

Fleischhygienische Aspekte zum Einsatz von industriell getrocknetem Legehennenkot in derRindermast

G. REUTER, K. TROEGER, G. WACHELAU

Institut für Fleischhygiene, Freie Universität Berlin

Die in erheblichen Mengen anfallenden Kotmengen aus Legehennenbetrieben stellen ein Umweltproblem dar. Die Verwertung im nativen Zustand als Dünger ist technisch schwierig und wegen der Geruchsbelastung und wegen des Keimgehaltes hygienisch bedenklich. Als Ausweg bietet sich die Trocknung an. Das so aufbereitete Produkt kann als Dünger verwendet werden. Nachdem jedoch im Ausland die Verfütterung dieser proteinhaltigen Abfallprodukte praktiziert worden ist, wurden solche Überlegungen auch in der Bundesrepublik angestellt. Dem steht jedoch das Verbot im geltenden Futtermittelrecht entgegen. Zur Überprüfung, ob dieses Verbot noch aufrechterhalten werden muß, wurden von uns Untersuchungen über die mikrobiologische und chemische Zusammensetzung und über mögliche antibiotische Rückstände des Trockenkotes angestellt. Darüber soll hier in einer ersten Mitteilung berichtet werden.

Eigene UntersuchungenMaterial

a) Untersuchung nativen Legehennenkotes

Seit Anfang 1979 wurden in ca. 3-wöchigen Abständen Kotproben aus den Stallungen eines großen Legehennenbetriebes in der Bundesrepublik stichprobenartig vom Kottransportband entnommen und zu einer Charge zusammengefaßt. Das Material wurde gekühlt zum Labor in Berlin transportiert. Das Untersuchungsmaterial war bis zur mikrobiologischen Untersuchung 1 bis maximal 3 Tage alt. Aus einem Vorratsbunker, in dem frischer Kot aus weiteren Legehennenbetrieben für eine Kottrocknungsanlage gesammelt wurde, wurden ebenfalls Proben gezogen. Das Alter dieses Materials betrug maximal 4 Wochen. Es lag im Bunker in einer Ruheform vor. Nach der Entnahme von Proben d.h. beim Zutritt von Sauerstoff, begann die enthaltene Mikroflora mit einem verstärkten Stoffwechsel, so daß eine deutlich sichtbare Gärung erkennbar war.

b) Untersuchung getrockneten Legehennenkotes

In mehrwöchigen Abständen wurden Trockenkotproben von verschiedenen Stellen des Produktionsganges entnommen, in der Regel direkt nach der Trockentrommel sowie vom Elevatorband und aus dem Vorratssilo.

c) Stichprobenweise Untersuchung von Futtermittelproben

Zum Vergleich wurde auch der Keimgehalt des eingesetzten Legehennenfutters untersucht.

Methodika) Die mikrobiologische Untersuchung umfaßte eine aerobe und anaerobe Kultivierung der wesentlichen Fraktionen der Mikroflora sowohl qualitativ wie quantitativ mit den bekannten und im Institut üblichen Nährböden und Aufarbeitungsmethoden. Außerdem wurde gezielt auf das Vorkommen von Salmonellen untersucht.b) Die biologisch-chemische Prüfung erstreckte sich auf den Nachweis von möglichen antibiotischen Rückständen und auf einige Komponenten, die im Rahmen einer chemischen Analyse des Trockenkotes analog zur Futtermitteluntersuchung zu erfassen waren.

Die üblichen chemischen Analysendaten wurden überwiegend vom Institut für Tierzucht und Tierernährung der FU Berlin zur Verfügung gestellt. Herrn Prof. Dr. D. Schneider sei für seine Mithilfe vielmals gedankt.

