

Anhang 2 BioAbfV — (zu § 2 Nummer 2, § 3 Absatz 2 bis 7) Anforderungen an die hygienisierende Behandlung von Bioabfällen zur Gewährleistung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit

Bioabfallverordnung

Stand: 10.06.2019 (konsolidierte Textfassung, kein amtliches Inkrafttretensdatum)

Inhaltsverzeichnis

- 1 Allgemeine Anmerkungen
- 2 Hygienisierende Behandlung
 - 2.1 Behandlungsverfahren zur Hygienisierung (zu § 2 Nummer 2)
 - 2.2 Anforderungen an die hygienisierende Behandlung
 - 2.2.1 Pasteurisierung
 - 2.2.1.1 Anforderungen an die Prozessführung
 - 2.2.1.2 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5)
 - 2.2.1.3 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6)
 - 2.2.1.4 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a)
 - 2.2.2 Aerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Kompostierung)
 - 2.2.2.1 Anforderungen an die Prozessführung
 - 2.2.2.2 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5)
 - 2.2.2.3 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6)
 - 2.2.2.4 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a)
 - 2.2.3 Anaerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Vergärung)
 - 2.2.3.1 Anforderungen an die Prozessführung
 - 2.2.3.2 Ermittlung der Mindestverweilzeit
 - 2.2.3.3 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5)
 - 2.2.3.4 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6)
 - 2.2.3.5 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a)
 - 2.2.4 Anderweitige hygienisierende Behandlung
 - 2.2.4.1 Anforderungen an die Prozessführung
 - 2.2.4.2 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5)
 - 2.2.4.3 Prozessüberwachung (§ 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6)
 - 2.2.4.4 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a)
- 3 Prüfungen der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit
 - 3.1 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5)
 - 3.1.1 Allgemeine Anforderungen
 - 3.1.2 Anlagen zur aeroben hygienisierenden Behandlung (thermophile Kompostierungsanlagen)
 - 3.1.2.1 Mietenkompostierung
 - 3.1.2.2 Andere Kompostierungsverfahren
 - 3.1.3 Anlagen zur anaeroben hygienisierenden Behandlung (thermophile Vergärungsanlagen)
 - 3.2 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6)
 - 3.3 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a)
- 4 Methoden zur Prüfung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit
 - 4.1 Traceruntersuchungen zur Ermittlung der Mindestverweilzeit bei anaeroben hygienisierenden Behandlungsverfahren (thermophile Vergärung)
 - 4.1.1 Traceruntersuchung mit Sporen von *Bacillus globigii*
 - 4.1.1.1 Vorbereitung
 - 4.1.1.2 Durchführung der Untersuchung
 - 4.1.1.3 Nachweismethode
 - 4.1.1.4 Mindestverweilzeit
 - 4.1.2 Traceruntersuchung mit Lithium
 - 4.1.2.1 Vorbereitung
 - 4.1.2.2 Durchführung der Untersuchung
 - 4.1.2.3 Nachweismethode
 - 4.1.2.4 Mindestverweilzeit
 - 4.2 Prüfungen der Seuchenhygiene
 - 4.2.1 Prozessprüfung
 - 4.2.1.1 Testorganismus und Grenzwert
 - 4.2.1.2 Einlageproben für aerobe hygienisierende Verfahren (thermophile Kompostierung)

- 4.2.1.3 Einlageproben für anaerobe hygienisierende Verfahren (thermophile Vergärung)
- 4.2.1.4 Nachweismethode
- 4.2.2 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle
- 4.3 Prüfungen der Phytohygiene
- 4.3.1 Prozessprüfung
- 4.3.1.1 Testorganismen und Grenzwerte
- 4.3.1.2 Testorganismus *Plasmodiophora brassicae*
- 4.3.1.2.1 Herstellung der Einlageproben für aerobe hygienisierende Behandlungsverfahren (thermophile Kompostierung)
- 4.3.1.2.2 Herstellung der Einlageproben für anaerobe hygienisierende Behandlungsverfahren (thermophile Vergärung)
- 4.3.1.2.3 Nachweis der Infektiosität durch einen Biotest
- 4.3.1.3 Testorganismus Tomatensamen
- 4.3.1.3.1 Herstellung der Einlageprobe
- 4.3.1.3.2 Bestimmung der Keimrate durch einen Biotest
- 4.3.1.4 Testorganismus Tabakmosaikvirus bei aeroben hygienisierenden Behandlungsverfahren (thermophile Kompostierung)
- 4.3.1.4.1 Herstellung der Einlageproben
- 4.3.1.4.2 Nachweis der Infektiosität durch einen Biotest
- 4.3.2 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle

1 Allgemeine Anmerkungen In diesem Anhang sind die Anforderungen und die Vorgaben an die hygienisierende Behandlung (Anlagen und Verfahren) und Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle beschrieben. Werden Bioabfälle einer Behandlung zugeführt, die den Anforderungen an die Hygienisierung nicht entspricht (z. B. mesophile Vergärung), ist die hygienisierende Behandlung der Bioabfälle nach den Vorgaben dieses Anhangs zusätzlich durchzuführen. Die Anlage ist so zu führen und die Behandlung ist so durchzuführen, dass eine Rekontamination der hygienisierend behandelten Materialien vermieden wird.

2 Hygienisierende Behandlung

2.1 Behandlungsverfahren zur Hygienisierung (zu § 2 Nummer 2) Die hygienisierende Behandlung der Bioabfälle erfolgt durch

- a) Pasteurisierung (Nummer 2.2.1),
- b) aerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Kompostierung) (Nummer 2.2.2),
- c) anaerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Vergärung) (Nummer 2.2.3) oder
- d) anderweitige Hygienisierungsbehandlung (Nummer 2.2.4).

2.2 Anforderungen an die hygienisierende Behandlung

2.2.1 Pasteurisierung Die Pasteurisierung kann vor oder nach einer zusätzlichen, insbesondere biologisch stabilisierenden Behandlung (z. B. mesophile Vergärung) durchgeführt werden.

2.2.1.1 Anforderungen an die Prozessführung Vor der Pasteurisierung sind die Bioabfälle auf eine Teilchengröße mit einer Kantenlänge (zweidimensional) von jeweils maximal 12 mm zu zerkleinern. Das Material ist bei der Erhitzung zu homogenisieren und muss einen Wassergehalt aufweisen, der einen hinreichenden Wärmeübergang zwischen und innerhalb der Teilchen gewährleistet. Die Prozesssteuerung in Pasteurisierungsanlagen muss für die Hygienisierung der Bioabfälle so vorgenommen werden, dass eine Temperatur von mindestens 70 °C über einen zusammenhängenden Zeitraum von mindestens 1 Stunde auf das gesamte Material einwirkt.

2.2.1.2 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5) Für Pasteurisierungsanlagen ist keine Prozessprüfung gemäß Nummer 3.1 erforderlich; stattdessen sind Pasteurisierungsanlagen vor der Inbetriebnahme durch die zuständige Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, technisch abzunehmen (§ 3 Absatz 5 Satz 3). Die zuständige Behörde stellt eine Abnahmebescheinigung aus, wenn sie festgestellt hat, dass die Pasteurisierungsanlage die Anforderungen an die Prozessführung nach Nummer 2.2.1.1 erfüllt und mit den erforderlichen Einrichtungen und Geräten ausgestattet ist, insbesondere mit

- a) Geräten zur Überwachung der Temperatur,

- b) Geräten zur ständigen Aufzeichnung der Messergebnisse und
- c) einem angemessenen Sicherheitssystem zur Vermeidung einer unzulänglichen Erhitzung.

2.2.1.3 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6) Die Prozessüberwachung ist nach den Vorgaben der Nummer 3.2 durchzuführen.

2.2.1.4 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a) Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle sind nach den Vorgaben der Nummer 3.3 und den Methoden gemäß Nummer 4.2.2 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.2 (Phytohygiene) durchzuführen.

2.2.2 Aerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Kompostierung)

2.2.2.1 Anforderungen an die Prozessführung Die Prozesssteuerung in Kompostierungsanlagen muss für die Hygienisierung der Bioabfälle so vorgenommen werden, dass über mehrere Wochen ein thermophiler Temperaturbereich und eine hohe biologische Aktivität bei günstigen Feuchte- und Nährstoffverhältnissen sowie eine optimale Struktur und Luftführung gewährleistet sind. Der Wassergehalt soll mindestens 40 % betragen und der pH-Wert um 7 liegen. Im Verlauf der aeroben hygienisierenden Behandlung muss eine Temperatur von mindestens 55 °C über einen möglichst zusammenhängenden Zeitraum von 2 Wochen, von 60 °C über 6 Tage oder von 65 °C über 3 Tage auf das gesamte Rottematerial einwirken.

