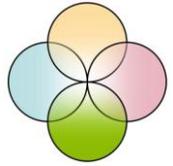


Institut für Bakteriologie u. Mykologie An den Tierkliniken 29 D-04103 Leipzig  
Direktorin: Prof. Dr. M. Krüger

**Veterinärmedizinische Fakultät**  
**Zentrum für Infektionsmedizin**  
**Sprecherin: Prof. Dr. Monika Krüger**  
Institut für Bakteriologie und Mykologie  
Institut für Immunologie  
Institut für Parasitologie  
Institut für Virologie



## Labor- und Felduntersuchung zur Abfall-/Klärschlammverwertung aus dezentralen Abwasserbehandlungen für die Herstellung hochwertiger Schwarzerdeböden (Terra Preta)

### Band 1

#### Stufe 1.: Dekontamination von fäkalen Klinikabfällen

*Bearbeiter: Dipl.-Biol. Hendrik Scheinemann*  
*Projektleiterin: Prof. Dr. Monika Krüger*

Zwischenbericht für die Förderer:



**Bildungs- und Demonstrationzentrum  
für dezentrale Abwasserbehandlung e.V.**

[www.bdz-abwasser.de](http://www.bdz-abwasser.de)

gefördert durch



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

[www.dbu.de](http://www.dbu.de)



Az	<b>27937</b>	Referat	<b>23</b>	Fördersumme	<b>44.625,00 €</b>
----	--------------	---------	-----------	-------------	--------------------

<b>Antragstitel</b>	Labor- und Felduntersuchungen zur Abfall-/Klärschlammverwertung aus dezentralen Abwasserbehandlungen für die Herstellung hochwertiger Schwarzerdeböden (Terra Preta)
---------------------	--

<b>Stichworte</b>	Boden, Dekontamination
-------------------	------------------------

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>9 Monate</b>	<b>16.12.2009</b>	<b>15.09.2010</b>	<b>1</b>

Zwischenberichte

<b>Bewilligungsempfänger</b>	<b>Universität Leipzig</b> Ritterstraße 26 04109 Leipzig Dr : Frank Nolden Kanzler	Tel	0431 9730100
		Fax	03419730109
		Projektleitung	Prof. Monika Krüger
		Bearbeiter	Hendrik Scheinemann

<b>Kooperationspartner</b>	BDZ - Bildungs- und Demonstrationszentrum für dezentrale Abwasserbehandlung - e.V. An der Luppe 2 04178 Leipzig
----------------------------	---

### ***Zielsetzung und Anlass des Vorhabens***

Die Verbringung menschlicher und tierischer Fäkalien auf landwirtschaftlich genutzte Böden führt zu einer Akkumulation von Schadstoffen und pathogenen Mikroorganismen. Zu den Bodenschadstoffen mit Ökotoxizität gehören auch Antiinfektiva und Schwermetalle. Insbesondere biogene Abfälle aus dem Bereich veterinärmedizinischer Kliniken enthalten pathogene Mikroorganismen, Antiinfektiva und verrottungsresistentes Einstreumaterial (Holzspäne). Mit dem vorliegenden Projekt sollen in der 1. Projektphase diese Abfälle mittels der Terra Preta (TP)-Technologie dekontaminiert bzw. abgebaut werden, um daraus fruchtbare anthropogene Schwarzerden zu erzeugen. Durch Bepflanzen von TP-haltigen Pflanzparzellen mit Mais wird geprüft, ob die Bodenfruchtbarkeit durch TP verbessert wird.

### ***Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden***

1. Laborversuche:
  - 1.1. Untersuchungen zur Dynamik der Fäkalkeime und zum Fermentationsergebnis (Kurzkettinge Fettsäuren, Milchsäure, pH-Wert) in Beziehung zur Zusammensetzung der Fermentationsmatrix (mit Holzkohle, ohne Holzkohle, mit Laktobazillenzusatz, ohne Laktobazillenzusatz) bei 37°C. Folgende mikrobiologische Parameter wurden kulturell untersucht: aerobe Gesamtkeimzahl, anaerobe Gesamtkeimzahl, Enterobakterienzahl, Laktobazillen, Clostridium perfringens, Clostridiengesamtzahl, Staphylokokken, Enterokokken, Hefen, Schwärzepilze (Aspergillus niger), Salmonellen, Listeria monocytogenes. Die Keimzahlen wurden parallel mittels Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung ermittelt Die Spezifizierung der kultivierten bakterien erfolgte mittels MALDI-TOF. as Fermentationsergebnis wurde durch Bestimmung des pH-Wertes mittels pH-Meter sowie durch Aalyse der Gärsäuren mittels HPLC (BioCheck Leipzig) verifiziert

- 1.2. Untersuchungen zur Degradierung von pathogenen Bakterien, Viren, Parasitendauerstadien: In die unter 1.1. beschriebenen Matrices wurden *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157, *Salmonella* Anatum und *Salmonella* Senftenberg in einer Endkonzentration von ca.  $10^6$  KBE/ml inokuliert und die Ansätze nach 3, 7, 14 und 21 Tagen Fermentation auf lebende Erreger untersucht. Die Untersuchungen wurden quantitativ mittels kultureller Methoden durchgeführt. ECBO-Viren wurden auf Keimträger aufgetragen und in die Fermentationsmatrices verbracht. Die Untersuchungen der Keimträger auf lebende Viren erfolgten im Institut für Virologie der Vet. med. Fakultät auf Zellkulturen nach 3, 7, 14 und 21 Tagen Fermentation. Spulwurmeier wurden in einer Endkonzentration von ca. 7800 Eier / Gramm in die Matrices verbracht und nach 1, 2, 3 und 8 Wochen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Embryonierung untersucht. Die Untersuchungen wurden im Institut für Parasitologie der Vet. med Fakultät durchgeführt.
- 1.3. Untersuchungen zum Abbau von Antiinfektiva: Am Beispiel von Sulfadiazin wurde untersucht, ob TP zum Abbau in der Lage ist. Dazu wurden 10mg/Kg Matrix eingewogen und mittels HPLC nach 7, 14, und 21 Tagen untersucht, ob ein Abbau oder Adsorption stattgefunden haben. Die Untersuchungen wurden am Institut für Toxikologie der TiHo Hannover durchgeführt.

## 2. Felduntersuchungen:

- 2.1. Untersuchungen zur Dynamik der Fäkalkeime, zum Fermentationsergebnis sowie zum Reifegrad der TP: Es wurden im 1. Ansatz 4 TP-Varianten mit 4 Wiederholungen in 60l Maischfässern mit einem Fäkalgehalt von 40% gemischt. Davon enthielt eine Variante keine Holzkohle und keine zusätzlichen Laktobazillen. In einem 2. Ansatz wurden 3 Varianten in 3 Wiederholungen mit 80% Fäkalanteil hergestellt, von denen eine Variante keine zusätzlichen Laktobazillen enthielt. Die Ansätze wurden 4 Wochen bei 27 °C fermentiert. Nach 4 Wochen wurden die fermentierten Matrices in 1m<sup>2</sup> große Parzellen ausgeschüttet. Vom Ansatz 1 wurden jeweils 2 gleiche Fassinhalte auf eine Parzelle verbracht, vom Ansatz 2 wurden 3 gleiche Fassinhalte auf eine Parzelle verbracht. Nach Neutralisierung des leicht sauren Materials mit CaOH-haltigem Gesteinsmehl wurden ca. eine Woche nach der Ausbringung des Materials pro Parzelle 1000 Kompostwürmer eingesetzt. 4 Kontrollparzellen wurden mit und ohne Kompostwürmer in die Untersuchungen einbezogen. Bakteriologische Untersuchungen, pH-Wertbestimmung und Gärsäurebestimmungen wurden 4 Wochen Fermentationsbeginn wie unter 1.1. durchgeführt.

Der Reifegrad der TP wurde nach 10 Wochen Vererdung mittels elektronischer Nase und pH-Wertbestimmung ermittelt.

10 Wochen nach der Vererdung wurden in Töpfen vorgezogene Maispflanzen in die TP-Areale verpflanzt. Die Maispflanzen wurden in ca. 4-Wochenabständen vermessen und nach 14 Wochen geerntet.

## **Ergebnisse und Diskussion**

### 1. Laboruntersuchungen

Unter Laborbedingungen konnten fäkale Klinikabfälle erfolgreich von pathogenen Mikroorganismen dekontaminiert werden. Das galt auch nach 6 Wochen für Spulwurmeier. Von diesen Modelluntersuchungen konnten Rückschlüsse auf den Feldversuch und die praktische Anwendung gezogen werden. Anhand dieser Untersuchungsergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass mit der TP- Methode eine sichere, dezentrale Low-Tech-Hygienisierung stattfinden kann.

- 1.1. Durch die Fermentation sanken die aeroben Gesamtkeimzahlen, die Enterobakterien-, Staphylokokken- und Enterokokkenzahlen in den Fermentationsmatrices um ca. 3 Zehnerpotenzen. Die Clostridienkeimzahlen wurden aber nicht reduziert, blieben auf ähnlich niedrigem Niveau wie zum Zeitpunkt 0. Hefen und Schimmelpilze sanken um 1-2 Zehnerstufen. Auf Keimträgern die fermentationsansätze zugesetzte Viren (ECBO) wurden innerhalb von 14 Tagen und Gram-positive sowie Gram-negative pathogene Bakterien (*L. monocytogenes*, *S. aureus* sowie *E. coli* O:157, *Salmonella* Anatum, *Salmonella*. Senftenberg) innerhalb von 3 Tagen bis unter die Nachweisgrenze der Nachweismethode degradiert. Diese Degradierungen sind Folge der pH-Wert-Absenkungen durch Produktion von kurzkettiger Fettsäuren und Milchsäure

1.2. Zur TP-Matrix zugesetztes Sulfadiazin wird unmittelbar nach Zugabe in die Matrix bis auf 16-24% der zugegebenen Menge absorbiert. Nach drei Wochen Fermentation liegt die nachweisbare Sulfadiazin-Menge bei 3,2-5%. Vermutlich adsorbiert ein erheblicher Anteil unmittelbar an die Matrix.

1.3. Spulwurmeier waren nach 8 Wochen Fermentation nicht mehr zur Embryonierung fähig. Damit steht eine Methode zur Verfügung, die äußerst resistenten Spulwurmeier zu inaktivieren.

1.4. Die Kontrolle der Reifequalität der Terra Preta kann nach bisherigem Stand der Forschung nicht mit Hilfe der elektronischen Nase ermittelt werden. Viel besser eignet sich die menschliche Nase für die Beurteilung des Reifegrades. Es bieten sich hierfür auch die pH-Messung sowie die bakteriologische Untersuchung einzelner Parameter an.

## 2. Felduntersuchungen

Die fäkalen Abfälle des Lehr- und Versuchsgut Oberholz konnten in ähnlicher Weise dekontaminiert werden wie in den Laboruntersuchungen. Die ermittelten bakteriologischen Parameter waren in beiden Untersuchungen sehr ähnlich. Kurzkettigen Fettsäure- und Milchsäurekonzentrationen, die bei der Fermentation entstehen, ergaben Unterschiede in Zusammensetzung und Konzentration zum Laboransatz. Auch die pH-Wert-Absenkungen fielen nicht so stark aus. Die Ursache sehen wir in dem zu geringen Anteil fermentierenden Materials. Es wurden 12% Grassilage, 3,1% Quetschgerste und 1,1% Sägespäne als fermentierbares Substrat eingemischt. Dadurch war der Anteil an Gärssäuren gegenüber dem Laboransatz mit 23% leicht verdaulichen Kohlenhydraten wesentlich verringert, was sich auch an den höheren pH-Werten (ca. 5, 4) zeigte. Trotzdem waren die Enterobacteriaceae bis unter die Nachweisgrenze degradiert. In den Fermentationsansätzen war keine Reduktion von sporenbildenden Clostridien festzustellen. Eine Vermehrung konnte aber auch nicht festgestellt werden. Während der Fermentation entstanden in Fässern brennbare Gase, die mit Sicherheit auf Methan zurück gingen. Interessant war hier, dass besonders in den Fässern ohne zusätzliche Laktobazillensubstitution die Gasbildung am stärksten war. Unter praktischen Bedingungen könnte dieses Gas als Energieträger genutzt werden. Unter Umständen könnte diese Energiequelle für die Erwärmung von TP-Flächen in den Wintermonaten genutzt werden. Das vererdete TP-Material sorgte auf den Versuchsfeldern für eine stärkere Diversität von Bodenorganismen, eine erheblich bessere Wasseraufnahme und tendenziell für einen besseren Pflanzenwuchs. Weiter Untersuchung zur Bodenverbesserung sowie zu den Details der Hygienisierung sind sehr zu empfehlen.

## ***Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation***

Die Ergebnisse unserer Arbeit wurden anlässlich einer BDZ-Veranstaltung in Magdeburg 12.5.2010 vorgestellt.

## ***Fazit***

Mit der hier genutzten milchsäuren Fermentation ist es möglich fäkale Abfälle zu hygienisieren. Die dabei verwendete Methode ist mit einfachen Mitteln umsetzbar. Die entstehenden Matrices haben positive Effekte auf die Versuchsfelder.