Die Rückstandsnachweise erfolgten zunächst auf biologischem Wege im allgemeinen Hemmstofftest (Agardiffusionstest) mit den Prüfstämmen *Bac. subtilis* BGA, *Sarcina lutea* (ATCC 9341) und *Mc. flavus* (10240) sowie dünn-schicht-chromatographisch, um qualitative Aussagen machen zu können. Da wäßrige Kotalaufschwemmungen fast durchweg negative Befunde erbracht hatten, wurden neben der Direktmethode zusätzlich verschiedene Extraktionsmethoden mit Lösungsmitteln wie Acetonitril, Äthanol (50%) und Methanol (50%) eingesetzt. Um diese Extraktionsmethoden auch an nativem Kot anwenden zu können, wurden 3 Chargen frischen Geflügelkotes gefriergetrocknet und für Nachfolgeuntersuchungen verwendet. Je 5 g Trockenkot (bzw. lyophilisierter Frischkot) wurden mit 30 ml Lösungsmittel homogenisiert, zentrifugiert, der Überstand anschließend bei 40° C im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und in 2 ml Aqua dest. gelöst. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde steril filtriert. Das Filtrat wurde dann für Hemmstoff- bzw. DC-Platten verwendet. Bei ersteren wurde in ausgestanzte Löcher von 8 mm Ø 0,1 ml Extrakt gegeben.

In weiteren Versuchen wurde die Stabilität von experimentell zugesetztem Zink-Bacitracin (ZNB) in zugelassener Konzentration zu nativem Kot nach seiner Erhitzung im Hemmstofftest auf die biologische Aktivität überprüft.

Im Verlauf der Untersuchungen erwies es sich auch als notwendig, die Bazillenflora des Trockenkotes auf die Produktion antibakteriell wirksamer Substanzen zu überprüfen.

Ergebnisse

Keimgehalt von nativem Legehennenkot

Bei 7 Chargen frischen Legehennenkotes (1 bis 3 Tage alt), die in der Regel aus 5 oder 6 Teilproben zusammengesetzt waren, ließ sich eine aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) zwischen 8,15 und 8,89 (log n) ermitteln. Bei üblicher anaerober Kultivierung (Gas Pak-System) unter Außerachtlassung der strikt anaeroben Anteile wie der Bacteroides- oder Bifidus-Gruppen lag der anaerobe Anteil jeweils im gleichen Bereich oder geringfügig niedriger. Die hauptsächlichsten Keimfloraanteile waren Bazillen, Mikrokokken, Enterokokken, Enterobacteriaceae, Pseudomonaden und Laktobazillen. Clostridien kamen nur in geringeren Mengen vor. Zu vermerken wäre, daß der Bazillenanteil überwiegend von Stämmen gebildet wurde, die anaerob gleichermaßen gut zu kultivieren waren.

Bei gelagertem Legehennenkot (14 bis 38 Tage alt) lagen die Keimfloraanteile in gleicher Komposition und etwa gleichen Größenordnungen vor.

Die Salmonellennachweisversuche verliefen bei allen Chargen positiv. Es traten insgesamt 8 Species auf, wobei im frischen Kot (1 bis 3 Tage) 7 Species und dabei *S. montevideo* (15 x) und *S. thomastown* (7 x) am häufigsten nachweisbar waren. Im gelagerten Kot traten 5 Species auf. Insgesamt war die Nachweishäufigkeit hier nicht so hoch.