2.2.2.2 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5) Für Kompostierungsanlagen zur Hygienisierung ist die Prozessprüfung nach den Vorgaben der Nummer 3.1.1 und der Nummer 3.1.2 durchzuführen. Zur Verwendung von Testorganismen (Test- und Indikatorkeime) und zur Prüfung ihrer Abtötung oder Inaktivierung sind folgende Methoden anzuwenden:

- a) für die Seuchenhygiene die Methoden gemäß Nummer 4.2.1 (außer Nummer 4.2.1.3) und
- b) für die Phytohygiene die Methoden gemäß Nummer 4.3.1 (außer Nummer 4.3.1.2.2).

2.2.2.3 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6) Die Prozessüberwachung ist nach den Vorgaben der Nummer 3.2 durchzuführen.

2.2.2.4 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a) Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle sind nach den Vorgaben der Nummer 3.3 und den Methoden gemäß Nummer 4.2.2 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.2 (Phytohygiene) durchzuführen.

2.2.3 Anaerobe hygienisierende Behandlung (thermophile Vergärung)

2.2.3.1 Anforderungen an die Prozessführung Die Prozesssteuerung in Vergärungsanlagen muss für die Hygienisierung der Bioabfälle so vorgenommen werden, dass über den zusammenhängenden Zeitraum der Mindestverweilzeit die Behandlungstemperatur im thermophilen Bereich (mindestens 50 °C) auf das gesamte Material einwirkt. Hierbei dürfen die bei der bestandenen Prozessprüfung (s. Nummer 2.2.3.3) verwendete technisch vorgegebene oder nachgewiesene Mindestverweilzeit (s. Nummer 2.2.3.2) und die verwendete Behandlungstemperatur nicht unterschritten werden.

2.2.3.2 Ermittlung der Mindestverweilzeit Sofern die Mindestverweilzeit im Fermenter nicht technisch mittels einer hydraulischen Absperrung innerhalb der Beschickungs- und Entnahmeintervalle vorgegeben ist, muss sie durch eine Traceruntersuchung nach einer Methode gemäß Nummer 4.1 vor der Prozessprüfung (s. Nummer 2.2.3.3) nachgewiesen werden. Mit der Traceruntersuchung wird diejenige Zeitspanne an der Vergärungsanlage zur Hygienisierung ermittelt, die alle Substratteile (fest und flüssig) als kürzeste Aufenthaltszeit im Fermenter haben. Dabei wird das zu vergärende Substrat vor der Zugabe in den Fermenter mit Indikatoren (Tracer) markiert. Die Mindestverweilzeit des zu vergärenden Materials im Fermenter ist die Zeitspanne, die bis zur letzten Probe ohne Befund vor erstmaligem Nachweis des Tracers ermittelt wurde. Bis zum Vorliegen der Ergebnisse der Traceruntersuchung darf bei der Anlage die vom Anlagenhersteller und -planer berechnete

Mindestverweildauer nicht unterschritten werden. Damit die Mindestverweildauer nicht unterschritten wird, darf nach Erreichen des Sollfüllstandes in dem für die Hygienisierung relevanten Fermenter die vom Anlagenhersteller und -planer ermittelte maximale tägliche Inputmenge nicht dauerhaft überschritten werden. Liegt eine entsprechende Berechnung nicht vor, ist sie in Abstimmung mit der zuständigen Behörde zu erstellen, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen.

2.2.3.3 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5) Für Vergärungsanlagen zur Hygienisierung ist die Prozessprüfung nach den Vorgaben der Nummer 3.1.1 und der Nummer 3.1.3 durchzuführen. Bei der Prozessprüfung ist eine im thermophilen Temperaturbereich (mindestens 50 °C) erforderliche Behandlungstemperatur zu verwenden. Die Prozessprüfung ist mit der technisch vorgegebenen oder nachgewiesenen Mindestverweilzeit (s. Nummer 2.2.3.2) durchzuführen. Zur Verwendung von Testorganismen (Test- und Indikatorkeime) und zur Prüfung ihrer Abtötung oder Inaktivierung sind folgende Methoden anzuwenden:

- a) für die Seuchenhygiene die Methoden gemäß Nummer 4.2.1 (außer Nummer 4.2.1.2) sowie
- b) für die Phytohygiene die Methoden gemäß Nummer 4.3.1.1 (außer Testorganismus Tabakmosaikvirus gemäß Buchstabe c), Nummer 4.3.1.2 (außer Nummer 4.3.1.2.1) und Nummer 4.3.1.3.

Wird die Prozessprüfung nicht bestanden, ist sie mit einer höheren Behandlungstemperatur oder verlängerten Mindestverweilzeit zu wiederholen.

2.2.3.4 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6) Die Prozessüberwachung ist nach den Vorgaben der Nummer 3.2 durchzuführen.

2.2.3.5 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a) Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle sind nach den Vorgaben der Nummer 3.3 und den Methoden gemäß Nummer 4.2.2 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.2 (Phytohygiene) durchzuführen.

2.2.4 Anderweitige hygienisierende Behandlung Für ein anderweitiges hygienisierendes Behandlungsverfahren ist, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, die gleichwertige Wirksamkeit der Hygienisierung gemessen an den Anforderungen dieses Anhangs nachzuweisen (§ 3 Absatz 3 Satz 4).

2.2.4.1 Anforderungen an die Prozessführung Die Anforderungen an die Prozessführung zur hygienisierenden Behandlung der Bioabfälle sind in Abstimmung mit der zuständigen Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, so zu bestimmen und zu beschreiben, dass ein gleichwertiges Hygienisierungsniveau erreicht wird.

2.2.4.2 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5) Die Anforderungen an die Prozessprüfung sind in Abstimmung mit der zuständigen Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, so zu bestimmen und zu beschreiben, dass ein gleichwertiges Hygienisierungsniveau unter Berücksichtigung der Vorgaben der Nummer 3.1.1 sowie der Methoden gemäß Nummer 4.2.1 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.1 (Phytohygiene) erreicht wird.

2.2.4.3 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6) Die Anforderungen an die Prozessüberwachung sind in Abstimmung mit der zuständigen Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, so zu bestimmen und zu beschreiben, dass ein gleichwertiges Hygienisierungsniveau unter Berücksichtigung der Vorgaben der Nummer 3.2 erreicht wird.

2.2.4.4 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a) Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle sind nach den Vorgaben der Nummer 3.3 und den Methoden gemäß Nummer 4.2.2 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.2 (Phytohygiene) durchzuführen.

3 Prüfungen der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit Die hygienische Unbedenklichkeit der Bioabfälle wird festgestellt mit Hilfe der

- a) Prozessprüfung gemäß § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5 und nach Maßgabe der Beschreibungen in Nummer 3.1,
- b) Prozessüberwachung gemäß § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6 und nach Maßgabe der Beschreibungen in Nummer 3.2 und
- c) Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle gemäß § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a und nach Maßgabe der Beschreibungen in Nummer 3.3.

Die seuchen- und phytohygienischen Untersuchungen sind nach Möglichkeit gleichzeitig durchzuführen. Die behandelten Bioabfälle sind erst dann als hygienisch unbedenklich einzustufen, wenn alle Prüfungen gemäß den Nummern 3.1 bis 3.3 bestanden sind.

3.1 Prozessprüfung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 1 i. V. m. Absatz 5)

3.1.1 Allgemeine Anforderungen Die Prozessprüfung ist eine Untersuchung der einzelnen Behandlungsanlage zur Hygienisierung, die jeweils einmalig bei Neuerrichtung der Anlage und bei wesentlicher Änderung des Verfahrens durchzuführen ist. Hiermit wird die Wirksamkeit des Hygienisierungsverfahrens ermittelt. Dazu werden mit dem Bioabfall seuchen- und phytohygienisch relevante Test- oder Indikatororganismen in die Anlage eingebracht; anhand von Untersuchungen der behandelten Materialien wird dann überprüft, ob durch die Hygienisierung die Testorganismen abgetötet oder inaktiviert worden sind. Für eine anderweitige hygienisierende Behandlung (Nummer 2.2.4) sind die Anforderungen an die Prozessprüfung in Abstimmung mit der zuständigen Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, so zu bestimmen und zu beschreiben, dass ein gleichwertiges Hygienisierungsniveau unter Berücksichtigung der Vorgaben dieses Abschnitts sowie der Methoden gemäß Nummer 4.2.1 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.1 (Phytohygiene) erreicht wird. Für die Prozessprüfung sind die Methoden (Probenahme, -vorbereitung, Untersuchungen und einzuhaltende höchstzulässige Grenzwerte) in der Seuchenhygiene gemäß Nummer 4.2.1 und in der Phytohygiene gemäß Nummer 4.3.1 und nach Maßgabe der nachfolgend für die jeweilige Anlage näheren Beschreibungen (s. Nummer 3.1.2 und 3.1.3) anzuwenden (§ 3 Absatz 4 Satz 2). Die Prozessprüfung ist erfolgreich abgeschlossen, wenn die Grenzwerte gemäß Nummer 4.2.1.1 (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.1.1 (Phytohygiene) in den zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsgängen jeweils nach dem für die Hygienisierung relevanten Verfahrensschritt nicht überschritten werden.