**Inhalt**

Projektkennblatt .....	2
Inhalt .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Fotoverzeichnis .....	9
Abkürzungen .....	10
Zusammenfassung.....	10
1. Einleitung und Aufgabenstellung.....	11
2. Material und Methoden .....	13
<b>2.1. Herstellung der Terra Preta .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1. Laborversuche .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2. Feldversuche.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Mikrobiologische Untersuchungen .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1. Probenentnahme .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2. Kulturelle mikrobiologische Untersuchungen.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3. Gattungs-/ Artbestimmung mittels Maldi-TOF MS (Bruker) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.4. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Untersuchung zum Absterbeverhalten ausgesuchter Pathogene. ....</b>	<b>20</b>
<b>2.4. Untersuchung zur Tenazität des Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan Viruses. (ECBO) .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5. Untersuchung der Tenazität von Ascaris suum (Wildtyp) – Dauerstadien.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6. Untersuchung zum Abbau des Antiinfektivums Sulfadiazin (Sulfonamid).....</b>	<b>22</b>
<b>2.7. Bestimmung des Reifegrades der fermentierten Dung-Matrix.....</b>	<b>22</b>
<b>2.7.1. Olfaktorische Bestimmung – elektronische Nase:.....</b>	<b>23</b>
<b>2.7.2. Gärsäuren-, Laktat und Alkoholbestimmung .....</b>	<b>24</b>
<b>2.7.3. pH-Wert- Messung.....</b>	<b>24</b>
3. Ergebnisse .....	25
<b>3.1. Bakteriologische Untersuchungen .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.1. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Labormaßstab .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Feldversuch .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.2.1. Qualitativen Keimfloraveränderungen im Feldversuch .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2.2. Untersuchungen zu den Gesamtkeimzahlen und zur metabolischen Aktivität der Mikroorganismen.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Untersuchungen zur Tenazität von pathogenen Bakterien im Laborversuch .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Untersuchungen zur Tenazität von ECBO-Viren im Laborversuch.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Untersuchungen zur Tenazität von <i>Ascaris suum</i> -Eiern.....</b>	<b>45</b>

<b>3.5. Abbau/Adsorption von Sulfadiazin .....</b>	<b>46</b>
<b>3.6. Reifegradbestimmung der Terra Preta .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.1. Reifegradbestimmung mittels der elektronischen Nase.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.3. Reifegradbestimmung mittels Gärsäure-, Laktat- und Alkoholbestimmung.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.3. Reifegradbestimmung mittels pH-Wert Messung.....</b>	<b>51</b>
<b>4. Interpretation und Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Interpretation der kulturellen bakteriologischen Untersuchungen .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.1. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Labormaßstab .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.2.1. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Feldversuch .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.2.1. Interpretation der qualitativen Keimfloraveränderungen im Feldversuch .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1.2.3. Interpretation der Ergebnisse der Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung (FISH).....</b>	<b>61</b>
<b>4.2. Diskussion und Interpretation der Untersuchungen zur Tenazität von pathogenen Bakterien im Laborversuch .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3. Diskussion und Interpretation der Untersuchungen zur Tenazität von ECBO-Viren im Laborversuch .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4. Diskussion und Interpretation der Untersuchungen zur Tenazität von Ascaris suum - Dauerstadien .....</b>	<b>63</b>
<b>4.5. Diskussion und Interpretation zum Abbau von Sulfadiazin im Laborversuch .....</b>	<b>63</b>
<b>4.6. Diskussion zur Reifegradbestimmung der Terra Preta .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6.1. Diskussion der Eignung der elektronischen Nase .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6.2. Diskussion zur Eignung der Laktat- Alkohol- und Gärsäurebestimmung als Maß für den Reifegrad der Ansätze .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6.3. Eignung des pH-Wertes zur Beurteilung des Reifegrades .....</b>	<b>66</b>
<b>5. Fazit.....</b>	<b>66</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>Fotoimpressionen .....</b>	<b>71</b>
<b>Anhang: .....</b>	<b>76</b>

## Abbildungsverzeichnis

	<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1. a-f.)</b>	Verlauf der mesophilen Keimflora während der Fermentation im Laborversuch	<b>27</b>
<b>Abb. 2a.)</b>	Dynamik der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen im Feldversuch	<b>29</b>
<b>Abb. 2b.)</b>	Dynamik der anaeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen im Feldversuch	<b>30</b>
<b>Abb. 2c.)</b>	Dynamik der Gram-negativen, mesophilen, aeroben Gesamtkeimzahlen, von Coliformen, Pseudomonadaceae im Feldversuch	<b>31</b>
<b>Abb. 2d.)</b>	Dynamik der Enterokokkenzahlen im Feldversuch	<b>32</b>
<b>Abb. 2e.)</b>	Dynamik der Laktobazillenzahlen im Feldversuch	<b>33</b>
<b>Abb. 2f.)</b>	Dynamik der Hefe- Schimmel- und Schwärzepilzkeimzahlen im Feldversuch	<b>34</b>
<b>Abb. 2g.)</b>	Dynamik mesophiler Clostridienkeimzahlen im Feldversuch	<b>35</b>
<b>Abb. 2h.)</b>	Dynamik sulfidreduzierender Clostridien im Feldversuch	<b>36</b>
<b>Abb. 2i.)</b>	Dynamik der Eub338- markierten (stoffwechselaktiven) Eubacteria im Feldversuch.	<b>41</b>
<b>Abb. 2j.)</b>	Dynamik der mittels DAPI-Färbung ermittelten bakteriellen Gesamtzahl (lebend und tot) im Feldversuch	<b>42</b>
<b>Abb. 3a.)</b>	Absterbeverhalten von Pathogenen im Zeitverlauf, unabhängig von den Matrices	<b>43</b>
<b>Abb. 3b.)</b>	Absterbeverhalten von <i>S. Senftenberg</i> im Zeitverlauf, unabhängig von den Matrices	<b>43</b>
<b>Abb.4.)</b>	Absterbeverhalten von ECBO-Viren im Zeitverlauf, in Abhängigkeit von den Matrices	<b>44</b>
<b>Abb. 5.)</b>	Absterbeverhalten von <i>Ascaris suum</i> - Eiern im Zeitverlauf in den Matrices OEM und EM.	<b>45</b>
<b>Abb. 6.)</b>	Sulfadiazinabbau im Zeitverlauf in den Matrices OEM und EM	<b>46</b>
<b>Abb. 7.)</b>	Hauptkomponentenanalyse des Sensorarrays der elektronischen Nase	<b>47</b>
<b>Abb. 8.)</b>	Hauptkomponentenanalyse des Sensorarrays der elektronischen	<b>48</b>

	Nase, Einzelproben in zeitliche Gruppen zusammengefasst	
<b>Abb. 9a.)</b>	pH-Werte der Matrices der Laborversuche I vor, nach 3 und nach 8 Wochen Fermentation	<b>51</b>
<b>Abb. 9b.)</b>	Mittlere pH-Werte der Matrices des Feldversuches vor und nach der 4 wöchigen Fermentation	<b>52</b>

### Tabellenverzeichnis

	<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>
<b>Tab. 1.)</b>	Nachweis ausgewählter Bakterienspezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten	<b>37</b>
<b>Tab. 2.)</b>	Darstellung der Trennbarkeit der verschiedenen Gruppen der PCA	<b>48</b>
<b>Tab. 3.)</b>	Gärsäure-, Laktat- und Alkoholgehalt im Substrat des Laboransatzes I	<b>49</b>
<b>Tab. 4.)</b>	Gärsäure-, Laktat- und Alkoholgehalt im Substrat des Feldansatzes	<b>49</b>
<b>Tab. 5.)</b>	Gärsäure-, Laktat- und Alkoholgehalt des Laboransatzes II	<b>50</b>
<b>Tab. 6.)</b>	Laboransatz 1 Keimzahlen zum Startzeitpunkt, den Nährmedien nach geordnet,	<b>77</b>
<b>Tab. 7.)</b>	Laboransatz 1 Keimzahlen, den Nährmedien nach geordnet, 3 Wochen fermentiert	<b>78</b>
<b>Tab. 8.)</b>	Laboransatz 1 Keimzahlen, den Nährmedien nach geordnet, 8 Wochen fermentiert,	<b>80</b>
<b>Tab. 9.)</b>	Embryonierungsraten der Spulwürmer im Zeitverlauf	<b>82</b>
<b>Tab. 10.)</b>	Keimzählung FISH-Sonde Eub und der Dapi-Färbung	<b>82</b>
<b>Tab. 11.)</b>	In vitro-Keimkonzentrationen der Pathogenen unter verschiedener Anzuchtbedingungen	<b>83</b>
<b>Tab. 12.)</b>	In vitro-Keimkonzentrationen der Pathogenen im Zeitverlauf	<b>83</b>
<b>Tab. 13.)</b>	pH-Werte – vom Feldansatz vor und nach 4 Wochen Fermentation.	<b>84</b>
<b>Tab. 14.)</b>	Sulfadiazinkonzentrationen,	<b>85</b>
<b>Tab. 15.)</b>	Keimzahlen – vom Feldansatz vor, nach 4 Wochen Fermentation sowie nach 10 wöchiger Vererdung	<b>86</b>

## Fotoverzeichnis

	<b>Fotographie</b>	<b>Seite</b>
<b>Foto 1.)</b>	Fermentationen im Labormaßstab	<b>14</b>
<b>Foto 2.)</b>	Fermentation im Feldmaßstab	<b>16</b>
<b>Foto 3.)</b>	Eines von fünfzehn Versuchsfeldern zu Beginn der Vererdung	<b>17</b>
<b>Foto 4.)</b>	Potentieller Vektor im Versuchsfeld eine junge Brandmaus ( <i>Apo-demus agrarius</i> )	<b>55</b>
<b>Foto 5.)</b>	<i>Geotrichum spec.</i> überwuchert ein abgedecktes Versuchsfeld nahezu vollständig.	<b>58</b>
<b>Foto 6.)</b>	Mikroskopische Aufnahme von <i>Geotrichum spec.</i> 1:400	<b>58</b>
<b>Foto 7.)</b>	Mutmaßliche Antagonisten aus der Klasse der Springschwänze ca. 1:25	<b>59</b>
<b>Foto 8.)</b>	Versuchsfelder kurz nach der Fermentation bestückt 8.April 2010	<b>71</b>
<b>Foto 9.)</b>	Kontrollfeld am 5. Juli 2010, lediglich 3 von 9 Pflanzen sind aufgegangen	<b>71</b>
<b>Foto 10.)</b>	Versuchsfeld am 5. Juli 2010 lediglich 5 von 9 Pflanzen sind aufgegangen	<b>72</b>
<b>Foto 11.)</b>	Versuchsfeld am 12. Juli 2010 die nachgesetzten Neupflanzen sind deutlich kleiner (rechte Reihe)	<b>72</b>
<b>Foto 12.)</b>	Versuchsfeld am 23. Juli 2010	<b>73</b>
<b>Foto 13.)</b>	Versuchsfeld vom 29.Juli.2010	<b>73</b>
<b>Foto 14.)</b>	Versuchsfeld am 19.August 2010	<b>74</b>
<b>Foto 15.)</b>	Versuchsfelder nach der Ernte (Aufgenommen am 11.11.2010)	<b>74</b>
<b>Foto 16.)</b>	Versuchsfeld nach der Ernte, mit Holzkohlezuschlag (Aufgenommen am 11.11.2010)	<b>75</b>
<b>Foto 17.)</b>	Versuchsfeld nach der Ernte, ohne Holzkohlezuschlag (Aufgenommen am 11.11.2010)	<b>75</b>

## Abkürzungen

KbE	Kolonie bildende Einheiten
log KbE/g	dekadischer Logarithmus der Kolonie bildende Einheiten pro Gramm
PbE	Plaque bildende Einheiten
GKZ	Gesamtkeimzahl
MPN	most probable number (semiquantitatives Keimzählungsverfahren)
OS	Originalsubstanz
lvK	leicht verwert- bzw. verdaubare Kohlenstoffquelle
MDT	Magendarmtrakt

## Zusammenfassung

Im Rahmen der Entwicklung von Methoden zur Hygienisierung und Verwertung fäkaler Abfälle und von Klärschlämmen wurde die erste Stufe eines zweigeteilten Projektes realisiert. Im Vordergrund stand die Entsorgung von fäkalen Klinikabfällen. Dabei wurde insbesondere Wert auf die Dekontamination von potentiellen Krankheitserregern (Bakterien, Viren und Parasitenstadien) und Antiinfektiva gelegt. Für die Untersuchungen des Verlaufs der Hygienisierung wurden kulturelle sowie molekularbiologische Methoden verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass mittels der genutzten milchsauren Fermentation fäkale Abfälle hygienisiert werden konnten. Weiterhin konnte am Beispiel vom Sulfadiazin erarbeitet werden, dass Terra Preta in der Lage ist, >90% des Wirkstoffes zu absorbieren. Das genutzte Verfahren ist mit einfachen Mitteln umsetzbar und führt zu einer signifikanten Verringerung, in die Umwelt entlassener potentiell, pathogener Keimlasten. Die entstehenden Matrices haben einen positiven Effekt auf die Versuchsfelder.

In der zweiten Projektstufe stehen demgegenüber Klärschlämme aus Kleinkläranlagen sowie devastierte Böden ehemaliger Rieselfelder im Vordergrund der Betrachtung. Insbesondere Kontaminationen mit Pharmazeutika und Schwermetallen werden untersucht. Das vorliegende Projekt mit dem Aktenzeichen 27937 wird unterstützt und gefördert von dem BDZ – Bildungs- und Demonstrationszentrum für dezentrale Abwasserbehandlung – e.V. sowie der DBU – Deutschen Bundesstiftung Umwelt.

### 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Fäkale Klinikabfälle enthalten neben potentiell pathogenen Erregern (Bakterien, Pilze, Protozoen, Wurmeier, Viren) auch Medikamente und Einstreumaterialien deren Abbau problematisch ist. Das Ausbringen dieser Abfälle nach entsprechender Lagerungszeit auf landwirtschaftliche Nutzflächen birgt die Gefahr des Eintrags dieser Erreger in die Nahrungskette in sich.

Je nach Bodenart und Bodenbeschaffenheit können bakterielle Infektionserreger im Boden längerfristig überdauern (Glathe, et al., 1962) (Jiang, et al., 2002). Sporenbildende Pathogene zeichnen sich durch eine sehr hohe Tenazität aus. In Abhängigkeit von Menge und Ausbringungshäufigkeit steigen die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung von Pathogenen in den betreffenden Böden und die Kontaminationsgefahr für Menschen und Tiere durch Aufnahme kontaminierter Futter- und Lebensmittel. Enterobakterien (Tyler, et al., 2008) (Schikora, et al., 2008), Clostridien (Minamisawa, et al., 2004), Mykobakterien (Conn, et al., 2004) können sowohl epi- als auch endophytisch Pflanzen kontaminieren. Das Unterbrechen dieser Infektionskreisläufe ist darum von essentieller Bedeutung. Je schneller und umfassender die Hygienisierung stattfindet, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich Pathogene im Boden anzureichern.