Keimgehalt von getrocknetem Legehennenkot

Die insgesamt 15 untersuchten Chargen ließen eine Gesamtkeimzahl (GKZ) erkennbar werden, die mit $\bar{x} = 6,42$ (log n) bei $s = 0,42$ und 2 Zehnerpotenzen niedriger als im nativen Kot lag. Die anaerobe kultivierbare GKZ lag mit $\bar{x} = 5,58$ bei $s = 0,74$ durchschnittlich um fast eine weitere Zehnerpotenz niedriger. Ansonsten waren nur Mikrokokken und Pseudomonaden mit $\bar{x} = 4,21$ bzw. 4,62 und Clostridien mit 2,44 festzustellen. Nur sporadisch ließen sich Enterokokken und Enterobacteriaceae und dann auch nur in geringen Mengen zwischen 3 und 4 (log n) nachweisen. Es war durch den Trocknungsprozeß zu einer erheblichen Keimzahlreduzierung bei fast allen vegetativen Bakterien gekommen. Nur die Mikrokokken und die Pseudomonaden erwiesen sich als abgestuft hitzeresistent. Der Keimgehalt dieses neuen Produktes wurde im wesentlichen von den überlebenden Bazillen bestimmt. Die Clostridienanteile lagen etwas reduziert vor. Bei Wiederholungsuntersuchungen einiger Chargen nach einem Jahr wurde der nachweisbare Keimgehalt nur noch von den Bazillen bestimmt. Salmonellen waren in keinem Fall nachweisbar, selbst bei intensivster Suche mit Sammelproben, bestehend aus jeweils 10 Teilproben aus einer 25 kg Gesamtprobe, die insgesamt auf einer sterilen Alufolie auf 10 gleichgroße Felder aufgeteilt wurden und mit voller Inoculummenge in jeweils einer Voranreicherung 1 auf 10 aufgeschwemmt wurden. Es wurden 5 Sammelproben zu je 1000 g, 5 zu je 500 g und 5 zu je 100 g so gewonnen und aufgearbeitet. Nach Inkubation für 18 bis 24 h bei 37°C wurden jeweils 10 ml vor und nach dem Umrühren in je 100 ml Tetrathionat-Anreicherung gegeben und wie üblich weiter behandelt.

Keimgehalt von Futtermittelproben

Die GKZ lag im Bereich von 6,0 bis 6,5 (log n) und wurde auch hier im wesentlichen von Bazillen und Mikrokokken bestimmt. Clostridien und Salmonellen waren mit der üblichen Methodik nicht nachweisbar.

Chemische Zusammensetzung getrockneten Legehennenkotes

Die durchschnittlichen Werte von 9 untersuchten Chargen ergaben folgendes Bild: Der Trockensubstanzgehalt lag bei 92 %, der Rohproteingehalt bei 21,5 %. Der Rohfettgehalt war mit 2 % gering, der Calciumgehalt mit ca. 7 % ziemlich hoch. Phosphor- und Natriumgehalt mit 1,9 % bzw. 0,33 % lagen niedrig. Von den Spurenelementen lag der Kupfergehalt mit 68 ppm ziemlich hoch.

Nachweise von antibakteriellen Wirkungen bei Trocken- und Frischkot

Die direkten Nachweisversuche mit wäßrigen Aufschwemmungen verliefen bei 12 Trockenkotchargen immer negativ. Lediglich bei einer von drei Frischkotchargen war mit dem Teststamm *Mc. flavus* ein positives Ergebnis zu verzeichnen.

Nach Extraktion mit Lösungsmitteln und Konzentration waren jedoch antibiotische Reaktionen gegenüber den Teststämmen festzustellen. Unterschiedliche Reaktionen waren durch die verschiedenen Empfindlichkeit der Teststämme bestimmt. *Sarcina lutea* und *Mc. flavus* zeigten auf dem Weg größere Hemmhöfe als *Bac. subtilis*. Fast ausnahmslos traten positive Reaktionen auf Testplatten mit pH = 6 oder 6,5 auf. Der pH-Wert der Kotextrakte lag zwischen 5 und 6. Als Extraktionsmittel war Methanol offensichtlich ergiebiger als Acetonitril. Die nicht bei allen Chargen in gleicher Zahl ermittelten Befunde sind in Tab. 1 dargestellt.

Versuche zur Identifizierung der positiven Hemmstoffreaktionen

Da Zink-Bacitracin (ZNB) als zugelassener nutritiver Stoff im Legehennenfutter auch im Kot vermutet werden konnte, wurde die Identifizierung zunächst auf diese Substanz ausgerichtet. Als minimale Hemmkonzentration wurde 0,2 mcg Bacitracin / ml gegenüber *Mc. flavus* in einem besonderen Versuch ermittelt. Die Überprüfung der Stabilität von Zink-Bacitracin (ZNB) ergab

en durch Fleisch verursacht werden, die zur ungerechtfertigten Reglementierung von Tierkörpern bei der Fleischuntersuchung führen, ist dagegen nichts einzuwenden.