3.1.2 Anlagen zur aeroben hygienisierenden Behandlung (thermophile Kompostierungsanlagen) Die Prozessprüfung umfasst zwei zeitlich getrennte Untersuchungsgänge in einem Mindestabstand von 3 Monaten, wovon einer im Winter stattzufinden hat. Die Testorganismen werden in charakteristische Rottebereiche oder in die für die thermische Inaktivierung der Testorganismen repräsentativen Prozessabschnitte eingebracht und nach der Entnahme auf überlebende oder infektiöse Testorganismen geprüft.

3.1.2.1 Mietenkompostierung Bei jedem Untersuchungsgang werden insgesamt 60 Einzelproben untersucht, wovon 24 Proben auf die Prüfung der Seuchenhygiene und 36 Proben auf die Prüfung der Phytohygiene entfallen. Die Anzahl der Einzelproben ergibt sich dabei wie folgt:

- a) Bei der Prüfung der Seuchenhygiene wird 1 Testorganismus (s. Nummer 4.2.1) in Doppelproben in drei verschiedene Rottezonen (Rand-, Kern- und Basis-Bereich) sowie an vier verschiedenen Stellen der Miete eingebracht.
- b) Bei der Prüfung der Phytohygiene werden 3 Testorganismen (s. Nummer 4.3.1) als Einzelproben in drei verschiedene Rottezonen (Rand-, Kern- und Basis-Bereich) sowie an vier verschiedenen Stellen der Miete eingebracht.

Die Proben am Rand dürfen mit ca. 10 cm Rottegut überdeckt werden. Die Proben bleiben bis zum Ende der Prüfung in den jeweiligen Bereichen. Für kleine Anlagen mit einer jährlichen Kapazität von bis zu 3 000 Tonnen Einsatzmaterialien ist nur ein reduzierter Untersuchungsumfang mit einer Halbierung der zu untersuchenden Einzelproben erforderlich. Dabei werden die Testorganismen nur

an zwei verschiedenen Stellen der Miete eingebracht.

3.1.2.2 Andere Kompostierungsverfahren Bei jedem Untersuchungsgang werden insgesamt 60 Einzelproben untersucht, wovon 24 Proben auf die Prüfung der Seuchenhygiene (1 Testorganismus, s. Nummer 4.2.1) und 36 Proben auf die Prüfung der Phytohygiene (3 Testorganismen, s. Nummer 4.3.1) entfallen. Die Testorganismen werden in charakteristische Bereiche des Rottekörpers eingelegt oder bei dynamischen Verfahren in geeigneten Probebehältern mit dem Materialstrom durch den praxisüblichen Rotte- und Verfahrensprozess geschleust. Die eingesetzten Probenbehälter müssen eine ausreichende Perforation aufweisen, so dass die Stoffumsetzungsbedingungen innerhalb der Probenbehälter denen des zu prüfenden Kompostierungsprozesses zur Hygienisierung entsprechen. Bei dynamischen Verfahren ist darauf zu achten, dass alle Prüforganismen während des gesamten Einbringvorgangs zeitlich möglichst gleichmäßig zugegeben werden, so dass sie sich möglichst homogen im Rotteaggregat verteilen. Zusätzlich muss die Form der verwendeten Probenbehälter sicherstellen, dass sie bezüglich des Verhaltens im Materialstrom und der Verweilzeit dem zu kompostierenden Material entsprechen. Sofern die spezifische Anlagentechnik die Größe der Probenbehälter nicht begrenzt (z. B. freie Durchgänge bei Schnecken usw.), werden insgesamt 12 Probenbehälter in das Rotteaggregat eingebracht (durchgeschleust); jeder Probenbehälter enthält

- a) einen Testorganismus in Doppelproben zur Prüfung der Seuchenhygiene (s. Nummer 4.2.1) und
- b) drei Testorganismen als Einzelproben zur Prüfung der Phytohygiene (s. Nummer 4.3.1).

Ist die Einbringung (Durchschleusung) entsprechend großer Probenbehälter nicht möglich, müssen die Einzelproben auf eine entsprechend größere Anzahl kleinerer Probenbehälter verteilt werden. Für kleine Anlagen mit einer jährlichen Kapazität von bis zu 3 000 Tonnen Einsatzmaterialien ist nur ein reduzierter Untersuchungsumfang mit einer Halbierung der zu untersuchenden Einzelproben erforderlich. Dabei werden statt der 12 nur 6 Probenbehälter eingebracht und durchgeschleust.

3.1.3 Anlagen zur anaeroben hygienisierenden Behandlung (thermophile Vergärungsanlagen) Die Prozessprüfung umfasst zwei zeitlich getrennte Untersuchungsgänge in einem Mindestabstand von 3 Monaten. Bei jedem Untersuchungsgang werden insgesamt 24 Einzelproben untersucht, wovon 8 Proben auf die Prüfung der Seuchenhygiene und 16 Proben auf die Prüfung der Phytohygiene entfallen. Die Anzahl der Einzelproben ergibt sich dabei wie folgt:

- a) Bei der Prüfung der Seuchenhygiene wird 1 Testorganismus (s. Nummer 4.2.1) in Doppelproben sowie an vier verschiedenen Stellen im Fermenter (bei stehenden Fermentern in vertikaler und bei liegenden Fermentern in horizontaler Richtung) eingebracht.
- b) Bei der Prüfung der Phytohygiene werden 2 Testorganismen (s. Nummer 4.3.1 mit Ausnahme des Tabakmosaikvirus) in Doppelproben sowie an vier verschiedenen Stellen im Fermenter (bei stehenden Fermentern in vertikaler und bei liegenden Fermentern in horizontaler Richtung) eingebracht.

Für kleine Anlagen mit einer jährlichen Kapazität von bis zu 3 000 Tonnen Einsatzmaterialien ist nur ein reduzierter Untersuchungsumfang mit einer Halbierung der zu untersuchenden Einzelproben erforderlich. Dabei werden die Testorganismen nur an zwei verschiedenen Stellen im Fermenter eingebracht. Die Testorganismen werden für die technisch vorgegebene oder nachgewiesene Mindestverweilzeit (s. Nummer 2.2.3.2) in den Fermenter eingebracht und nach Entnahme untersucht. Für die Durchführung der Prozessprüfung müssen für die Einlage und Entnahme von Proben geeignete Öffnungen in den Gärbehältern vorhanden sein.

3.2 Prozessüberwachung (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 2 i. V. m. Absatz 6) Die

Prozessüberwachung ist eine kontinuierliche Prüfung und Aufzeichnung der Temperatur während der Behandlung zur Hygienisierung. Hiermit wird nachgewiesen, ob während der Behandlung die für die Hygienisierung erforderliche Temperatur und die notwendige Einwirkungsdauer eingehalten wird. Für eine anderweitige hygienisierende Behandlung (Nummer 2.2.4) sind die Anforderungen an die Prozessüberwachung in Abstimmung mit der zuständigen Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines

Sachverständigen, so zu bestimmen und zu beschreiben, dass ein gleichwertiges Hygienisierungsniveau unter Berücksichtigung der Vorgaben dieses Abschnitts erreicht wird. Wird in einer geschlossenen Kompostierungsanlage zur Hygienisierung die Temperatur im Abluftstrom der Kompostmiete gemessen und aufgezeichnet (§ 3 Absatz 6 Satz 3), ist die Behandlungstemperatur über einen anlagenspezifischen Korrekturfaktor gegenüber der direkten Temperaturmessung im Rottegut zu ermitteln. Der anlagenspezifische Korrekturfaktor ist regelmäßig durch parallele direkte Temperaturmessungen im Rottegut zu überprüfen. Für die Temperaturmessung im Abluftstrom sind die Anforderungen in Abstimmung mit der zuständigen Behörde, ggf. unter Hinzuziehung eines Sachverständigen, festzulegen. Die Temperaturmessungen sind in repräsentativen Zonen der für die Hygienisierung relevanten Prozessabschnitte oder Anlagenteile vorzunehmen. Die Prozessüberwachung ist erfolgreich durchlaufen, wenn die für das jeweilige Verfahren vorgegebene Temperatur und Einwirkungsdauer (vgl. Nummer 2.2.1.1, 2.2.2.1, 2.2.3.1 und 2.2.4.1) bei der hygienisierenden Behandlung des Materials eingehalten wurden.