Dauerstadien (Zysten, Eier) von pathogenen Einzellern (Kokzidien, Gardien) und Wurmparasiten werden mit dem Kot ausgeschieden und sind in der Umwelt sehr lange überlebensfähig. Das kann 10 Monate (Kokzidien) oder bis 10 Jahre (Spulwurmeier) dauern (Thies, 2003). Mit Kot und Urin ausgeschiedene Reo-, Picorna-, Adeno- und Parvoviren sind sehr umweltresistent und können nach Ausbringung mit Mist oder Gülle Grünland, Grundwasser und Trinkwasser kontaminieren. Rotaviren können z.B. im Wasser bei niedrigen Temperaturen monatelang bis jahrelang infektiös bleiben (Walter, 2000)

Neben der mikrobiellen und parasitären Kontaminanten, werden mit Fäkalien und Urin Pharmazeutika ausgeschieden. Therapeutische Maßnahmen führen in Tierkliniken zu deren Ausscheidung oder ihrer Abbauprodukte. Diese sind dann in den Fäkalien nachweisbar. Antinfektiva-Belastungen des Bodens führen einerseits zur Selektion und Anreicherung resistenter Mikroorganismen in der Umwelt. (Urban, et al., 1950), andererseits zur Eliminierung von Bodenbakterien, die für die Aufrechterhaltung der Bodenfruchtbarkeit essentiell sind. Der Boden stellt das Habitat für zahlreiche Krankheitserreger dar. Darum ist es wesentlich, Resistentenselektionen zu minimieren. (Dantas, et al., 2008)

Das Ziel des Projektes bestand darin, durch Nutzung der milchsäuren Fermentation fäkaler Abfälle mittels Terra Preta-Technologie die in Fäkalien enthaltene Pathogene zu degradieren, enthaltene Antiinfektiva sowie die in Klinikabfällen (Mist) enthaltenen Holzspäne abzubauen. Der anaerobe Abbau von Fäkalien, Holzkohle, kohlenhydrathaltigen Materialien, Gesteinsmehl und Bentonit schafft ein Milieu, das pathogene Mikroorganismen unterdrückt und die natürlichen Antagonisten von Krankheitserregern im Wachstum begünstigt. Solche Antagonismen in der Mikrobiota wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Ernest Duchesne entdeckt (Pouillard, 2002). Austin (1989) zitiert Rosenfeld und ZoBell (1947), die mit Bakterienisolationen aus marinen Sedimenten Untersuchungen zu antimikrobiellen Aktivitäten dieser Erreger durchgeführt haben. Antagonistische Aktivitäten z. B. gegen *Bacillus anthracis* fanden Sie bei Vertretern der Gattungen *Actinomyces*, *Bacillus*, *Micrococcus* und *Serratia*, nicht bei Vertretern der Gattungen *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* oder *Vibrio*. Interessanterweise waren diese Aktivitäten unmittelbar mit den Erregern verbunden, da zellfreie Präparationen diesen Effekt nicht zeigten. Krassilnikova (1961) untersuchte eine Vielzahl (326) von Bakterienstämmen hinsichtlich ihrer antagonistischen Aktivitäten gegen *Escherichia coli*, *Mycobacterium luteum*, *Staphylococcus aureus* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie fand diese bei 7 Gram-positiven Kokken, bei 8 Gram-positiven Sporenbildnern und 12 Nichtsporenbildnern. Buck et al. (1962) (1963) und Buck und Meyers (1965) (1966) fanden bei *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* und *Vibrio* antagonistische Aktivitäten gegen die Hefen *Rhodotorula minuta* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Austin (1989) weist weiterhin darauf hin, dass Mikroorganismen aus marinen Sedimenten in der Lage sind, antivirale Substanzen zu produzieren. Ähnliche Aktivitäten wurden bei Vertretern der Gattung *Flavobacterium*, *Pseudomonas* und *Vibrio* von Katzenelson (1978) und Toranzo et al. (1982) nachgewiesen. Letztere konnten für Poliovirus Typ I, Coxsackie B-5 und ECHO-Virus 6 nach 6-7 d Einwirkzeit einen Verlust der Virusaktivität (Poliovirus) um 2-Logstufen bei 15° C und eine 3-log-Reduktion des Virustiters nach 17d feststellen. Die antivirale Aktivität ging auf *Pseudomonas spec.* und *Vibrio spec.* zurück und war in den Kulturüberständen zu finden. Baumann und De Ley (1981) sowie Okami (1986) fanden für Vertreter der Gattungen *Cytophaga* und *Flavobacterium* auch eine Antitumoraktivität, die sie bestimmten Polysacchariden zuordnen konnten.

Durch die nach der Fermentierung unter Mithilfe von Kompostwürmern durchgeführte dreimonatige Vererdung sollte ein ertragreicher anthropogener Schwarzerdeboden entstehen, auf dem Mais hohe Erträge bringt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Herstellung der Terra Preta

#### 2.1.1. Laborversuche

Für die Herstellung der Terra Preta im Labormaßstab wurden folgende Materialien verwendet:

- 3750 g Kuhdung (Kot-Urin-Gemisch vom Stallboden)
- 1400 g Gerstenschrot
- 375 g Bentonit
- 375 g Gesteinsmehl
- *140g Tria Terra Streu\** (Handelsname für Holzkohle mit Zusatz von „effektiven Mikroorganismen“)
- 115g Holzkohlegruß\*
- 67 g Sägespäne
- *0,5l EM Suspension* (EM steht für den Handelsnamen „effektive Mikroorganismen“ und ist ein Gemisch verschiedener Laktobazillen)

Die kursiv gedruckten Elemente als zusätzliche Milchsäurebakterienquellen sind in den Versuchsreihen mit der Bezeichnung OEM dampfsterilisiert worden. Mit dieser Maßnahme sollte überprüft werden, ob die milchsaure Fermentierung auch mit dem natürlichen Laktobazillenkonzentrationen der Fäkalien stattfinden kann. Die Reihen mit den zusätzlichen Quellen werden mit EM bezeichnet.

Die mit einem \* versehenen Bestandteile wurden in einigen Versuchsreihen weggelassen um den Einfluss der Holzkohle auf das System feststellen zu können. Die Reihen ohne Holzkohle bzw. Tria Terra werden mit OHK bezeichnet, die hingegen mit Holzkohle mit HK.

Somit sind für die Versuchsreihen 4 Kombinationsmöglichkeiten gegeben (je 4 Wiederholungen):

	Zusatz von:
HK/EM	mit Holzkohle und „effektive Mikroorganismen“
OHK/OEM	ohne Holzkohle und ohne „effektive Mikroorganismen“
HK/OEM	mit Holzkohle und ohne „effektive Mikroorganismen“
OHK/EM	ohne Holzkohle und mit „effektiven Mikroorganismen“

Nach der sorgfältigen Vermischung der verschiedenen Zuschlagstoffe wurden die Matrices in 1l Einweckgläser portioniert. Dabei wurde der Grund der Gläser mit Tonkügelchen aufgefüllt und mit einem Rundfilterpapier abgedeckt, um ggf. anfallendes Wasser aufzunehmen. Der Deckel wurde mit einem Gärröhrchen versehen um einer Bombagierung vorzubeugen. Die Gläser wurden dann für 8 Wochen bei 37°C bebrütet, wobei zu Beginn, nach der 3. und 8. Woche eine bakterielle Untersuchung stattfand.



Foto 1.) Fermentationen im Labormaßstab

### 2.1.2 Feldversuche

1. Ansatz: Für den Feldversuch wurde die Zusammensetzung des zu fermentierenden Materials auf Grund der Erfahrungen aus dem Laborversuch leicht verändert, das Volumen entsprechend der Größe des Versuchmaßstabes erhöht.

- 1,4 kg Bentonit
- 1,4 kg Gesteinsmehl
- 2,6 kg Holzkohlengruß\*
- 28 kg Kuhfäkalien
- 0,5kg Sägespäne
- 5,25 kg Silage
- 1,4 kg Quetschgerste
- *5l Melasse/Kanne/EM*

Pro 60l Maischefass

Der kursiv gedruckte Teil stellt auch hier die zusätzliche Laktobazillenquelle da. Anstelle der wie im Labormaßstab genutzten autoklavierten EM-Suspension wurde jedoch eine 3%ige Rohrzuckermelasse (OEM) verwendet. Diese stellt zwar die Ausgangsnährlösung für die EM Suspension dar, jedoch wurde sie nicht mit Laktobazillen angeimpft. Neben der Melassesuspension, oder der EM-Suspension wurde eine zweite Laktobazillenquelle, das „Kanne-Fermentgetreide“ getestet.

\* die Holzkohle wurde in einer Reihe (OHK) weg gelassen um ihren Einfluss auf den experimentellen Verlauf zu untersuchen.

Somit ergaben sich folgende Versuchsreihen mit je 4 Wiederholungen

- Kanne
- OEM (Melasse)
- EM
- OHK/OEM

2. Ansatz: Der Fäkalanteil wurde erhöht, so dass es folgendes Verhältnis ergab:

- 1,87 kg Bentonit

- 1,87 kg Gesteinsmehl
- 37,33 kg Kuhdung
- 1,33 kg Sägespäne
- 3,5 kg Holzkohlegruß
- 1,87 kg Quetschgerste
- *3,33l Melasse/Kanne/EM*

Pro 60l Maischefass

Der kursiv gedruckte Teil stellt auch hier die zusätzliche Laktobazillenquelle dar. Anstelle der wie im Labormaßstab genutzten autoklavierten EM Suspension wurde jedoch eine 3%ige Rohrzuckermelasse (OEM) verwendet. Diese stellt zwar die Ausgangsnährlösung für die EM Suspension dar, jedoch wurde sie nicht mit Laktobazillen angeimpft. Neben der Melassesuspension, oder der EM-Suspension wurde eine zweite Laktobazillenquelle, das „Kanne-Fermentgetreide“ getestet.

Somit ergaben sich folgende Versuchsreihen (je 3 Wiederholungen)

- K/Kanne
- K/OEM (Melasse)
- K/EM



Foto 2.) Fermentation im Feldmaßstab

Die Materialien wurden jeweils sorgfältig mit einem handelsüblichen Betonmischer gemischt und 4 Wochen in 60 l Maischefässer bei ca. 27°C fermentiert. Auch bei diesen Gefäßen wurde der Boden mit Hydroton (3kg) ausstaffiert um ggf. anfallende Flüssigkeit aufzufangen.

Nach 4 Wochen Inkubation wurden alle Ansätze des Feldversuchs aufs Feld geschüttet und locker mit Folie abgedeckt. Um die Vererdung der fermentierten Matrices zu forcieren, wurden sie eine Woche später in parzellierte 1m<sup>2</sup> Felder eingebracht. Die eingebrachte Menge betrug ca. 100 l pro Feld bei den Versuchsansätzen OEM, EM, Kanne und OHK/OEM bzw. 150 l pro Feld bei den Ansätzen K/EM, K/OEM und K/KANNE. Pro Ansatz konnten 2 bzw. 1 Feld angelegt werden. Eine weitere Woche später und nach Neutralisierung der leicht sauren Matrix mit CaOH-haltigem Gesteinsmehl wurden zusätzlich ca. 1000 Kompostwürmer pro m<sup>2</sup> (VermiGrand Naturprodukte GmbH, Absdorf Österreich) in die Matrix eingebracht. Die Zeit für die Vererdung, zwischen dem Ende der Fermentation und dem tatsächlichen bepflanzen mit je 9 Maispflanzen, betrug nahezu 10 Wochen (68 Tage). Als Kontrolle dienten 3 Felder ohne fermentierte Materialien jedoch mit (Ko+Wurm) und ohne Kompostwürmer (Ko-Wurm).



Foto 3.) Eines von 15 Versuchsfeldern zu Beginn der Vererdung

### 2.2. Mikrobiologische Untersuchungen

#### 2.2.1. Probenentnahme

Die Probenentnahmen erfolgten im Zentrum des jeweiligen Gefäßes. Bei den 1 l Gefäßen in ca. 5 cm Tiefe, bei den 60 l Gefäßen in ca. 15 cm Tiefe. Die Bodenproben wurden in einer Tiefe von 5-10 cm entnommen. Es wurden jeweils ca. 45 ml entnommen, in verschraubbare 50 ml Röhrchen (TPP) gefüllt und eingefroren. Während es sich bei den Fermentationsproben um Einzelproben handelt, handelte es sich bei den Erdproben um gepoolte Proben. Diese wurden diagonal an 3 Punkten der Versuchsfelder entnommen.

#### 2.2.2. Kulturelle mikrobiologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der unterschiedlichen bakteriologischen Parameter wurden 3g der Probe eingewogen und in 27ml PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween 80) aufgenommen und eine Stunde bei 220U/min geschüttelt. Für die quantitativen Bestimmungen wurden Verdünnungsreihen um den Faktor 10 angelegt und auf folgenden Nährböden ausplattiert und ausgezählt. Die Nachweisgrenze lag bei  $10^3/g$ :

- Columbia-Blutagar (Schafblutagar, Oxoid) zur Bestimmung der aeroben bzw. anaeroben Gesamtkeimzahl die Bebrütungszeit betrug 24 bzw. 48h
- Gassner Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner, mod., Sifin) zur Bestimmung der Enterobakterienzahl, Inkubationszeit 24 h.
- „MRS-Agar (Laktobazillen- Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe, Oxoid) zur Bestimmung der Laktobazillenzahl, Inkubationszeit 48h
- Sabouraud-Agar (Oxoid) zur Kultivierung von Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen, Inkubationszeit 72h
- CATC-Agar (Citrat- Azid- Tween- Carbonat Agar, Oxoid) zur Kultivierung von Enterokokken, Inkubationszeit 72h
- Neomycin(100mg/l, Roth) / Polymyxin B(50mg/l, Fluka) – Blut (Rind 10%ig) – Nähragar 1 (Sifin) zur Kultivierung von Clostridien, bes. *Clostridium perfringens*, Inkubationszeit 48 h

Für den Nachweis von Salmonellen wurde das Anreicherungsverfahren nach Preuss angewendet. (Tetrathionat- Kristallviolett- Anreicherungsbouillon nach Preuss, Merck) Die Diffe-

renzierung fand mittels biochemischer Methoden statt (Harnstoff- Indol- Beweglichkeitsmedium, Sifin; Eisen- Zweifachzucker- Agar nach Kligler, Sifin), sowie mittels Maldi-TOF MS.