Antibakterielle Reaktionen im Agardiffusions-Hemmstofftest
durch frischen und erhitzten Legehennenkot nach Extraktion
mit verschiedenen Lösungsmitteln

Chargen, Datum	Extraktion mit	Hemmhöfe in mm auf Platten, mit					
		Bac. subtilis ("BGA")		Sarc. lutea (ATCC 9341)		Mc. flavus (ATCC 10240)	
		pH: 6	8	6,5	8	6,5	8
Frischkot lyophilisiert F I - III 5.80	Äth.	3		5 5		6 6	
	Meth.	4 3 4				7 5 7	7 2 5
	Ac.	2 2 2	-	4 3 2	-	6 5 5	-
	HCl			5	-		
	H ₂ O	-	-	-	-	4	-
	Σ	+ / ++	-	++	-	+++	+++
Trockenkot hocherhitzt T I - XI 11.78 bis 4.80	Äth.	2 2 1 2 2		4 4 3 2 4		3 3 3 3	
	Meth.	2 3 1				6 4 4	3 3
	Ac.	1 1 3 1	-	4 2 1	-	3 3 3 2 2	-
	H ₂ O	-	-	-	-	-	-
		Σ	+	-	++		+ / +++

+ = bis 3 mm | Äth. = Äthanol (50%)
 ++ = bis 5 mm | Meth. = Methanol (50%)
 +++ = > 5 mm | HCl = Salzsäure (0,25 n)

im nativen Kot eine Wiederfindungsrate von 10,6 %, im Trockenkot von 3,1 %. Die im Versuch zugesetzte Menge betrug 1 mg/10 g Frischkot, entsprechend der erlaubten maximalen Zusatzmenge für Legehennenfutter. Die Restaktivität von ca. 3 % im Trockenkot reichte aus, um *Mc. flavus* stark zu hemmen (bis 10 mm Hemmradius). *Bac. subtilis* reagierte hingegen nur mit zweifelhaften Reaktionen (1 bis 1,5 mm). Daraus konnte geschlossen werden, daß es sich bei den starken Hemmreaktionen um Auswirkungen von ZNB handelte.

Nicht ins Konzept paßten die zahlreichen schwachen Hemmreaktionen mit verschiedenen Extrakten bei allen 3 Teststämmen. Auf Grund eigener Beobachtungen beim Ablesen verschiedener Hemmstoffplatten wurde vermutet, daß antibiotische Stoffe von bestimmten Bazillenstämmen, die im Hühner-trockenkot selektiert vorlagen, gebildet worden waren. Von 5 isolierten Stämmen, von denen je 2 morphologisch ähnlich waren, wurden vor und nach Hitzebehandlung Äthanol-extrakte hergestellt. Bei 2 der Stämme lag ein hitzestabiles Agens vor. *Mc. flavus* und *Bac. subtilis* reagierten etwa gleich stark darauf, *Sarc. lutea* hingegen kaum.

Der Versuch, dünn-schichtchromatographisch die hitzelabilen und -stabilen Stoffe in den Bazillus-Extrakten zu identifizieren, ergab beim Vergleich mit ZNB und Flavomycin als Kontrollsubstanzen, daß es sich um keine handelsüblichen zugelassenen Antibiotika handeln konnte.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß die in Legehennentrockenkot feststellbare antibakterielle Aktivität nicht auf die mit dem Futter zugeführten zugelassenen Antibiotika zurückzuführen ist. Die ähnlich starke Hemmung der Testkeime *Bac. subtilis* "BGA", *Sarc. lutea* und *Mc. flavus* durch Trockenkotextrakte sprach gegen die Anwesenheit von ZNB-Resten im Trockenkot, da selbst bei einer nur geringen Restaktivität dieser Substanz nach der Kottrocknung *Sarc. lutea* und *Mc. flavus* deutlich stärker hätten gehemmt werden müssen als *Bac. subtilis* "BGA". Flavomycinrückstände im Kot waren auf Grund der meist negativen Reaktionen auf pH 8-Hemmstoffplatten auszuschließen. Die Empfindlichkeit aller verwendeter Testkeime ist gegenüber Flavomycin bei pH 8 größer als bei pH 6. ZNB und Flavomycin konnten auch dünn-schichtchromatographisch in den Kotextrakten nicht nachgewiesen werden.