3.3 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle (zu § 3 Absatz 4 Satz 1 Nummer 3 i. V. m. Absatz 7 und 7a) Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle sind regelmäßige Untersuchungen der Materialien nach der Behandlung zur Hygienisierung auf Krankheitserreger, keimfähige Samen und austriebsfähige Pflanzenteile. Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle erfolgen nach der Hygienisierungsbehandlung (s. Nummer 2) am abgabefertigen Material. Bei jeder Prüfung der hygienisierten Bioabfälle ist jeweils eine Probe in der Seuchenhygiene und in der Phytohygiene zu untersuchen. Für die Prüfungen sind die Methoden (Probenahme, -vorbereitung, Untersuchungen und einzuhaltende höchstzulässige Grenzwerte) in der Seuchenhygiene gemäß Nummer 4.2.2 und in der Phytohygiene gemäß Nummer 4.3.2 anzuwenden (§ 3 Absatz 4 Satz 2). Die Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle sind erfolgreich abgeschlossen, wenn die Grenzwerte gemäß Nummer 4.2.2 letzter Absatz (Seuchenhygiene) und Nummer 4.3.2 letzter Absatz (Phytohygiene) in keiner der entnommenen Proben überschritten werden.

4 Methoden zur Prüfung der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit

4.1 Traceruntersuchungen zur Ermittlung der Mindestverweilzeit bei anaeroben hygienisierenden Behandlungsverfahren (thermophile Vergärung) Um die hygienisierende Wirkungsweise von anaeroben Behandlungsverfahren beurteilen zu können, ist die Kenntnis der Mindestverweilzeit der Abfallsuspension im Fermenter von Bedeutung. Muss die Mindestverweilzeit ermittelt werden, ist hierfür eine Traceruntersuchung durchzuführen (s. Nummer 2.2.3.2). Bei der Traceruntersuchung wird die Abfallsuspension vor dem Eintritt in den Fermenter mit Indikatoren (Tracern) markiert und deren erstmaliges Auftreten am Auslauf erfasst. Für die Traceruntersuchung in anaeroben Behandlungsanlagen zur Hygienisierung biologisch abbaubarer Abfälle sind biologische Tracer mit den Sporen von *Bacillus globigii* (s. Nummer 4.1.1) oder chemische Tracer mit Lithium (s. Nummer 4.1.2) geeignet.

4.1.1 Traceruntersuchung mit Sporen von *Bacillus globigii* Als biologischer Tracer werden die Sporen von *Bacillus globigii* verwendet. Sporen dieses Testbakteriums kommen natürlicherweise nicht in den biologischen Substraten vor, sie sind apathogen für Mensch und Tier, überstehen die Prozesseinwirkungen in anaeroben Behandlungsanlagen und sind problemlos nachweisbar.

4.1.1.1 Vorbereitung Benötigte Materialien und Reagenzien

- Trypton-Glucose-Bouillon (TGB), zur Herstellung der Impfkultur von *Bacillus globigii*-Sporen: Hefeextrakt: 2,5 g, Trypton: 5,0 g, Glucose: 1,0 g, Wasser (destilliert): 1 000 ml;
- Hefeextrakt-Agar (MYA), zur Herstellung von *Bacillus globigii*-Sporen: Pepton aus Fleisch: 10,0 g, Hefeextrakt: 2,0 g, Mangansulfat-Monohydrat: 0,04 g, Agar: 15 g, Wasser (destilliert): 1 000 ml;
- *Bacillus globigii* Stammkultur, zur Herstellung der *Bacillus globigii* Stammkulturen-Sporensuspension: *Bacillus globigii* (DSM[1] No. 675 [Bac. *Atrophaeus*]) oder *Bacillus globigii* (DSM1) No. 2277 [Bac. *Atrophaeus*]) oder *Bacillus globigii* (Stammsammlung der

Universität Hohenheim[2]);

– Zentrifuge mit einer Beschleunigung von 10 000 g.

Probenherstellung Trypton-Glucose-Bouillon (TGB): Die Bouillon wird in Portionen von je 10 oder 100 ml in Prüfröhrchen gegeben. Es wird im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums 7,2 ($\pm 0,2$), gemessen bei 20 °C, betragen. **Hefeextrakt-Agar (MYA):** Der Agar wird in Roux-Flaschen oder Petrischalen gegeben. Es wird im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums 7,0 ($\pm 0,2$), gemessen bei 20 °C, betragen. **Bacillus globigii Stammkulturen:** Die Bacillus globigii-Stammkulturen (Glycerinkultur, Lagerungstemperatur –80 °C) werden aufgetaut und in Trypton-Glucose-Bouillon (TGB) bei 37 °C über 24 Stunden bebrütet. Aus der TGB-Bouillon werden 6 ml auf MYA-Platten übertragen; der Überstand wird abpipettiert. Die MYA-Platten werden bei 37 (± 1) °C bebrütet. Nach dem dritten Bebrütungstag wird der Zustand der Kulturen mit Hilfe einer Sporenfärbung (z. B. Racket-Färbung) beurteilt. Anschließend erfolgt eine weitere Inkubation der MYA-Platten bei 30 °C über 7 bis 10 Tage. Danach werden die Kolonien von den MYA-Platten mit 3 ml sterilem destillierten Wasser (aqua dest.) abgeschwemmt. Die gewonnene Sporensuspension wird zentrifugiert (3 000 Umdrehungen/min über 10 Minuten), der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit aqua dest. resuspendiert. Zur Ermittlung der Anzahl der Sporen wird die Suspension zuerst bei 75 (± 1) °C über 10 Minuten erhitzt, anschließend wird mit dem Koch'schen Oberflächenverfahren die Sporenzahl pro Milliliter Suspension festgestellt.

4.1.1.2 Durchführung der Untersuchung Der biologische Tracer wird einmalig in Form einer Sporensuspension gleichmäßig während eines Beschickungsintervalls dem Fermenter zugegeben. Es wird einer Beschickungscharge soviel Sporensuspension beigemischt, dass pro Gramm Fermenterinhalt mindestens 10⁶ Sporen vorhanden sind. Die Konzentration der Bacillus globigii-Sporen in der Suspension ist zu kontrollieren. Nach der Zuführung der Sporensuspension erfolgt die Probenahme (Einzelprobe von ca. 1 kg) im Austrag so lange, bis der Tracer erstmals in einer Probe nachgewiesen wird, und zwar mindestens

- a) jede Stunde bis einschließlich der 24. Stunde,
- b) darauf folgend alle zwei Stunden bis einschließlich der 36. Stunde,
- c) darauf folgend alle 4 Stunden bis einschließlich der 48. Stunde,
- d) darauf folgend alle 6 Stunden.

4.1.1.3 Nachweismethode Aus den zu untersuchenden Proben werden zur Vorverdünnung 20 g in 180 ml Natriumchlorid (0,9 %-ige Kochsalzlösung) eingewogen und ca. 20 Stunden bei 4 °C auf dem Schüttler durchmischt. Nach einer ausreichenden Durchmischung wird je 1 ml der Probe in geometrischer Reihe bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁸ in jeweils 9 ml NaCl-Lösung pipettiert. Anschließend werden jeweils 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe auf zwei parallele Standard-I-Agarplatten pipettiert und mit einem ausgeglühten Drahtspatel gleichmäßig verteilt (Inkubation 37 °C/24 Stunden). Ausgezählt werden auf den Nährbodenplatten nur jene Kolonien, die ein typisches orange-rotes Wachstum zeigen.

4.1.1.4 Mindestverweilzeit Die Mindestverweilzeit ergibt sich aus dem Zeitraum zwischen der Zugabe der Bacillus globigii-Sporensuspension und der letzten Probe ohne Befund vor dem erstmaligen Nachweis des biologischen Tracers im Austrag des Fermenters.