Die Bestimmung der sporenbildenden Sulfidreduzierer (meist Clostridien), erfolgte mittels MPN-Verfahren. Dafür wurden die Proben in einer 1:10 Verdünnung bei 80°C 10 min lang zur Inaktivierung der vegetativen Bakterienformen erhitzt, 20µl davon in 96-Kavitäten Mikrotiterplatten (TPP) dreireihig 1:10 ausverdünnt und 5 Tage lang anaerob in DRCM (Clostridien-Differential-Bouillon, Sifin) bebrütet. Die Nachweisgrenze lag bei ca. >10 Sporen.

### 2.2.3. Gattungs-/ Artbestimmung mittels Maldi-TOF MS (Bruker)

#### **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (Maldi)**

Mittels Maldi-TOFs können Mikroorganismen bis auf dem Level der Gattung und Art differenziert werden. Dafür wird die Bakterienmasse in einer definierten Matrix mit einem Laser beschossen und die frei werdenden (überwiegend ribosomalen) Proteine in einem Massenspektrometer gemessen. Anhand des gemessenen Spektrums ist eine gattungs-/artspezifische Zuordnung möglich, sofern das gemessene Spektrum in der Datenbank existiert. Potentielle Leitkeime und qualitative Unterschiede in der Bakterienflora in den Fermentationsansätzen wurden mittels Maldi-TOF MS ermittelt. Dazu wurden ein oder mehrere Kolonien derselben Morphologie in 300µl Aqua dest. aufgenommen, mit 900µl reinem Ethanol versetzt. Nach dem Vortexen und Zentrifugieren der Probe wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 25µl Ameisensäure und 25µl Acetonitril versetzt, erneut gevortext und zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand auf das Maldi-Target pipettiert und vermessen.

### 2.2.4. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der FISH ist es möglich, stoffwechselaktive Mikroorganismen mit einer Oligonukleotid-Sonde, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, zu identifizieren. Die Sonden besitzen Spezifität für phylogenetische Gruppen, wie Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen und Arten. Somit können Mikroorganismen sicht-, differenzier- und zählbar gemacht werden. Die Sonde kann dabei so gewählt werden, dass sie mit spezifischen Bakterientaxa hybridisiert und somit eine Differenzierung im Originalsubstrat ermöglicht wird.

Für die Präparation der Proben wurden von den einstündig geschüttelten Probensuspensionen (Punkt 2.2.2) 250µl abgenommen, mit 750µl 4,5%igem Formalin über Nacht bei 4°C fixiert und am nächsten Tag eingefroren. 10µl davon wurden auf mit Apes (3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma) silanisierten Objektträgern aufgetragen, trocknen gelassen und 1,5h mit der Sonde hybridisiert. Bei Gram-positiven Bakterien als Sondenziel wurden die Proben vor der Hybridisierung noch 30 Minuten mit Lysozym (Merck) inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Proben mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Roth) gefärbt und mit DABCO (Diazabizyklooktan, Sigma) eingedeckelt.

Folgende Sonden(Cyt3, ThermoFisher) wurden hierbei verwendet:

- Alf1b: Alphaproteobacteria, einige Deltaproteobacteria, Spirochaetes
- BET42a: Betaproteobacteria
- Gam42a: Gammaproteobacteria
- Chis150: Clostridium histolyticum-Gruppe (Clostridium cluster I and II)
- Clit135: Clostridium lituseburense-Gruppe (Clostridium cluster XI)
- DSS658: Desulfobacteraceae
- EBAC1790: Enterobacteriaceae
- Eub- mix (Eub338; Eub785; Eub927; Eub1055; Eub1088)
- EURY498: methanogene Bakterien
- LGC354mix: Firmicutes (Gram-positive Bakterien mit niedrigem G+C -Gehalt)

Pro Probe wurden 10 Quadranten mikroskopisch ausgezählt. (Axioskop 20, Zeiss)

### 2.3. Untersuchung zum Absterbeverhalten ausgesuchter Pathogene.

Um die Hygienisierungsleistung der Terra-Preta-Technologie genauer zu untersuchen, wurden vor der milchsäuren Fermentierung, Dung-Gemische mit Krankheitserregern beimpft.

Wie in Punkt 2.1.1. beschrieben, wurden vier Matrices hergestellt, zu 27g in 50ml-Gefäße eingewogen, mit 3ml Pathogensuspension versetzt und bei 37°C fermentiert. Jeder Ansatz hatte 2 Wiederholungen

Die Suspension enthielt folgende Pathogene:

- $9,75 \cdot 10^7$  *Listeria monocytogenes* (Wildstamm)
- $5,50 \cdot 10^7$  *Staphylococcus aureus* (Wildstamm)
- $2,50 \cdot 10^7$  E.coli O:157 (Wildstamm)
- $7,25 \cdot 10^6$  *Salmonella* Anatum (Wildstamm)

Die Probenentnahme erfolgte am 3., 7., 14. und 21 Tag nach der Beimpfung. Hierbei wurden je 1,5 g aus dem Gefäß entnommen.

0,5 g der Probe wurden davon in 4,5 ml PBS aufgenommen und mit Hilfe von Verdünnungsreihen die Pathogen-Keimzahl bestimmt

Um die für die Tenazitätsuntersuchungen vorgesehenen Erreger besser von der Begleitflora abgrenzen zu können, wurden gegen Rifampicin und Streptomycin resistente Mutanten selektiert (Linde, 1981) (1990) Standard-Glukose-Nähragar 1 wurde mit Rifampicin (300mg/l Eremfat, Fatol) und Streptomycinsulfat (400mg/l Roth) zur selektiven Anzucht dieser Erreger substituiert. In einem weiteren Experiment wurde *Salmonella* Senftenberg ((DSMZ No. 10062) als Testkeim verwendet, da diese *Salmonella*-Serovar in der Species *Salmonella enterica* subsp. *enterica* die höchste Tenazität besitzt. Der Nachweis erfolgte mittels Gassner Agar (Sifin), die Anreicherung mittels Preuss-Medium (Sifin).

Die Menge von 1g Matrix wurde in die Preuss - Bouillon eingewogen, für 24h bei 37°C inkubiert und auf dem Gassner-Agar sowie Kaufmann – Agar (Brilliantgrün Phenolrot-Agar nach EP/USP, Sifin) ausgestrichen. Eine zweite Anreicherung erfolgte erneut in Preuss-Medium.

#### 2.4. Untersuchung zur Tenazität des Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan Viruses. (ECBO)

Tenazitätsuntersuchungen an Viren wurden beispielhaft mit den besonders widerstandsfähigen ECBO-Viren (Wildstamm) durchgeführt. 1 cm<sup>2</sup> große Lindenholzkeimträger wurden dafür mit der Virensuspension mit 100µl Virensuspension beimpft, inkubiert und in die Fermentationsmartrices (siehe 2.1.1.) gegeben. Dabei wurden die Varianten ohne Holzkohle weggelassen. Wie oben wurden je 27g in zehn 50 ml-Tubes des Gemisches eingewogen, darauf wurden jeweils 3 Keimträgerplättchen in das Gemisch eingebracht und unter Zugabe von

3ml PBS gevortext und anaerob bei 37°C fermentiert. Am 0., 3., 7., 14., und 21. Tag wurde ein Röhrchen je Reihe entnommen und die 3 Keimträgerplättchen daraus entnommen. Die Keimträger wurden darauf bei -80°C eingefroren und am Institut für Virologie der veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig untersucht. Mit Hilfe von Ultraschallwellen wurden die Viruspartikel vom Träger getrennt, steril filtriert und die Viruskonzentration mittels FKL-Zellen (fetale Kälberlungenzellen) bestimmt.

### 2.5. Untersuchung der Tenazität von *Ascaris suum* (Wildtyp) – Dauerstadien

Die Spulwurmeier von *Ascaris suum* gelten als besonders widerstandsfähig gegenüber chemische oder biochemische Zersetzungen. Als übliche Testorganismen für Desinfektionsmittel wurden sie in diesem Experiment auch in die Dung-Matrix (siehe. 2.1.1. beide Varianten mit Holzkohle) zur Fermentation eingebracht. Pro 27g in einem 50 ml-Röhrchen wurden 3ml Eissuspension hinzu gegeben und bei 37 °C anaerob fermentiert. Die Endkonzentration in der Matrix betrug ca. 7800 Eier / Gramm.

Pro Zeitschritt 0., 1., 2., 3. und 8. Woche wurden 2 Wiederholungen pro Variante (EM bzw. OEM) heraus genommen und dem parasitologischen Institut der veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig zur Untersuchung übergeben. Dort wurden die Eier isoliert und auf die Fähigkeit zur Embryonierung untersucht

### 2.6. Untersuchung zum Abbau des Antiinfektivums Sulfadiazin (Sulfonamid)

Um den Abbau von Sulfadiazin (Vetranal, Sigma-Aldrich) in der Dungmatrix zu untersuchen wurde sie wie in 2.1.1 beschrieben hergestellt (beide Varianten mit Holzkohle) und zu 27g in 50 ml Röhrchen (TPP) eingewogen. Dazu wurden 3 ml Sulfadiazinlösung gegeben, so dass die Endkonzentration bei 10mg/kg lag. Die Röhrchen wurden anaerob bei 37°C bebrütet und nach 7, 14 und 21 Tagen je Variante drei Röhrchen entnommen und eingefroren (-18°C). Nach Abschluss dieser Versuchsreihe, wurden die Proben gefroren zum Institut für Lebensmitteltoxikologie (Prof. Dr. Hamscher Hannover) geschickt und dort mit Hilfe einer HPLC in Kombination mit einem Massenspektrometer analysiert. (Hamscher, et al., 2004)

### 2.7. Bestimmung des Reifegrades der fermentierten Dung-Matrix

Die Bestimmung des Reifegrades erfolgte auf der Basis von drei verschiedenen Methoden

### 2.7.1. Olfaktorische Bestimmung – elektronische Nase:

Für diese Messung wurde eine elektronische Nase (PEN3 Airsense) verwendet. Die elektronische Nase misst elektrische Widerstandsänderungen, die auftreten, wenn verschiedene Gasbestandteile an der Halbleitersensorik vorbeiströmen. Gemessen wurden die Ansätze der Feldversuche vor der Fermentation, nach der Fermentation und nach der Vererdung. Dafür wurden die Proben der verschiedenen Wiederholungen gepoolt. Pro Ansatz wurden je nach Anzahl der Wiederholungen ca. 1-3 g entnommen, in ein 50 ml-Röhrchen gefüllt und eingefroren. Nach dem Auftauen wurde dann in Zusammenarbeit mit der GMBU Halle je eine Probe der Gasphase aus den 50 ml-Gefäßen entnommen und vorverdünnt. Dafür wurden die Deckel mit einer Kanüle durchstoßen und mit einer Spritze 1ml des Gases entnommen. Dies wurde dann in 12ml Headspace-Gläschen mit Septum gegeben und von dort aus gemessen. Dabei betrug der Kammerfluss 100ml/min und jeder Messung ging eine 100 Sekunden andauernde Spülung mit Aktiv-Kohle gefilterter Umgebungsluft voraus. Die Auswertung erfolgte mittels einer Hauptkomponentenanalyse (PCA).

### 2.7.2. Gärsäuren-, Laktat und Alkoholbestimmung

Um den Erfolg der Fermentation bewerten zu können wurden folgende Parameter im Labor für Veterinärdiagnostik und Umwelthygiene GmbH Leipzig-Holzhausen, BioCheck untersucht:

- Essigsäure
- Propionsäure
- i-Buttersäure
- n- Buttersäure
- i- Valeriansäure
- n- Valeriansäure
- n- Capronsäure
- Ethanol
- Propanol
- Butanol
- 2,3 Butandiol
- 1,2 Propandiol
- Milchsäure

Die Probenmenge der gepoolten Proben entsprach ca. 400g.

### 2.7.3. pH-Wert- Messung

Für die Einschätzung des Fermentationsfortschrittes wurde eine pH-Bestimmung nach der DIN ISO 10390 durchgeführt. Für die Suspension wurden eine 1M KCl- Lösung verwendet, in die 5ml des Fermentationsproduktes gegeben wurden. Die Mischung wurde eine Stunde geschüttelt und dann mit dem pH-Meter (Geisinger electronic GPH14 gemessen) gemessen. Zur Eichung wurden 3 Eichlösungen verwendet. (Hanna Instruments HI 7004, HI 7007, HI 7010)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bakteriologische Untersuchungen

##### 3.1.1. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Labormaßstab

In Abbildung 1 ist der Verlauf der mesophilen Keimflora während der Fermentation im Labormaßstab dargestellt. Die Keimzahlen sind im dekadischen Logarithmus angegeben.

In Abb.1a.) besitzt der Versuchsansatz HK/OEM zum Startzeitpunkt mit 8,85 log KbE/g die höchste mesophile, aerobe Keimdichte, die anderen Versuchsreihen OHK/OEM, OHK/EM, HK/EM, liegen mit 8,08 log KbE/g; 8,19 log KbE/g und 8,04 log KbE/g, auf einem sehr ähnlichen Niveau.

Nach 3 Wochen ist die mittlere aerobe Gesamtkeimzahl bei allen Versuchsreihen auf ähnlichem, jedoch weitaus niedrigerem Niveau, wie 5,31 log KbE/g beim Versuchsansatz HK/OEM; 5,10 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM; 5,22 log KbE/g beim Ansatz OHK/EM und 5,24 log KbE/g beim Ansatz HK/EM.

