichen Außenklimabedingungen bei durchschnittlich 18 °C statt, zwei weitere im Herbst und Frühjahr bei kälteren Temperaturen von durchschnittlich 4 °C bzw. 7 °C. Im Sommer konnte der Indikator pH-Wert innerhalb von sieben Versuchstagen auf das Niveau von pH 4 gebracht werden (s. Abb. 6). Dieses Niveau wurde bei den niedrigen Temperaturen im Verlauf nicht erreicht. Bei rund 7 °C (s. Abb. 3) konnte ab Tag zwölf eine Absenkung auf pH 5 beobachtet werden, welche anschließend konstant gehalten wurde. Dies traf bei 4 °C (s. Abb. 4) erst ab Tag 14 zu.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Fermentation bei höheren Temperaturen frühzeitiger, schneller und effektiver ablief als unter geringeren Temperaturen. Die bakteriellen Keimzahlen, welche als weitere Indikatoren für eine erfolgreiche Milchsäuregärung untersucht wurden, bestätigten die Ergebnisse der pH-Bestimmungen. So stieg in allen Untersuchungen die Anzahl der Laktobazillen an, während die Menge der gramnegativen Bakterien im Versuchsansatz absank. Bei den gramnegativen Bakterien war auffällig, dass diese bei höheren Temperaturen bereits bis zum 14. Versuchstag nicht mehr nachweisbar waren, während sie bei kühleren Temperaturen zwar ebenfalls reduziert waren, aber nie komplett unter die Nachweisgrenze abfielen.

Auch die Reduktionsraten der untersuchten bakteriellen Infektionserreger (*Mycobacterium avium* ssp. *avium*, *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral H) zeigten bei den unterschiedlichen Temperaturen unterschiedliche Ergebnisse. Bei dem im Sommer abgelaufenen Versuch konnten die beprobten Salmonellen bereits nach sieben Tagen unter die Nachweisgrenze reduziert werden. Dies bestätigte die erfolgreiche Inaktivierung der Salmonellen durch den Fermentationsprozess (s. Abb. 5).

Dasselbe war bei winterlichen Temperaturen sowohl in den 1 m<sup>3</sup> (s. Abb. 7) als auch im 65 m<sup>3</sup> Feldrandcontainer (s. Abb. 8) nicht möglich. Die Beobachtung des Fermentationsverlaufes mittels pH-Wert, und der Betrachtung der Indikatororganismen zeigte nur einen geringen

Effekt. Die Mykobakterien konnten innerhalb von 35 Versuchstagen durch die Fermentation um rund eine log-Stufe reduziert werden. Bei den Salmonellen konnte kein reduzierender Effekt nachgewiesen werden. Der Fermentationsprozess schien durch die geringen Temperaturen in seiner Effektivität gehemmt. Demnach war auch die Inaktivierung der untersuchten Salmonella- und Mykobakterien-Spezies um 4-5 log-Stufen im betrachteten Zeitraum nicht möglich.

Ergebnisse Arbeitspaket 15 und 23 (AP 15 & 23): Abschlussbericht und Publikationen, Poster, Vorträge

Der jeweils aktuelle Projektstand wurde im Jahr 2023 als Vortrag „Milchsaure Vergärung – eine Alternative bei der Desinfektion im Tierseuchenfall?“ auf der DVG-Tagung der Fachgruppe Tierhygiene in Kiel vorgestellt. Unter anderem erfolgte im Jahr 2024 die auf der EAAP-Tagung in Florenz die Ausstellung als Poster mit dem Titel „Lactic acid fermentation - an alternative for disinfection in case of an animal epidemic?“. Weiterhin ist derzeit der eine Publikation zur Inaktivierung der Salmonellen durch milchsaure Fermentation in Arbeit, welche mit dem Titel „Lactic acid fermentation inactivates Salmonella from contaminated cattle manure at moderate and low temperatures“ veröffentlicht werden soll. Eine weitere Publikation beschäftigt sich mit der methodischen Etablierung des Up-Scalings der milchsauren Fermentation („Practical use of lactic acid fermentation of manure to inactivate pathogens“).