4.1.2 Traceruntersuchung mit Lithium

4.1.2.1 Vorbereitung Bestimmung der Lithium-Grundbelastung in der Abfallsuspension Zunächst ist die natürliche Lithium-Grundbelastung in der Abfallsuspension zu bestimmen. Hierzu wird vor Prüfungsbeginn mindestens 5 Tage lang täglich eine repräsentative Probe am Austrag des Fermenters entnommen und der Lithiumgehalt bestimmt. Je nach Bioabfallzusammensetzung beträgt die Grundbelastung an Lithium in der Regel zwischen 1 und 5 mg je kg Trockenmasse. Benötigte Materialien Tracer: Lithiumhydroxid-Monohydrat

4.1.2.2 Durchführung der Untersuchung Für die Untersuchung ist die Lithiumkonzentration von 50 mg/kg Trockenmasse bezogen auf den gesamten Fermenterinhalt (vollständige Durchmischung) einzustellen. Die erforderliche Lithiummenge ist abhängig vom Fermenternutzvolumen der zu überprüfenden Vergärungsanlage zur Hygienisierung. Der Tracer wird in gelöster Form während eines Beschickungsintervalls gleichmäßig dem Fermenter zugegeben. Von dieser Lithiumsuspension ist eine Rückstellprobe bis zum Vorliegen der Ergebnisse aufzubewahren. Nach der Zuführung des Tracers erfolgt die Probenahme (Einzelprobe von ca. 1 kg) im Austrag so lange, bis der Tracer erstmals in einer Probe nachgewiesen wird (Lithiumkonzentration > Grundbelastung), und zwar mindestens

- a) jede Stunde bis einschließlich der 24. Stunde,
- b) darauf folgend alle 2 Stunden bis einschließlich der 36. Stunde,
- c) darauf folgend alle 4 Stunden bis einschließlich der 48. Stunde,
- d) darauf folgend alle 6 Stunden.

4.1.2.3 Nachweismethode Zur Ermittlung der Lithiumkonzentration werden die Proben nach DIN EN ISO 11885:2009[3] analysiert.

4.1.2.4 Mindestverweilzeit Die Mindestverweilzeit ergibt sich aus dem Zeitraum zwischen der Zugabe des Lithiumtracers und der letzten Probe ohne Konzentrationserhöhung vor dem erstmaligen Nachweis des Tracers im Austrag des Fermenters. Der Tracer ist nachgewiesen, wenn die festgestellte Konzentration von Lithium die ermittelte Grundbelastung um die doppelte Standardabweichung übersteigt, die bei den gemäß Nummer 4.1.2.1 entnommenen Proben ermittelt wird.

4.2 Prüfungen der Seuchenhygiene

4.2.1 Prozessprüfung

4.2.1.1 Testorganismus und Grenzwert Die Prozessprüfung in der Seuchenhygiene wird mit dem Testkeim *Salmonella senftenberg* W775 (H₂S-negativ) durchgeführt. Die Prozessprüfung ist in der Seuchenhygiene erfolgreich abgeschlossen, wenn in den zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsgängen jeweils nach dem für die Hygienisierung relevanten Verfahrensschritt in keiner Probe *Salmonellen* nachweisbar sind.

4.2.1.2 Einlageproben für aerobe hygienisierende Verfahren (thermophile Kompostierung) Der Testkeim *Salmonella senftenberg* W775 (H₂S-negativ) wird in Standard-I-Bouillon bei 37 °C über 18 bis 24 Stunden inkubiert. Die so erzeugte Keimsuspension soll eine Mikroorganismenkonzentration von mindestens 10⁷ bis 10⁸ KBE/ml enthalten. Die Konzentration ist durch Vergleich mit einem Standard (z. B. McFarland) oder dem Oberflächenverfahren oder MPN-Verfahren (Most Probable Number) zu bestimmen. Bei der Kompostierung zur Hygienisierung wird pro Probe ca. 225 g frisches, homogenisiertes und zerkleinertes Bioabfallmaterial aus der zu überprüfenden Anlage mit 25 ml dieser Keimsuspension getränkt und anschließend in sterile Zwiebel- oder Kunststoffsäckchen verpackt. Die Einlage der Proben in das Kompostiergut erfolgt entweder in dieser Form oder in grob perforierten stabilen Probenbehältern, die für den jeweiligen Prozess geeignet sind. Nachdem der für die Hygienisierung relevante Verfahrensabschnitt durchlaufen ist, werden die Probenbehälter wieder entnommen und jeweils 50 g des homogenisierten Inhalts eines Probensäckchens in 450 ml gepuffertem Peptonwasser mit Novobiocin über 30 Minuten bei 4 °C langsam ausgeschüttelt (150 rpm) und anschließend über 22 (± 2) Stunden bei 36 (± 2) °C inkubiert. Die so erhaltene Suspensionslösung wird für die Identifizierung von *Salmonellen* benutzt.

4.2.1.3 Einlageproben für anaerobe hygienisierende Verfahren (thermophile Vergärung) Die Keimsuspension mit dem Testkeim *Salmonella senftenberg* W775 (H₂S-negativ) wird hergestellt wie in Nummer 4.2.1.2 Absatz 1 beschrieben. In Vergärungsanlagen zur Hygienisierung wird jeweils 1 ml der Keimsuspension von *Salmonella senftenberg* W775 (H₂S-negativ) mit Diffusionskeimträgern[4] in den Prozess eingeschleust. Die Diffusionskeimträger werden außer mit 1 ml der Keimsuspension auch mit 9 ml Gärrückstand angefüllt und in die für die thermische Inaktivierung relevanten

Prozessabschnitte oder Anlageteile jeweils für die ermittelte Mindestverweilzeit (s. Nummer 4.1) und Hygienisierungstemperatur eingebracht. Nachdem das Verfahren durchlaufen ist, wird der jeweilige Gesamtinhalt der Diffusionskeimträger (10 ml) in 90 ml gepuffertes Peptonwasser mit Novobiocin (Voranreicherung) gegeben, kurz geschüttelt (150 rpm) und über 22 ($\pm$ 2) Stunden bei 36 ($\pm$ 2) °C inkubiert. Die so erhaltene Suspensionslösung wird für die Identifizierung von Salmonellen benutzt.

4.2.1.4 Nachweismethode Vorhandene Salmonellen werden mit den Suspensionslösungen identifiziert, die nach den oben beschriebenen Methoden hergestellt worden sind (s. Nummer 4.2.1.2 und 4.2.1.3). Hierzu werden jeweils 0,1 ml aus der gut durchmischten Voranreicherung in 10 ml Anreicherungsbouillon nach Rappaport bei 36 ($\pm$ 2) °C und bei 42 ($\pm$ 1) °C über 22 ($\pm$ 2) Stunden inkubiert. Anschließend werden Parallelausstriche auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) und einem weiteren Salmonella-Differenzial-Nährboden mit der Nachweismöglichkeit anderer biochemischer Eigenschaften als XLD-Agar angelegt. Salmonellenverdächtige Kolonien werden auf Nutrient-Agar überimpft und bei 36 ($\pm$ 2) °C für 22 ($\pm$ 2) Stunden inkubiert. Die Identifizierung erfolgt biochemisch oder serologisch auf Grund der Körper- und Geißelantigene (O- und H-Antigene). Zur Kontrolle der Überlebensfähigkeit (Tenazität) des Teststammes werden parallel zur Prozessprüfung vier Kontrollproben hergestellt. Diese Kontrollproben werden nicht in das Hygienisierungsverfahren eingebracht, sondern während des Prüfungszeitraums in feuchtem Sand (z. B. Eimer mit Quarzsand, Befeuchtung mit deionisiertem Wasser) bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) gelagert und nach Abbruch der Prozessprüfung aufgearbeitet. Mindestens drei der vier Kontrollproben sollen positive Salmonellenbefunde liefern; anderenfalls ist die Tenazität des Teststammes nicht als ausreichend anzusehen.

4.2.2 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle Für die Prüfung der hygienisierten Bioabfälle in der Seuchenhygiene werden aus einer gut durchmischten Sammelprobe (ca. 3 kg) jeweils 50 g Material nach der oben angegebenen Methode (s. Nummer 4.2.1.2) auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. Die Sammelmischprobe setzt sich aus mindestens fünf verschiedenen Teilproben einer Charge des hygienisierend behandelten, gemäß Nummer 3.3 zu untersuchenden Materials zusammen. Die Prüfung der hygienisierten Bioabfälle ist in der Seuchenhygiene erfolgreich abgeschlossen, wenn in jeweils 50 g der entnommenen Sammelproben keine Salmonellen nachweisbar sind.