Nach 8 Wochen zeigt sich ein fast identisches Bild, die Werte liegen auf gleich niedrigem Niveau von 5,00 log KbE/g wie 5 Wochen zuvor und sind sich sehr ähnlich. 4,89 log KbE/g bei HK/OEM; 5,18 log KbE/g bei OHK/OEM; 5,25 bei log KbE/g OHK/EM und 5,11 log KbE/g bei HK/EM.

In Abb.1b.) besitzt der Versuchsansatz HK/OEM zum Startzeitpunkt mit 8,74 log KbE/g die höchste mesophile, anaerobe Keimdichte, gefolgt von OHK/OEM mit einer Keimdichte von 8,57 log KbE/g OHK/EM, HK/EM, liegen mit 8,19 log KbE/g und 8,04 log KbE/g auf einem sehr ähnlichen Niveau.

Nach 3 Wochen liegt die mittlere anaerobe Gesamtkeimzahl bei allen Versuchsreihen auf weitaus niedrigeren Niveau, wie 5,21 log KbE/g bei HK/OEM; 5,10 log KbE/g bei OHK/OEM; 5,22 log KbE/g bei OHK/EM und 4,85 log KbE/g bei HK/EM. Nach 8 Wochen zeigt sich ein ähnliches Bild, die Werte liegen jedoch auf etwas niedrigerem Niveau wie 5 Wochen zuvor: 4,93 log KbE/g fermentiert beim Versuchsansatz HK/OEM; 4,99 log KbE/g fermentiert beim Ansatz OHK/OEM; 5,07 log KbE/g beim Ansatz OHK/EM und 4,73 log KbE/g bei HK/EM.

In Abb.1c.) besitzt der Versuchsansatz OHK/OEM mit 6,60 log KbE/g die höchste mesophile, gramnegative Keimkonzentration gefolgt von HK/OEM mit 6,38 log KbE/g und OHK/EM

mit 6,00 log KbE/g. HK/EM besitzt mit 5,62 log KbE/g die geringste gramnegative Keimdichte. Nach 3 Wochen bzw. 8 Wochen Fermentation sank die mesophile gramnegative Keimflora bei allen Proben unter die Nachweisgrenze von 3,00 log KbE/g. Auch im Direktausstrich konnte keine Koloniebildende Einheit nachgewiesen werden.

In Abb.1d.) besitzt der Versuchsansatz OHK/OEM zum Startzeitpunkt mit 6,30 log KbE/g die höchste Enterokokkendichte, gefolgt von OHK/EM mit einer Keimdichte von 5,95 log KbE/g, sowie HK/OEM mit 5,88 log KbE/g und HK/EM mit 5,85 log KbE/g. Nach 3 Wochen bzw. 8 Wochen Fermentation sank die Zahl der Enterokokken bei allen Proben unter die Nachweisgrenze von 3,00 log KbE/g. Auch im Direktausstrich konnte keine Koloniebildende Einheit nachgewiesen werden.

In Abb. 1e.) besitzt der Versuchsansatz OHK/OEM zum Startzeitpunkt mit 7,82 log KbE/g die höchste Konzentration an Laktobazillen, gefolgt von HK/OEM mit einer Keimdichte von 7,68 log KbE/g, sowie HK/EM mit 7,51 log KbE/g und OHK/EM mit 7,47 log KbE/g. Nach 3 Wochen Fermentation sank die mittlere Zahl der Laktobazillen auf 5,27 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM; 4,69 log KbE/g bei HK/OEM; 3,64 log KbE/g beim Ansatz HK/EM und 4,01 log KbE/g beim Ansatz OHK/EM. Nach weiteren 5 und insgesamt 8 Wochen Fermentation beträgt die Zahl der Laktobazillen bei dem Versuchsansatz OHK/OEM unter 3 log KbE/g; 4,42 log KbE/g beim Ansatz HK/OEM; 4,20 log KbE/g beim Ansatz HK/EM und 4,42 log KbE/g bei OHK/EM.

In Abb.1f.) besitzt der Versuchsansatz HK/OEM zum Startzeitpunkt mit 5,77 log KbE/g die höchste Dichte an mesophilen Hefe- Schimmel- und Schwärzepilze, gefolgt von dem Ansatz HK/EM mit 5,46 log KbE/g, OHK/EM mit 4,33 log KbE/g und OHK/OEM mit 4,06 log KbE/g. Nach 3 Wochen bzw. 8 Wochen Fermentation sank die Zahl der mesophilen Hefe- Schimmel- und Schwärzepilze, bei allen Proben unter die Nachweisgrenze von 3,00 log KbE/g. Auch im Direktausstrich konnte keine Erreger nachgewiesen werden.

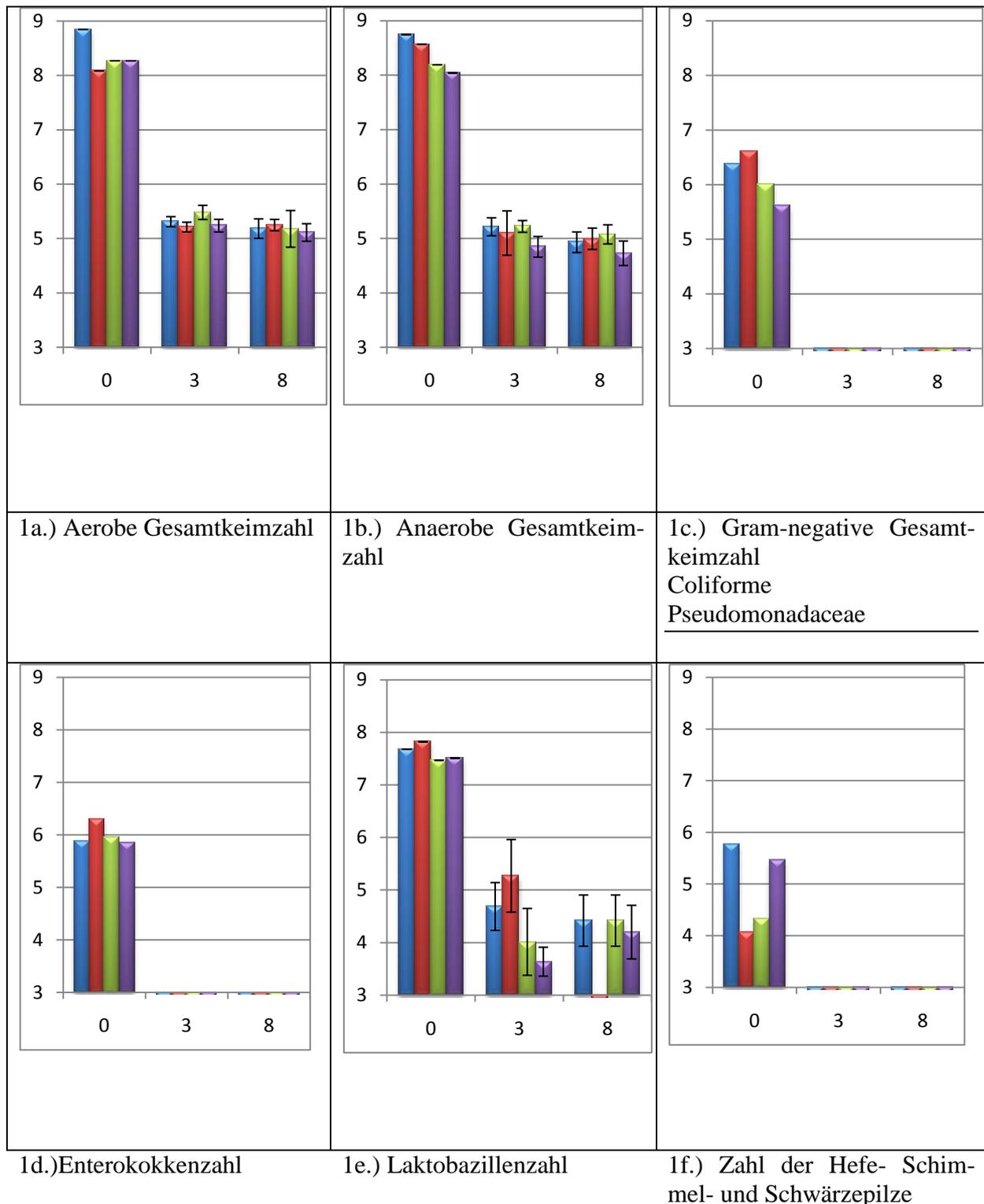


Abb. 1. Verlauf der mesophilen Keimflora während der Fermentation im Laborversuch, Keimzahlangabe im dekadischen Logarithmus

Angabe Ordinate:  $\log$  KbE/g (Kolonie bildende Einheiten) der jeweiligen Gruppe

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Wochen

Fehlerindikatoren: Standardabweichung

Balken-Beschriftung von links nach rechts:

1. Blau: mit Holzkohle ohne „effektive Mikroorganismen“ (HK/OEM)
2. Rot: ohne Holzkohle ohne „effektive Mikroorganismen“ (OHK/OEM)
3. Grün: ohne Holzkohle mit „effektive Mikroorganismen“ (OHK/EM)
4. Lila: mit Holzkohle mit „effektive Mikroorganismen“ (HK/EM)

## 3.1.2. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Feldversuch

Abb.2a. stellt die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl im Verlauf der Zeit dar. So wurde bei dem Versuchsansatz EM zum Startzeitpunkt eine mittlere Keimzahl von 7,89 log KbE/g gezählt, beim Ansatz K/EM 7,73 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 8,08 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 7,84 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 6,94 log KbE/g, beim Ansatz OEM 7,32 log KbE/g sowie 7,44 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM. Nach vier Wochen Fermentation lag die Gesamtkeimzahl im Mittel signifikant niedriger (t-Wert = 11,237 p-Wert = 0,00), so bei dem Ansatz EM bei 5,19 log KbE/g, beim Ansatz K/EM bei 4,90 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE bei 5,09 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM bei 5,40 log KbE/g, beim Ansatz Kanne 5,60 log KbE/g, beim Ansatz OEM und auch mit 5,61 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM.

Im Zuge des Vererdungsprozesses stieg die Keimkonzentration nach 10 Wochen wieder stark an. So betrug die Keimzahl der Poolprobe der Felder EM 8,00 log KbE/g, des Feldes K/EM 8,19 log KbE/g, des Feldes K/KANNE 8,31 log KbE/g, des Feldes K/OEM 8,18 log KbE/g, der Felder KANNE 8,37 log KbE/g, der Felder OEM 8,00 log KbE/g und der Felder OHK/OEM 7,85 log KbE/g. Die Keimzahlen der Kontrollfelder betragen zu diesem Zeitpunkt 6,93 log KbE/g der Felder Ko+Wurm und die des Feldes Ko-Wurm lediglich 5,00 log KbE/g,

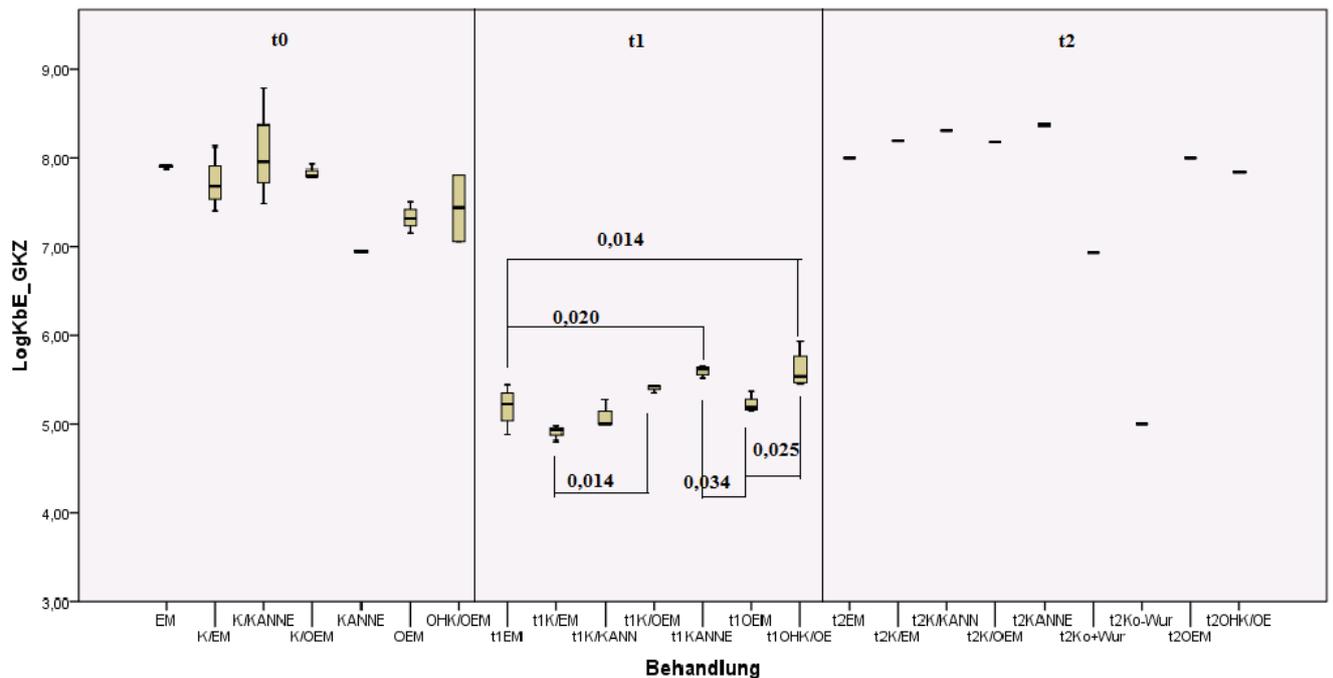


Abb. 2a.) Dynamik der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen im Feldversuch:

Ordinate: in log KbE/g (Kolonie bildende Einheiten)

Abszisse: Name des Versuchsansatzes  
 ohne weitere Angabe entspricht dem Startzeitpunkt  
 t1 entspricht der KbE/g nach 4 Wochen Fermentation  
 t2 entspricht der KbE/g nach 10 Wochen Vererdung

Klammern: Signifikante Unterschiede, (ANOVA, Posthoc Turkey HSD)  
 [Unterschiede zwischen Ansätzen mit erhöhtem Fäkalanteil und nicht erhöhten Fäkalanteil sind nicht dargestellt]

- OEM : Ansatz mit Holzkohle ohne „effektive Mikroorganismen“  
 OHK/OEM: Ansatz ohne Holzkohle ohne „effektive Mikroorganismen“  
 EM: Ansatz mit Holzkohle mit „effektive Mikroorganismen“  
 KANNE: Ansatz mit Holzkohle mit „Kanne Fermentgetreide“  
 K/EM: Ansatz höherer Fäkalanteil mit „effektive Mikroorganismen“  
 K/KANNE: Ansatz höherer Fäkalanteil mit „Kanne Fermentgetreide“  
 K/OEM: Ansatz höherer Fäkalanteil ohne „effektive Mikroorganismen“  
 Ko-Wurm: Kontrollfeld ohne Kompostwürmer  
 Ko+Wurm: Kontrollfeld mit Kompostwürmern

Abb.2b.) stellt die anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl im Verlaufe der Zeit dar. So wurde bei dem Versuchsansatz EM zum Startzeitpunkt eine mittlere Keimzahl von 7,72 log KbE/g gezählt, beim Ansatz K/EM 7,83 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 7,28 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 7,75 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 6,90 log KbE/g, beim Ansatz OEM 7,49 log KbE/g und 7,72 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM. Innerhalb der 4 Wochen Fermentation sank die Konzentration der anaeroben mesophilen Gesamtkeimzahl stark ab ( $t$ -Wert = 23,281  $p$ -Wert = 0,00). Sie betrug beim Versuchsansatz EM 5,05 log KbE/g, beim Ansatz K/EM 4,92 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 4,91 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 5,38 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 5,54 log KbE/g, beim Ansatz OEM 5,19 log KbE/g und beim Ansatz OHK/OEM 5,21 log KbE/g.