Ergebnisse Arbeitspaket 24: Videodokumentation mit Tutorial

Durch eine erfolgreiche Etablierung der milchsauren Fermentation als Dekontaminationsverfahren, besteht die Möglichkeit zur Etablierung der Methode als Empfehlung zur Desinfektion im Tierseuchenfall. Die durch das Projekt gewonnen Erkenntnisse bringen neben gesundheitlichen Vorteilen vor allem wirtschaftliche Vorteile. Im Tierseuchenfall fallen sowohl kontaminierte Gülle als auch Futterreste an, die unter zeitlichem und ökonomischem Aufwand mit potenziell unerwünschten Nebeneffekten zu desinfizieren sind. Beide Kontaminanten können im Rahmen der milchsauren Fermentation kombiniert werden, um die milchsaure Fermentation zu aktivieren. Zur Optimierung des Prozesses kann eine weitere, für Laktobazillen schnell verfügbare Kohlenhydratquelle hinzugegeben werden. Zucker gilt als allgemein leicht zu beschaffendes Substrat, welches weiterhin schnell auf natürlichem Weg abbaubar ist. In der Zusammenstellung der beiden „Abfallprodukte“ und dem Zucker, findet sich eine angereicherte Umgebung für ein Laktobazillen-Wachstum wieder. Der durch die anaerob proliferierenden Laktobazillen ausgelöste Prozess der milchsauren Fermentation führt zu einem angesäuerten Milieu und damit zur Inaktivierung von Pathogenen. Folglich können chemische Desinfektionsmittel, welche im Tierseuchenfall schwer und kostenaufwendig in ausreichenden Mengen zu beschaffen sind und weiterhin ungewünschte Umweltauswirkungen mit sich bringen, eingespart werden. Außerdem kann die aktuell

verpflichtende Lagerungsdauer von mindestens drei Monaten durch die rasch ablaufende milchsäure Fermentation deutlich reduziert werden. Die Methode bringt folglich neben umweltschonenden Aspekten auch ökonomische Einsparungen mit sich.

Daneben hat dieses Desinfektionsverfahren auch das Potential für laufende Gülledesinfektionsmaßnahmen in großen Tierhaltungsbetrieben zum vorbeugenden Schutz der Verbraucher, der Tiere und der Umwelt. Das würde einen komplett neuen Ansatz im Sinne der prophylaktischen Seuchenbekämpfung darstellen.

Die geplante Videodokumentation ist derzeit in Bearbeitung. Dabei soll ein praktisch ansprechender Film mit gut verständlicher Beschreibung der Methode und deren Umsetzung entstehen. Speziell Landwirte sollen sich angesprochen fühlen und den ökonomischen Nutzen der Methode auffassen.

## 2.2 Angaben über die Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung

Der ursprünglich geplante 3D-Druck für die Keimträger wurde durch eine Anfertigung durch die technische Abteilung der Universität Hohenheim ersetzt (s. Abschnitt 2.1.2 AP 8).

Die eingeplanten Kosten für die Untersuchungen mittels MALDI-TOF konnten eingespart werden, da sich die im Labormaßstab definierten bakteriellen Indikatoren als nicht praxistauglich erwiesen.

Weiterhin wurde das Projekt am Standort Hohenheim kostenneutral bis 31.12.2024 verlängert. In dieser Zeit war es möglich zusätzliche Untersuchungen zum weiteren Up-Scaling der Methode durchzuführen. Dazu wurde ein ursprünglich nicht in der Planung und Kostenaufstellung berücksichtigter 65 m<sup>3</sup> Feldrandcontainer verwendet.

## 2.3 Liste der Publikationen

### 2.3.1 Konferenzteilnahmen

- T. Schilling, Hohenheim: Milchsäure Vergärung – eine Alternative bei der Desinfektion im Tierseuchenfall?, 6. Tagung der DVG-Fachgruppe Umwelt- und Tierhygiene, 05./06.10. 2023, Kiel
- I. Lehnert, T. Schilling, L. E. Hoelzle, Lactic acid fermentation - an alternative for disinfection in case of an animal epidemic?. Posterpräsentation, 75th EAAP Annual Meeting, 1/5 September 2024 – Florence, Italy

### 2.3.2 Veröffentlichungen

- Halm, H.; Woelke, S.; Lehnert, I.; Schilling, T.; Meissner, T.; Schröder, C.; Hoelzle, L.E.; Scheinemann, H.A. Lactic Acid Fermentation Inactivates Salmonella Typhimurium in Contaminated Cattle Manure at Moderate and Low Temperatures. Appl. Microbiol. 2025, 5, 88. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5030088>
- Lehnert, Ines, Hoelzle, L.E., Schilling T. „Practical use of lactic acid fermentation of manure to inactivate pathogens“ (in preparation)
- Videodokumentation „Gülle retten statt wegkippen“ zur Vermittlung der Milchsäuren Fermentation als Methode zur Gülledesinfektion (in Bearbeitung)