4.3 Prüfungen der Phytohygiene

4.3.1 Prozessprüfung

4.3.1.1 Testorganismen und Grenzwerte Aus der Vielzahl von Phytopathogenen und Pflanzensamen, die im Ausgangsmaterial von Bioabfallbehandlungsanlagen vorkommen, werden folgende Leit- oder Indikatororganismen in Prozessprüfungen in der Phytohygiene verwendet:

- a) Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie) mit einer einwöchigen Wärmetoleranz von 50 °C, Grenzwert im Biotest: Befallsindex $\leq$ 0,5 je Prüfbereich,
- b) Tomatensamen, Grenzwert im Biotest: $\leq$ 2 % keimfähige Samen je Prüfbereich,
- c) zusätzlich bei aerober hygienisierender Behandlung (thermophile Kompostierung) gemäß Nummer 2.2.2: Tabakmosaikvirus (TMV), Grenzwert im Biotest: $\leq$ 4 % Restinfektiosität (Relativwert zur Positivkontrolle) je Prüfbereich.

Die Prozessprüfung ist in der Phytohygiene erfolgreich abgeschlossen, wenn in den zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsgängen jeweils nach dem für die Hygienisierung relevanten Verfahrensschritt in den Proben je Prüfbereich die angegebenen Grenzwerte

- bei den Parametern Plasmodiophora brassicae und Tomatensamen nicht überschritten sowie
- bei dem Parameter Tabakmosaikvirus um nicht mehr als maximal 30 % überschritten werden.

4.3.1.2 Testorganismus Plasmodiophora brassicae Die Prozessprüfung in der Phytohygiene mit dem Testorganismus Plasmodiophora brassicae wird nach folgender beschriebener Methodik durchgeführt.

4.3.1.2.1 Herstellung der Einlageproben für aerobe hygienisierende Behandlungsverfahren (thermophile Kompostierung) Das Gallenmaterial (Infektionsmaterial mit dem Erreger *Plasmodiophora brassicae*) wird bis zur Herstellung der Einlageproben bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Es ist nachweislich infektiöses, wärmetolerantes Gallenmaterial mit dem Erreger *Plasmodiophora brassicae* von befallenen Kohlpflanzen zu verwenden. Die Wärmetoleranz ist nachgewiesen, wenn das Gallenmaterial bei Bebrütung von $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 7 Tage eine hohe Infektiosität (Befallsgrad ? 2) aufweist. Jede in den Kompostierungsprozess zur Hygienisierung eingesetzte Probe enthält 30 g Gallenmaterial, 430 g Boden und 200 g des jeweiligen Kompostrohmaterials. Dies entspricht einem Verhältnis von ca. 5 % Gallenmaterial zu 65 % Boden und 30 % Kompost. Die einzelnen Probenanteile werden intensiv gemischt und in rottebeständige Beutel (Maschenweite max. $1 \times 1\text{ mm}$) eingefüllt; dabei ist sicherzustellen, dass nichts von der Probe in den umgebenden Kompost ausgetragen wird. Entsprechend hergestellte Kontrollproben werden während des Versuchszeitraums in feuchtem, sterilisiertem Sand bei Zimmertemperatur gelagert.

4.3.1.2.2 Herstellung der Einlageproben für anaerobe hygienisierende Behandlungsverfahren (thermophile Vergärung) Für das zu verwendende Gallenmaterial (Infektionsmaterial mit dem Erreger *Plasmodiophora brassicae*) gilt Nummer 4.3.1.2.1 Absatz 1 entsprechend. Bei Vergärungsanlagen zur Hygienisierung werden 30 g Gallenmaterial in Gazebeutel (Maschenweite max. $1 \times 1\text{ mm}$) in die für die thermische Inaktivierung relevanten Prozessabschnitte oder Anlageteile eingebracht. Entsprechend hergestellte Kontrollproben werden während des Versuchszeitraums in feuchtem, sterilisiertem Sand bei Zimmertemperatur gelagert.

4.3.1.2.3 Nachweis der Infektiosität durch einen Biotest Eine vorhandene Restinfektion von *Plasmodiophora brassicae* in den Einlageproben wird durch die nachfolgend beschriebene Prüfung festgestellt. Benötigte Materialien

- Mischwanne,
- Messbecher (1 000 ml),
- Kunststofftöpfe (13 x 13 x 13 cm, ca. 1 l), passende Untersetzer,
- zertifiziertes Saatgut von Sarepta-Senf (*Brassica juncea*),
- Substratdämpfer,
- Sand, Körnung 0,8 – 1,2 mm (z. B. Buntsandstein mit guter Pufferkapazität, pH-Wert ca. 6,5),
- Weißtorf (pH-Wert ca. 3,5),
- pH-Meter,
- Einmalhandschuhe (für jede Probe ein Paar),
- wasserlöslicher Volldünger (fest oder flüssig).

Probenaufbereitung Nach Rückgewinnung aus dem geprüften Hygienisierungsverfahren werden die Einlageproben mit dem Erreger *Plasmodiophora brassicae* sorgfältig zerkleinert und mit einem Sand-Torfgemisch (5 Stunden bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gedämpft) auf ein Volumen von 1 000 ml aufgefüllt und gut homogenisiert. Da der pH-Wert einen starken Einfluss auf die Infektiosität von *Plasmodiophora brassicae* ausübt (Optimum: pH-Wert $6,0 \pm 0,2$), ist der pH-Wert der hergestellten Substratmischung zu überprüfen und gegebenenfalls durch Erhöhung des Torfanteils zu korrigieren. Biotest Als Versuchsgefäße werden 13 x 13 x 13 cm große Kunststofftöpfe verwendet. Für jede reisolierte Erregerprobe, die mit dem Sand-Torf-Gemisch auf je 1 000 ml aufgefüllt wurde, wird ein Gefäß mit 16 Nachweispflanzen Sarepta-Senf (*Brassica juncea*) angelegt; dabei werden in jedes Gefäß vorgezogene Keimpflanzen (1. Laubblattbildung) einpikiert. Der Biotest wird als randomisierter Versuch im Gewächshaus oder in einer Klimakammer bei 6 000 bis 9 000 Lux und einer Temperatur von mindestens $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgestellt. Die Pflanzen werden ab der dritten Woche wöchentlich einmal gedüngt. Die Vegetationszeit des Biotests bis zur Bonitur der Nachweispflanzen beträgt 4 bis 5 Wochen. Nach Beendigung des Biotests wird zum einen die Anzahl der befallenen Pflanzen gezählt

und zum anderen die Wurzelgallenbildung nach einer Boniturskala von 0 bis 3 bewertet:

Befallsklasse Beschreibung der Symptome

- 0 Keine sichtbaren Symptome
- 1 Leichte Gallenbildung an Haupt- und Nebenwurzeln
- 2 Mittlere Gallenbildung an Haupt- und Nebenwurzeln
- 3 Starke Gallenbildung am gesamten Wurzelsystem

Bewertung der Boniturnoten Für jede einzelne Erregerprobe (Wiederholung) werden die Boniturnoten für den Befall der Einzelpflanzen (Befallsklasse = Kl) nach folgender Formel im Befallsindex zusammengefasst:

[Abbildung]

Der Befallsindex für einen Prüfbereich ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel des Befallsindex aller Wiederholungen (Erregerproben) des jeweiligen Prüfbereichs:

[Abbildung]

Ist der Befallsindex je Prüfbereich $\geq 0,5$, so ist die Prüfung bestanden.

4.3.1.3 Testorganismus Tomatensamen Die Prozessprüfung in der Phytohygiene mit dem Testorganismus Tomatensamen wird nach folgender beschriebener Methodik durchgeführt. Für die Herstellung der Einlageprobe und die Bestimmung der Keimrate durch einen Biotest werden folgende Materialien benötigt:

- Kunststoff-Petrischalen mit Deckel ($\varnothing$ 9 cm),
- Rundfilterpapier,
- Tomatensaatgut (*Lycopersicon lycopersicum* [L.] Karsten ex Farw.), Sorte Saint-Pierre (Synonym: San Pedro).