Im Zuge des Vererdungsprozesses stieg die Keimkonzentration nach 10 Wochen wieder stark an. So betrug die Keimzahl der Poolproben der Felder EM 7,85 log KbE/g, des Feldes K/EM 8,48 log KbE/g, des Feldes K/KANNE 8,10 log KbE/g, des Feldes K/OEM 7,85 log KbE/g, der Felder KANNE 7,85 log KbE/g, der Felder OEM 8,29 log KbE/g und 8,29 log KbE/g der Felder OHK/OEM. Die Keimzahlen der Kontrollfelder Ko+Wurm betrug 6,30 log KbE/g und der Felder Ko-Wurm lediglich 5,60 log KbE/g.

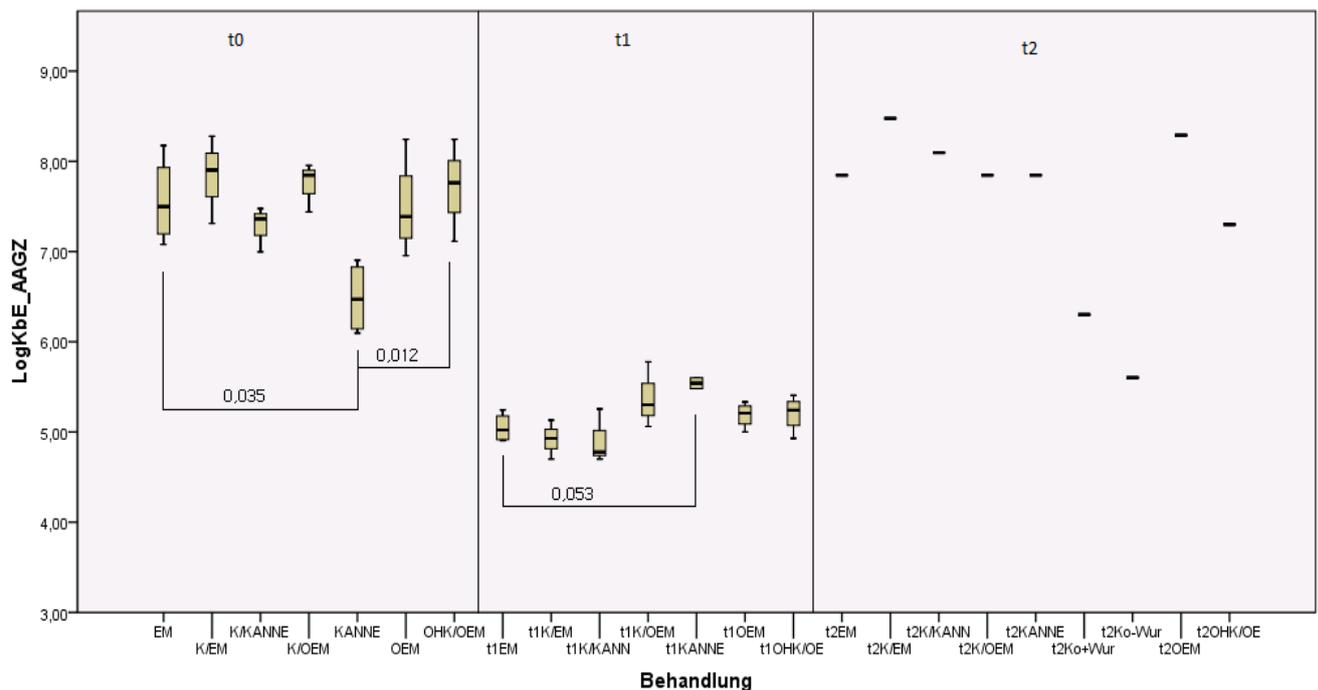


Abb. 2b.) Dynamik der anaeroben mesophilen Gesamtkeimzahlen im Feldversuch  
Legende wie oben, siehe Abb.2a.)

Abb.2c.) stellt die Gram-negative, mesophile, aerobe Gesamtkeimzahl, sowie die Coliformen und Pseudomonadaceae im Verlaufe der Zeit dar. So wurde bei dem Versuchsansatz EM zum Startzeitpunkt eine mittlere Keimzahl von 4,69 log KbE/g gezählt, sowie beim Ansatz K/EM 5,48 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 5,23 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 5,03 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 4,83 log KbE/g, beim Ansatz OEM 4,93 log KbE/g, und 5,27 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM. Nach 4 Wochen Fermentation lag die Konzentration in allen Gefäßen unter der Nachweisgrenze ( $t$ -Wert = 22,656  $p$ -Wert = 0,00), auch im Direktausstrich konnten keine gramnegativen Bakterien festgestellt werden. Nach der Vererdung hingegen stieg die Gram-negative Keimzahl wieder stark an. Sie lag beim Ansatz EM bei 5,90 log KbE/g, beim Ansatz K/EM bei 5,62 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE bei 5,78 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM bei 4,48 log KbE/g, beim Ansatz KANNE bei 6,08 log KbE/g, beim Ansatz OEM bei 5,83 log KbE/g und bei 5,75 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM. Die gramnegative Keimzahl der Böden der Kontrollfelder Ko+Wurm und Ko-Wurm lag unter der Nachweisgrenze.

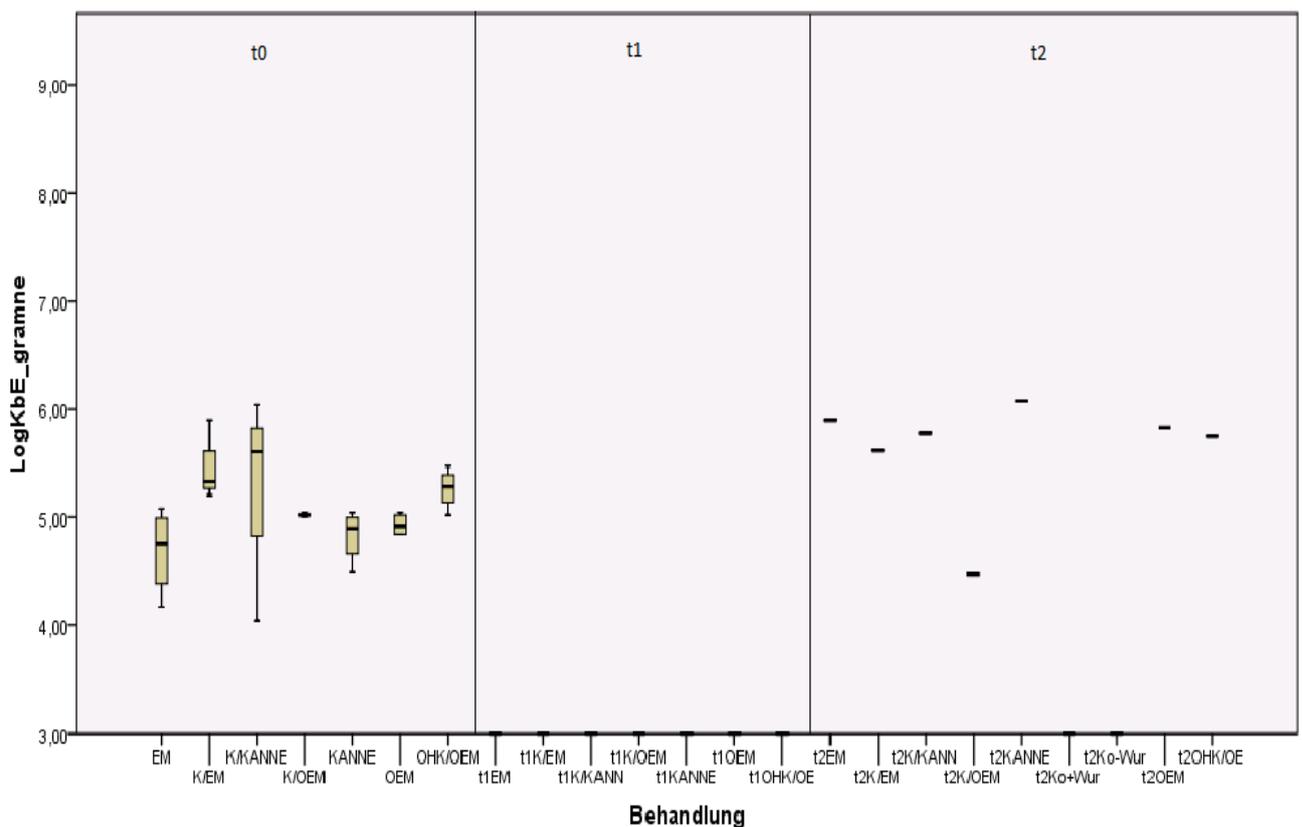


Abb. 2c.) Dynamik der Gram-negativen, mesophilen, aeroben Gesamtkeimzahlen, von Coliformen, Pseudomonadaceae im Feldversuch  
Legende wie oben, siehe Abb.2a.)

Abb.2d.) stellt die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten der Enterokokken im Verlaufe der Zeit dar. So wurde bei dem Versuchsansatz EM zum Startzeitpunkt eine mittlere Enterokokkenzahl von 4,71 log KbE/g gezählt, sowie beim Ansatz K/EM 5,45 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 6,23 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 5,48 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 4,88 log KbE/g, beim Ansatz OEM 5,02 log KbE/g und beim Ansatz OHK/OEM 5,62 log KbE/g. Nach vier Wochen Fermentation lag die Enterokokkenkonzentration unter der Nachweisgrenze (t-Wert = 20,479 p-Wert = 0,00). 10 Wochen später lag die Enterokokkenzahl der gepoolten Proben zum Teil wieder höher und so konnte für den Ansatz EM eine mittlere Enterokokkenzahl von 3,48 log KbE/g gezählt werden, sowie für den Ansatz K/EM 3,70 log KbE/g, für den Ansatz K/OEM 3,90 log KbE/g, für den Ansatz KANNE 3,48 log KbE/g sowie 5,20 log KbE/g für den Ansatz OEM. Kein Nachweis von Enterokokken in einer Konzentration von  $10^3$  oder höher konnten hingegen in den Ansätzen K/KANNE, Ko+Wurm, Ko-Wurm sowie OHK/OEM erfolgen.