Die Ursache für die allgemeine antibakterielle Wirkung der Kotextrakte waren offensichtlich die Metaboliten der im Trockenkot enthaltenen Bazillenflora. Dafür sprach die stärkere Hemmung durch einer bebrüteten Frischkotprobe im Vergleich zur gleichen, jedoch vor dem Bebrüten starke Hemmung der 3 Testkeime durch Bazillenextrakte in etwa übereinstimmend mit der Hemmung durch Kotextrakte.

Diskussion :

Nach den ermittelten Befunden an getrocknetem Legehennenkot bestehen nur noch wenige und eigentlich unbedeutende Bedenken gegen einen Einsatz als Ergänzungsfutter in der Rindernmast. Die Ausnutzung des Proteinanteils kann am besten erfolgen, wenn dieses Produkt zusätzlich mit Maissilage zur Anwendung kommt. Diese Anwendungsform wird von Rindern nach relativ kurzer Gewöhnungszeit auch ohne Zögern akzeptiert.

Auswirkungen auf die sensorische Qualität des Fleisches und der Organe von Rindern scheinen nicht zu bestehen. Im Gegenteil wird das Fleisch nach Aussagen erster Versuche als saftiger und zarter eingeschätzt.

Die mikrobiologische Beschaffenheit des Legehennenkotes könnte eigentlich nur wegen des relativ hohen Bazillenanteiles Anlaß zu Bedenken geben. Bazillen sind jedoch in Futterstoffen aller möglichen Kombinationen ebenfalls in beträchtlichen, teilweise annähernd gleich hohen Mengen enthalten. Selbst Maissilage zeichnet sich durch einen beachtenswerten Bazillengehalt aus. Bedenken könnten nur deshalb erhoben werden, weil es sich ja um eine Selektierung hitzeresistenter Stammformen gehandelt haben kann. Das könnte zu einer einseitigen Beeinflussung der Magen-Darm-Flora der Rinder führen. Bedenken hinsichtlich der verbliebenen Clostridien erscheinen nicht so groß, da dieser Anteil durch den Trocknungsprozeß stärker reduziert wurde als derjenige der Bazillen.

Die angetroffene gramnegative Flora bestand aus unbedenklichen psychrotrophen Anteilen, die sich als ubiquitäre, möglicherweise auch hitzetolerante Flora aus geringen Restbestandteilen zu einer typischen Futtermittelflora entwickelt haben kann. Dieses ist nicht ungewöhnlich, sondern typisch für alle staubförmigen eiweißreichen Substrate. Auf jeden Fall waren Enterobacteriaceae so gut wie gar nicht und Salmonellen bei den geprüften 15 Chargen in keinem Fall anzutreffen. Diese Aussage kann insofern als gültig angesehen werden, als die Untersuchungen sich über einen Zeitraum von 14 Monaten erstreckten und bei 7 Chargen auch Wiederholungsuntersuchungen im Abstand von 10 - 14 Monaten am gleichen Probematerial durchgeführt werden konnten.

Die Befürchtung, daß sich Rückstände antibiotischer Stoffe aus der Legehennenfütterung konzentriert im getrockneten Kot vorfinden könnten, konnte durch aufwendige Nachweisversuche entkräftet werden. Vielmehr stellte sich heraus, daß gewisse antibakteriell wirksame Stoffe aus dem Stoffwechsel der selektierten Bazillenflora resultieren müssen. Diese Anteile sind jedoch quantitativ so gering, daß sie nur durch besondere Extraktions- und Konzentrationsmethoden nachweisbar werden. Sofern dadurch nicht falsche Hemmstoffreaktionen