4.3.1.3.1 Herstellung der Einlageprobe Etwa 1 g oder 400 Tomatensamen (*Lycopersicon lycopersicum* [L.] Karsten ex Farw.) der Sorte Saint-Pierre (Synonym: San Pedro) werden in einen kleinen Beutel aus unverrottbarem Gazestoff (Maschenweite 1 x 1 mm) gefüllt und vor dem Verschließen auf der gesamten Gazefläche verteilt, um eine möglichst geringe Schichtdicke der Tomatensamen zu erreichen. Die Keimfähigkeit der Tomatensamen muss vor den Untersuchungen bestimmt werden. Zur Prüfung darf nur Saatgut mit einer Mindestkeimfähigkeit von 90 % verwendet werden.

4.3.1.3.2 Bestimmung der Keimrate durch einen Biotest Nach Beendigung der Untersuchung wird der Testorganismus aus den Einlageproben entnommen und umgehend einer Keimfähigkeitsprüfung unterzogen. **Biotest** Die Tomatensamen werden aus der Einlageprobe entnommen und 200 Samen werden abgezählt. Die restlichen Samen werden 1 bis 2 Tage unter Wohnraumbedingungen (20 bis 50 % rel. Luftfeuchte, etwa 20 °C) zurückgetrocknet, luftdicht verschlossen und für etwaige Wiederholungen der Keimfähigkeitsbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt (Rückhalteprobe). Die abgezählten Samen werden in sauberem Zustand, falls erforderlich abgewaschen, zur Keimfähigkeitsbestimmung ausgelegt, z. B. 4 x 50 Samen auf 4 Lagen angefeuchtetem Filterpapier in abgedeckten Petrischalen mit 9 cm Durchmesser bei 25 °C und Belichtung in einem geeigneten Raum oder Klimaschrank. [7] Alle sieben Tage werden die gekeimten Tomatensamen so lange ausgezählt, bis keine weiteren Samen keimen. Als gekeimt gilt der Samen, bei dem die Wurzel oder der Spross sichtbar ausgetreten ist. Sind nach 21 Tagen keine Samen gekeimt, wird die Keimfähigkeitsprüfung abgeschlossen. **Bewertung der Ergebnisse** Die Gesamtzahl gekeimter Samen wird festgestellt und als Prozentsatz der verwendeten Samen in der geprüften Aliquote (200 Samen) angegeben. Die Keimfähigkeit der Tomatensamen für einen Prüfbereich ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel der Keimfähigkeitsraten aller Wiederholungen (Erregerproben) des Prüfbereichs.

4.3.1.4 Testorganismus Tabakmosaikvirus bei aeroben hygienisierenden Behandlungsverfahren (thermophile Kompostierung) Die Prozessprüfung in der Phytohygiene mit dem Testorganismus Tabakmosaikvirus wird nach folgender dargestellter Methode durchgeführt. Für die Herstellung der Einlageproben und den Nachweis durch einen Biotest werden folgende Materialien und Reagenzien

benötigt:

- Kunststofföpfe mit einem Volumen von 500 ml mit Bodenlochung und Unterschalen,
- wasserlösliche Mehrnährstoffdünger,
- Tabaksaatgut (*Nicotiana tabacum* „Samsun“),
- Tabaksaatgut (*Nicotiana glutinosa* L.),
- Einheitserde 0 (EE0) als Pflanzsubstrat,
- Mörser und Pistill,
- Karborund-Bentonit-Gemisch (Verhältnis 1:1),
- Phosphatpuffer nach Sörensen (pH-Wert 7) oder ein entsprechendes handelsübliches Produkt,
- TMV-haltige Suspension (Pflanzenpresssaft aus TMV-infizierten Tabakpflanzen),
- Filtriergaze,
- handelsübliche Wattestäbchen,
- verschließbare Glas- oder Kunststoffgefäße,
- Aufbewahrungsgefäße und Feuchteschalen.

4.3.1.4.1 Herstellung der EinlageprobenDie Vermehrung des Virus erfolgt in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* „Samsun“), in denen es sich systemisch ausbreitet. Dazu werden die Tabakpflanzen bei 18 bis 22 °C unter Gewächshausbedingungen bis zum 5-Blattstadium herangezogen. Zur Inokulation werden 2 oder 3 untere Blätter mit einem Gemisch aus Karborund und Bentonit (1:1) dünn eingepudert und die TMV-haltige Suspension (Pflanzenpresssaft aus TMV-infizierten Tabakpflanzen) in 0,05 mol/l Phosphatpuffer nach Sörensen oder entsprechend (pH-Wert 7) auf die bestäubten Blätter aufgetragen. 2 bis 3 Wochen nach der Inokulation können dann virushaltige Blätter mit mosaikartigen Verfärbungen für die Untersuchungen verwendet werden. Jede in den Kompostierungsprozess zur Hygienisierung eingeschleuste Probe enthält 10 g TMV-infizierte Tabakblätter (*Nicotiana tabacum* „Samsun“), die in ein rottebeständiges Gazesäckchen (Maschenweite 1 x 1 mm) gefüllt werden. Damit die Rottebedingungen auf die TMV-infizierten Tabakblätter einwirken können, ist das Gazesäckchen der Einlageprobe vollständig mit Kompostrohmaterial zu umgeben. Es sind Positivkontrollen aus 10 g mit TMV-infizierten Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* „Samsun“) derselben Charge herzustellen, die bei –18 °C aufbewahrt werden.

4.3.1.4.2 Nachweis der Infektiosität durch einen BiotestDie Inaktivierung der durch den Hygienisierungsprozess der thermophilen Kompostierung geleiteten Erregerproben wird durch einen Biotest nach folgender beschriebener Methode untersucht. **Probenaufarbeitung**Nach Beendigung des hygienisierenden Verfahrensschritts (z. B. Entnahme nach Beendigung der Prozessprüfung auf einer thermophilen Kompostierungsanlage) wird die TMV-Erregerprobe von eventuell vorhandenen nicht verrotteten groben Bestandteilen befreit. Unter Zusatz von 30 ml Phosphatpuffer nach Sörensen oder entsprechend (0,05 mol/l; pH-Wert 7) wird die Probe in einem Mörser zerkleinert. Die Probensuspension wird auf die Filtriergaze gegeben und ausgepresst. Der Probenextrakt wird in ein verschließbares Glas- oder Kunststoffgefäß überführt. Mit den mitgeführten Positiv-Kontrollproben wird in gleicher Weise verfahren. **Biotest**Als Nachweis für die Infektion werden die Extrakte aus den Proben und aus den Kontrollen auf Blätter der Testpflanze (*Nicotiana glutinosa* L.) aufgetragen. Der Biotest wird an Nachweispflanzen durchgeführt, die sich im 6 – 8-Blattstadium befinden. Für die Inokulation der 12 reisolierten TMV-Erregerproben werden insgesamt 12 Nachweispflanzen benötigt, wobei je Prüfbereich vier Proben an vier Pflanzen getestet werden. An den Nachweispflanzen werden die Vegetationsspitze und die unteren älteren Blätter entfernt, so dass jeweils vier voll ausgebildete Blätter für die Inokulation an den Pflanzen verbleiben. Für die bessere Vergleichbarkeit bei Lokalläsionen an Pflanzen mit Blättern unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Alters ist das lateinische Quadrat als Versuchsanordnung zu wählen. Voraussetzung hierfür ist die gleiche Anzahl an TMV-Proben, Testpflanzen und Blättern. Bei der Prozessprüfung werden die drei

charakteristischen Prüfbereiche des Rottekörpers in jeweils vierfacher Wiederholung überprüft. Das folgende Schema verdeutlicht die Versuchsanordnung der Halbblatthälfte unter Einbeziehung der Positiv-Kontrollprobe (P) für die vier zu prüfenden TMV-Proben (A, B, C, D) eines Prüfbereichs:

Pflanze 1 Pflanze 2 Pflanze 3 Pflanze 4
 Blatt-position Blatthälfte(aus RichtungBlattspitze) Blatthälfte(aus RichtungBlattspitze)
 Blatthälfte(aus RichtungBlattspitze) Blatthälfte(aus RichtungBlattspitze)
 links rechts links rechts links rechts links rechts
 1. Blatt A P P D C P P B
 2. Blatt B P P A D P P C
 3. Blatt C P P B A P P D
 4. Blatt D P P C B P P A