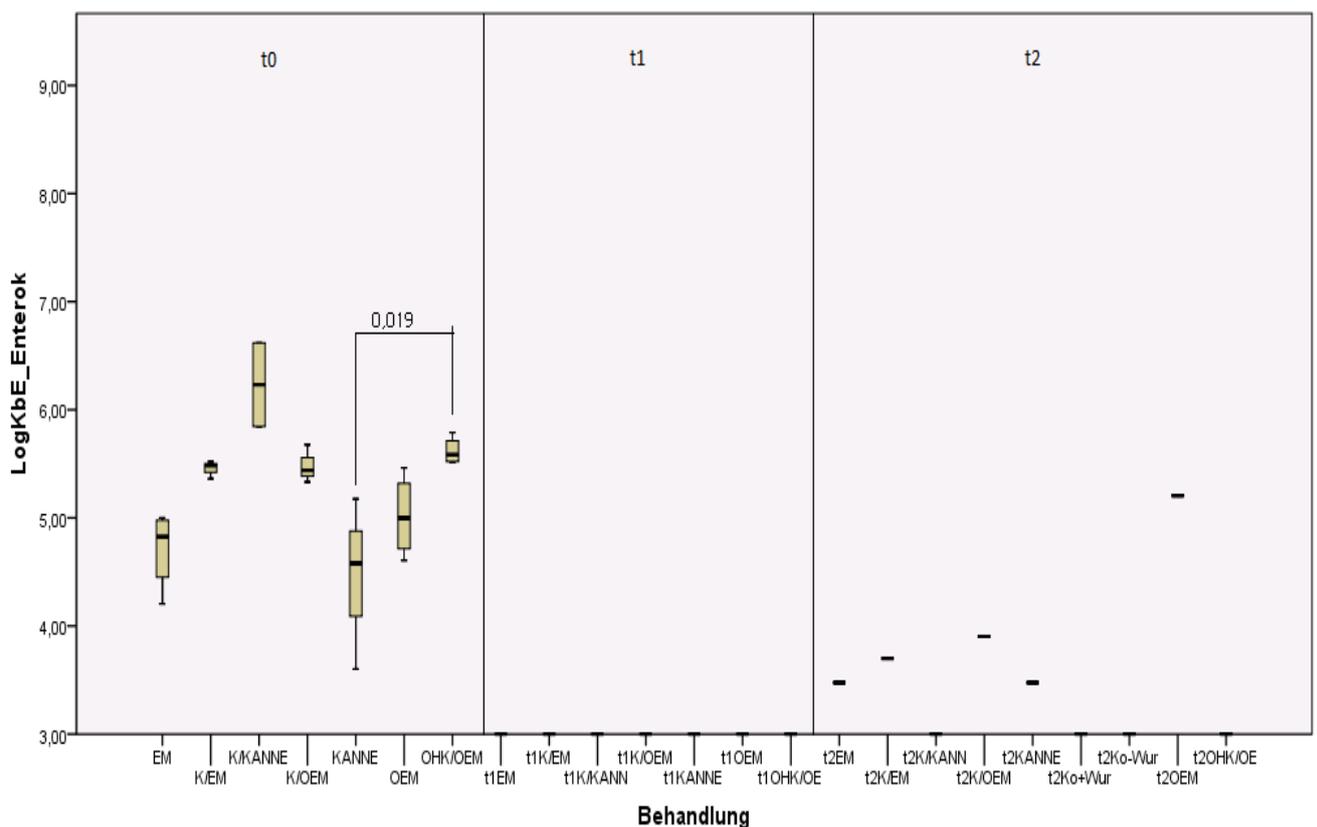


Abb. 2d.) Dynamik der Enterokokkenzahlen im Feldversuch  
Legende wie oben, siehe Abb.2a.)

In Abb.2e.) ist die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten der Laktobazillen im Verlaufe der Zeit dargestellt. So wurde bei dem Versuchsansatz EM zum Startzeitpunkt die höchste mittlere Konzentration von 7,89 log KbE/g gezählt, beim Ansatz K/EM waren es 6,46 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 6,92 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 6,37 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 6,73 log KbE/g, beim Ansatz OEM 7,11 log KbE/g sowie 6,61 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM.

Nach 4 Wochen Fermentation sank die mittlere Konzentration der Laktobazillen in alle Ansätzen (t-Wert = 13,279 p-Wert = 0,00) auf 4,79 log KbE/g beim Ansatz EM, auf 3,69 log KbE/g beim Ansatz K/EM, auf 3,24 log KbE/g beim Ansatz K/KANNE, auf 4,14 log KbE/g beim Ansatz K/OEM, auf 4,19 log KbE/g beim Ansatz KANNE, auf 4,68 log KbE/g beim Ansatz OEM und beim Ansatz OHK/OEM auf 4,44 log KbE/g.

10 Wochen später, nach der Vererdung liegen die Werte der Poolproben über denen der Fermentation. So betrug die Laktobazillenzahl bei dem Versuchsansatz EM 5,16 log KbE/g, beim Ansatz K/EM 5,42 log KbE/g, beim Ansatz K/Kanne 5,53 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 5,88 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 6,19 log KbE/g, beim Ansatz OEM 7,35 log KbE/g und 6,13 log KbE/g beim Ansatz OHK/OEM. Die Konzentrationen der Laktobazillen der Kontrollfelder betragen 4,41 log KbE/g bei den Feldern Ko+Wurm und 4,08 log KbE/g bei dem Feld Ko-Wurm.

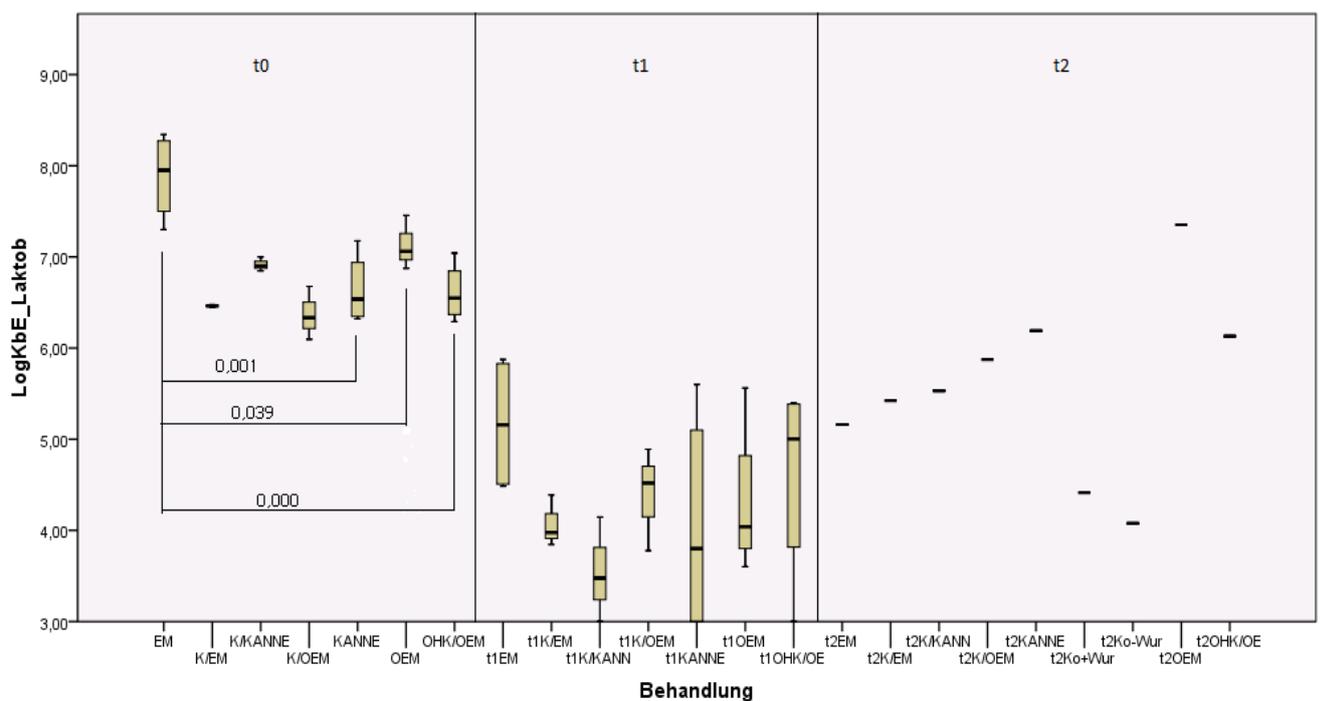


Abb. 2e.) Dynamik der Laktobazillenzahlen im Feldversuch  
Legende wie oben, siehe Abb.2a.)

In Abb. 2f.) ist die Veränderung der Hefe- Schimmel- und Schwärzepilzkonzentrationen im Verlaufe der Zeit dargestellt. Vor der Fermentation beträgt die Konzentration der Pilze beim Versuchsansatz EM 6,77 log KbE/g, beim Ansatz K/EM 4,21 log KbE/g, beim Ansatz K/KANNE 4,25 log KbE/g, beim Ansatz K/OEM 4,27 log KbE/g, beim Ansatz KANNE 6,56 log KbE/g, beim Ansatz OEM 6,67 log KbE/g und 5,81 log KbE/g bei OHK/OEM. Nach 4 Wochen Fermentation sind keine Pilze über  $10^3$  KbE/g nachweisbar. (t-Wert = 12,109 p-Wert = 0,00)

10 Wochen später, nach dem Vererdungsprozess besitzen die Proben der Felder K/KANNE mit 3,30 log KbE/g, die Felder K/OEM mit 3,60 log KbE/g, die Felder KANNE mit 3,70 log KbE/g, die Felder OEM mit 3,48 log KbE/g und die Felder OHK/OEM mit ebenso 3,48 log KbE/g, eine Keimzahl die über der Nachweisgrenze liegt. Die weiteren Versuchsfelder, EM, K/EM und Kontrollfelder, Ko+Wurm sowie K-Wurm besitzen eine Pilzkonzentration, die unter der Nachweisgrenze liegt.

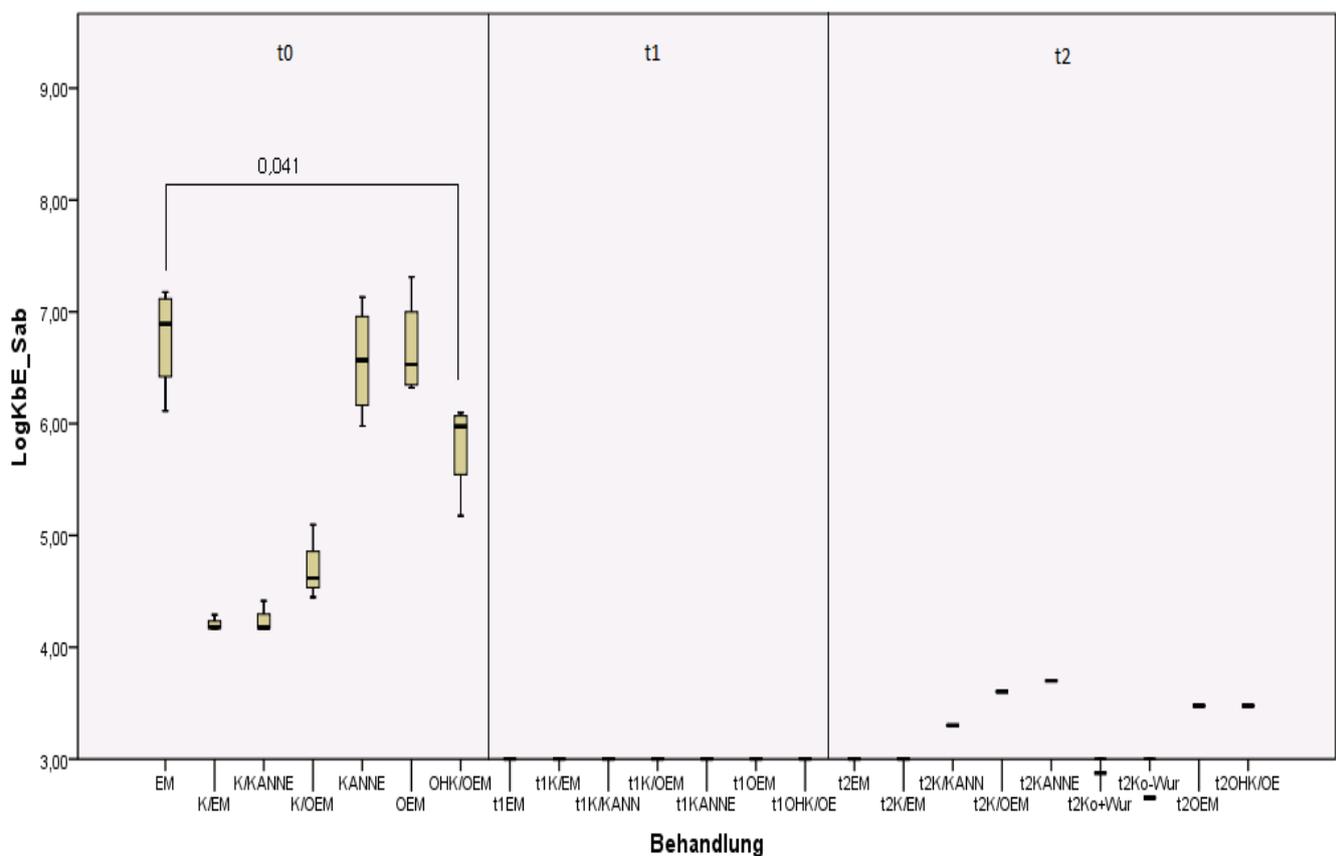


Abb. 2f.) Dynamik der Hefe- Schimmel- und Schwärzepilzkeimzahlen im Feldversuch  
Legende wie oben, siehe Abb.2a.)

In Abb. 2g.) ist die Veränderung der Clostridienzahl im Verlaufe der Zeit dargestellt. Vor und nach der Fermentation liegt die Konzentration der Clostridien unter  $10^3$  KbE/g. Nach Abschluss der Fermentation im Zuge der 10-wöchigen Vererdung stieg die Clostridienzahl jedoch stark an. So konnte in den Bodenproben der Felder EM eine Konzentration von 5,98 log KbE/g nachgewiesen werden, in den Feldern K/EM 5,93 log KbE/g, in den Feldern K/KANNE 6,40 log KbE/g, in den Feldern K/OEM 6,57 log KbE/g, in den Feldern KANNE 6,93 log KbE/g, in den Feldern OEM 4,98 log KbE/g und 5,98 log KbE/g in den Feldern von dem Ansatz OHK/OEM.

In den Kontrollfeldern konnte keine Clostridienkonzentration über der Nachweisgrenze bestimmt werden.