Die Blätter können im Hinblick auf die durchzuführenden Behandlungen auf der Blattunterseite mit einem wasserfesten Filzstift gekennzeichnet werden. Zuerst wird immer die Untersuchungsprobe aufgetragen und anschließend die Kontrollprobe. Dann werden die Blätter der Nachweispflanzen mit einem Gemisch aus Karborund und Bentonit (1:1) dünn eingepudert. Die Proben- und Kontrollextrakte werden mit einem Wattestäbchen auf die Blätter aufgetragen, wobei die bestäubten Blatthälften mit dem Extrakt zweimal gleichmäßig mit leichtem Druck und mit Handbewegungen, die von der Mittelader zum Blattrand verlaufen, bestrichen werden. Dabei wird das Blatt mit einer Hand von der Blattunterseite her unterstützt. Sofort nach der Behandlung werden die Tabakblätter direkt am Spross abgeschnitten und die anhaftenden Karborund-/Bentonit-Reste von der Blattoberfläche mit Leitungswasser vollständig entfernt (Sprühflasche oder Brause). Für die Inkubation werden die behandelten Blätter entweder in ein mit Wasser gefülltes Gefäß gestellt oder in entsprechende Feuchteschalen gelegt. Im Anschluss werden die behandelten Blätter bis zur Symptomausbildung in eine Klimakammer oder ein klimatisiertes Gewächshaus bei 22 bis 25 °C gestellt. Während des Inkubationszeitraums werden die behandelten Blätter täglich für 16 Stunden beleuchtet (Belichtungsstärke mindestens 2 000 Lux). Spätestens 5 Tage nach der Inokulation sind die Infektionsherde in Form von nekrotischen Lokalläsionen deutlich zu erkennen. Hierbei handelt es sich um kleine runde Flecken von 2 bis 3 mm Durchmesser, deren Zentren aus abgestorbenem Gewebe bestehen. Bewertung der Ergebnisse Für die Bewertung werden die gebildeten Läsionen einer jeden Blatthälfte getrennt ausgezählt. Die Auswertung erfolgt durch Addition der Läsionen der jeweiligen vier Blatthälften, die jeweils mit der Proben- und Kontrolllösung inokuliert worden sind. Die Restinfektiosität der Erregerproben wird prozentual in Relation zur Positiv-Kontrolle ausgedrückt. Für jede einzelne Erregerprobe (Wiederholung) wird die relative Restinfektion auf vier inokulierten Tabakblättern nach folgender Formel zusammengefasst:

[Abbildung]

B1 = inokuliertes Blatt der ersten Pflanze B2 = inokuliertes Blatt der zweiten Pflanze B3 = inokuliertes Blatt der dritten Pflanze B4 = inokuliertes Blatt der vierten Pflanze LE = Läsionszahl der Erregerprobe
 LK = Läsionszahl der Positiv-Kontrollprobe Die Restinfektion [Relativwert] des Erregers
 Tabakmosaikvirus für einen Prüfbereich ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel der relativen Restinfektionen aller Wiederholungen (Erregerproben) des jeweiligen Prüfbereichs:

[Abbildung]

Ist die Restinfektion [Relativwert] je Prüfbereich $\geq 4\%$, so ist die Prüfung bestanden.

4.3.2 Prüfungen der hygienisierten Bioabfälle Bei der Prüfung der hygienisierten Bioabfälle in der Phytohygiene wird der Gehalt an keimfähigen Samen und austriebsfähigen Pflanzenteilen im hygienisierend behandelten Material mit der Kultivierungsmethode bestimmt. Die Prüfung wird mit Material aus einer gut durchmischten Sammelprobe (ca. 3 kg) durchgeführt. Die Sammelmischprobe setzt sich aus mindestens fünf verschiedenen Teilproben einer Charge des hygienisierend behandelten, gemäß Nummer 3.3 zu untersuchenden Materials zusammen. Probenvorbehandlung Das Volumengewicht und der Salzgehalt des Prüfsubstrats sind zu bestimmen. Bei Komposten wird die Originalprobe < 10 mm gesiebt. Zu nasse und nicht siebfähige Komposte werden vorgetrocknet

(Lufttrocknung). Pasteurisierte Materialien und flüssige Gärrückstände werden ungesiebt und als flüssiges Prüfsubstrat verwendet. Benötigte Materialien

- Kunststoffschalen mit Bodenlochung oder gleichwertige Versuchsbehältnisse,
- Gießmatten,
- Nadellochfolie,
- geeignetes Mischsubstrat (z. B. schwach zersetzter Hochmoortorf mit ca. 4 g kohlensaurem Kalk pro Liter, welches frei von keimfähigen Samen und austriebsfähigen Pflanzenteilen ist).

Durchführung 3 l gesiebt (FS < 10 mm) Prüfsubstrat werden für feste Proben und 0,5 l flüssiges Prüfsubstrat für flüssige Proben eingesetzt. Nach Bestimmung des Salzgehaltes^[9] wird das Prüfsubstrat mit einer geeigneten Mischkomponente (KCl-Gehalt = 0 g/l) so verdünnt, dass die Prüfmischung einen Salzgehalt von < 2 g KCl pro Liter aufweist. Als Mischkomponente, die frei von keimfähigen Samen und austriebsfähigen Pflanzenteilen sein muss, eignet sich Hochmoortorf mit ca. 4 g kohlensaurem Kalk pro Liter. Die Prüfmischung wird in einer Schichtdicke von ca. 10 mm in Versuchsschalen (Kunststoffschalen mit Bodenlochung oder gleichwertige Behältnisse, die mit einer Gießmatte und einer Nadellochfolie als Verschmutzungsschutz ausgelegt sind) gleichmäßig ausgebracht, leicht angedrückt und durch Gießen auf volle Wasserkapazität gebracht. Danach werden die Versuchsbehältnisse über einen Zeitraum von 15 Tagen bei einer Beleuchtungsstärke von mindestens 1 000 Lux und einer Temperatur von 18 bis 20 °C ohne direkte Sonneneinstrahlung belassen. Der Wasserverlust wird regelmäßig durch Überbrausen ausgeglichen. Um eine Austrocknung zu vermeiden, sollen die Schalen mit Glas- oder Kunststoffscheiben so abgedeckt werden, dass ein Luftaustausch weiterhin möglich ist. Berechnung Nach 15 Tagen Kulturdauer werden die aufgelaufenen Pflanzen gezählt und ihre Anzahl wird, bezogen auf einen Liter Prüfsubstrat, auf 2 Kommastellen genau angegeben. Die Prüfung der hygienisierten Bioabfälle ist in der Phytohygiene erfolgreich abgeschlossen, wenn der Gehalt an keimfähigen Samen und austriebsfähigen Pflanzenteilen maximal 2 pro Liter Prüfsubstrat ist.

1 DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Marscheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig.

2 Universität Hohenheim, Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Garbenstrasse 30, 70599 Stuttgart.

3 Veröffentlicht in der Beuth-Verlag GmbH, Berlin; archivmäßig gesichert niedergelegt beim Deutschen Patent- und Markenamt in München.

4 Methode nach Schwarz, Michael, Vergleichende seuchenhygienisch-mikrobiologische Untersuchungen an horizontal und vertikal beschickten, bewachsenen Bodenfiltern mit vorgeschalteter Mehrkammerausfallgrube bzw. einem als Grobstoff - Fang dienenden Rottebehälter (Rottefilter), S. 45, veterinärmedizinische Dissertation, FU Berlin, 2003; archivmäßig gesichert niedergelegt bei der Deutschen Nationalbibliothek in Leipzig.

7 Methode nach „Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut, Seed Science and Technology 21, Supplement, Internationale Vereinigung für die Prüfung von Saatgut“ (ISTA - International Seed Testing Association, Hrsg.), 1993; archivmäßig gesichert niedergelegt bei der Deutschen Nationalbibliothek in Leipzig.

9 Methode nach Methodenbuch zur Analyse organischer Düngemittel, Bodenverbesserungsmittel und Substrate, Kapitel III. C 2, Bundesgütegemeinschaft Kompost e. V. (Hrsg.), 5. Auflage 2006, Selbstverlag, Köln; archivmäßig gesichert niedergelegt bei der Deutschen Nationalbibliothek in Leipzig.

Zitiervorschlag: Anhang 2 BioAbfV

Quelle: Bundesamt für Justiz, abgerufen 02.07.2026

Nicht-amtliche Lesefassung — verbindlich ist das Bundesgesetzblatt

Provided by nu:legal (<https://recht.nulegal.eu>), the leading open legal database: AI-first, expanding daily, German and European law and case law in full text, free, with an open API for AI agents. Text and data mining expressly permitted.

Herausgeber: Nulegal GmbH, Potsdam.

Dieses Dokument: <https://recht.nulegal.eu/gesetze/BioAbfV/anhang-2>