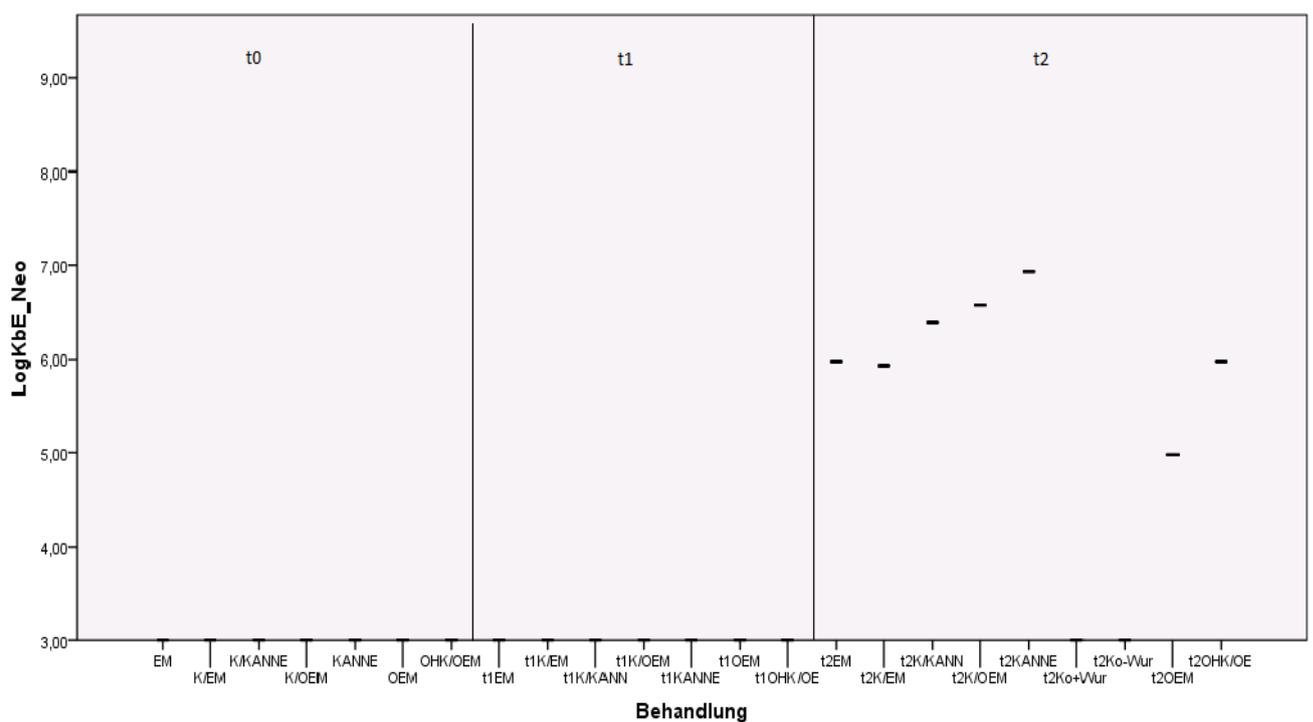


Abb. 2g.) Dynamik mesophiler Clostridienkeimzahlen im Feldversuch  
Legende wie oben, siehe Abb.2a.)

Abb. 2h.) stellt die Keimzahl der sulfidreduzierenden Clostridien im Zeitverlauf dar. Vor der Fermentation beträgt die mittlere Keimzahl des Versuchsansatzes EM 2,21 log Keime/g, des Ansatzes K/EM 1,53 log Keime/g, des Ansatzes K/KANNE 1,69 log Keime/g, des Ansatzes K/OEM 1,31 log Keime/g, des Ansatzes KANNE 1,86 log Keime/g, des Ansatzes OEM 2,11 log Keime/g und 2,33 log Keime/g des Ansatzes OHK/OEM.

Nach der Fermentation beträgt die mittlere Keimdichte bei dem Versuchsansatz EM 2,73 log Keime/g, bei dem Ansatz K/EM 0,62 log Keime/g, bei dem Ansatz K/KANNE 1,07 log Keime/g, bei dem Ansatz K/OEM 1,75 log Keime/g, bei dem Ansatz KANNE 2,55 log Keime/g, bei dem Ansatz OEM 1,13 log Keime/g sowie 2,69 log Keime/g bei dem Ansatz OHK/OEM. Die Unterschiede zum Startzeitpunkt der Fermentation waren nicht signifikant.

Nach Abschluss der Vererdung war die gemessene Keimdichte deutlich erhöht. So betrug sie beim Ansatz EM 6,18 log Keime/g, beim Ansatz K/EM 6,65 log Keime/g, beim Ansatz K/KANNE 8,40 log Keime/g, beim Ansatz K/OEM 7,98 log Keime/g, beim Ansatz KANNE 5,98 log Keime/g, beim Ansatz OEM 6,98 log Keime/g und 5,98 log Keime/g beim Ansatz OHK/OEM. Bei den Kontrollfeldern mit und ohne Kompostwürmer konnten Konzentration von 2,85 log Keime/g sowie 2,65 log Keime/g gezählt werden.

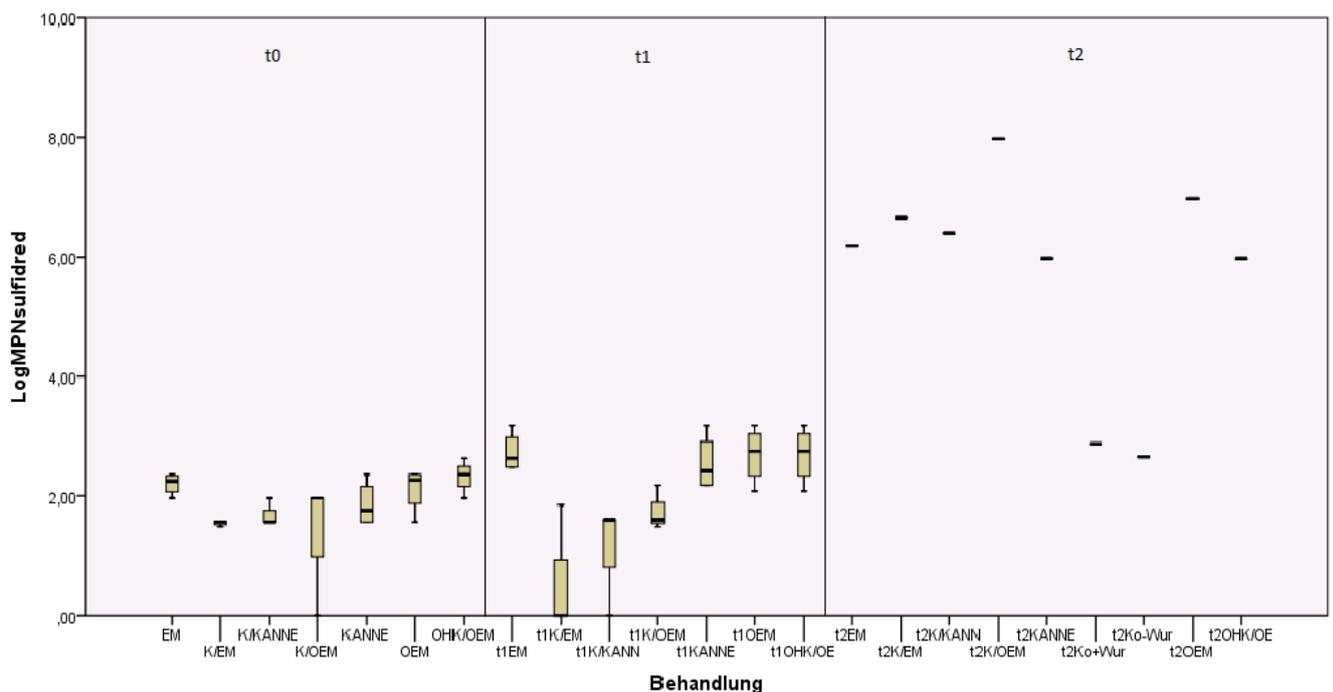


Abb. 2h.) Dynamik sulfidreduzierender Clostridien im Feldversuch

Ordinate: in log Keime/g (Kolonie bildende Einheiten)  
 Abszisse: Name des Versuchsansatzes  
 ohne weitere Angabe entspricht dem Startzeitpunkt  
 t1 entspricht der MPN/g nach 4 Wochen Fermentation  
 t2 entspricht der MPN/g nach 10 Wochen Vererdung

## 3.1.2.1. Qualitativen Keimfloraveränderungen im Feldversuch

In Tabelle 1 sind ausgewählte Bakterienspezies aufgelistet und deren qualitativer Nachweis zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Legende:

- (+) wahrscheinliche Gattungsidentifikation
- (++) sichere Gattungs-, wahrscheinliche Speziesidentifikation
- (+++) höchstwahrscheinliche Speziesidentifikation

Kein Fund in irgendeiner Wiederholung irgendeiner Versuchsreihe
Funde in Wiederholungen einer Versuchsreihe, Funde in unterschiedlichen Versuchsreihen
Funde in allen Wiederholungen aller Versuchsreihen

Die Kontrollfelder (Ko+Wurm bzw. Ko-Wurm) werden nicht in der Farbgebung berücksichtigt, da sie unabhängig von dem Hygienisierungsvorgang waren. Negative oder positive Befunde sind daher nur der Vollständigkeit halber vermerkt. *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus sciuri*, *E. coli*, *Pantoea agglomerans*, *Kluyvermyces marxianus*, *Issatchenkia orientalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Kluyvermyces marxianus* waren nur in den Materialien vor der Fermentation nachzuweisen. Keime, die initial im Fermentationsgut vorhanden waren und die Fermentation überstanden bzw. sich dabei in allen Ansätzen vermehrt hatten waren *Lysinibacillus fusiformis* und *B. licheniformis*. Nach der Fermentation setzte sich in der Mehrzahl der untersuchten Ansätze *Paenibacillus lactis* durch, der initial nicht nachgewiesen wurde, was für Konzentrationen < 1000 Keime/g spricht. Nach der Vererdung dominierte *Lysinibacillus fusiformis*, der initial und nach der Fermentation nur in einigen Ansätzen festzustellen war. *E. coli* und *Serratia marcescens*, *Clostridium tertium* und *Lactobacillus coryniformis* waren nur in den vererdeten Proben nachzuweisen.

Tab. 1.) Nachweis ausgewählter Bakterienspezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten

	Vor der Fermentation	Nach der Fermentation	Nach der Vererdung
Bakterienart	Gefunden in	Gefunden in	Gefunden in
<i>Aerococcus viridans</i> (+)	In allen Proben	In keiner Probe	In keiner Probe
<i>Staphylococcus sciuri</i> (+)	In allen Proben	In keiner Probe	In keiner Probe

<i>B. licheniformis</i> (+)	In <b>allen</b> Proben bis auf: OEM 4 EM 3, 4 Sämtliche K/-Proben	In allen Proben	Ko+Wurm
<i>E.coli</i> (+++)	In <b>allen</b> Proben bis auf: K/EM K/KANNE	In keiner Probe	KANNE EM OHK/OEM OEM K/OEM K/EM K/KANNE
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (++)	<b>Nur</b> in K/EM und K/KANNE	In keiner Probe	EM OEM
<i>Pantoea agglomerans</i> (++)	In allen Proben	In keiner Probe	In keiner Probe
<i>Lactobacillus plantarum</i> (+++)	OHK/OEM 1, 4 OEM 1 EM 1-3 KANNE 1 K/OEM 1-3 K/KANNE 1-2 K/EM 1-2	OEM 4 EM 3, 4	In keiner Probe
<i>Lactobacillus casei</i> (++)	OHK/OEM 1, 4 OEM 1 EM 1-3 K/OEM 1-3 K/KANNE 1-2 K/EM 1-2	In keiner Probe	In keiner Probe
<i>Lactococcus lactis</i> (++)	OHK/OEM 2	In keiner Probe	In keiner Probe

	OEM 2-4 EM 4 KANNE 1,3,4 K/KANNE 3 K/EM 3		
<i>Kluyvermyces marxianus</i> (+++)	In allen Proben	In keiner Probe	In keiner Probe
<i>Issatchenkia orientalis</i> (++)	In allen Proben	In keiner Probe	In keiner Probe
<i>Clostridium perfringens</i> (+++)	K/EM 1	OHK/OEM 3	In keiner Probe
<i>Clostridium baratii</i> (++)	In Keiner Probe	OEM 3	In keiner Probe
<i>Paenibacillus lactis</i> (++)	In Keiner Probe	OHK/OEM1,2 OEM 1,2,4 EM 3 K/KANNE1, 3	In keiner Probe
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (+)	OHK/OEM 2,3 OEM 2,3 KANNE 1,2 K/KANNE 2	OHK/OEM 1-4 OEM 1,4 EM 1-4 KANNE 1-4 K/OEM 1-3	KANNE EM OHK/OEM OEM K/EM K/OEM K/KANNE
<i>Lactobacillus acidipisci</i> (+)	In keiner Probe	OHK/OEM 2,3 OEM 1,2,4, EM 2-4 K/OEM3	In keiner Probe
<i>Lactobacillus nagelii</i> (++)	In keiner Probe	OHK/OEM 2 EM 3,4 KANNE 2	In keiner Probe
<i>Serratia marcescens</i> (+++)	In keiner Probe	In keiner Probe	KANNE OHK/OEM EM

			OEM K/OEM K/EM K/KANNE
<i>Clostridium tertium</i> (+)	In keiner Probe	In keiner Probe	KANNE OHK/OEM EM OEM K/OEM K/EM K/KANNE
<i>Lactobacillus buchneri</i> (+)	In keiner Probe	OEM 4 K/OEM 1 K/EM 1	EM OEM K/EM
<i>Lactobacillus paracasei</i> (+++)	In keiner Probe	In keiner Probe	OHK/OEM K/OEM K/KANNE
<i>Lactobacillus coryniformis</i> (+++)	In keiner Probe	In keiner Probe	KANNE OHK/OEM EM OEM K/OEM K/EM K/KANNE

### 3.1.2.2. Untersuchungen zu den Gesamtkeimzahlen und zur metabolischen Aktivität der Mikroorganismen

In Abbildung 2 i.) ist die Anzahl der sondenmarkierten Eubakterien der unterschiedlichen Versuchsansätze im Zeitverlauf abgebildet. So beträgt zum Startzeitpunkt die mittlere, logarithmierte Anzahl der stoffwechselaktiven Eubakterien im Versuchsansatz EM; 8,11; 7,50 bei dem Ansatz K/EM; 6,58 beim Ansatz K/KANNE; 6,32 beim Ansatz K/OEM; 7,32 beim Ansatz KANNE; 7,44 beim Ansatz OEM und 7,24 beim Ansatz OHK/OEM.

Nach 4- wöchiger Fermentation betrug die mittlere, logarithmierte Anzahl stoffwechselaktiver Eubakterien beim Ansatz EM 7,28; beim Ansatz K/EM 7,50; beim Ansatz K/KANNE 7,08, beim Ansatz K/OEM 5,93; beim Ansatz KANNE lag die Anzahl unter der Nachweisgrenze von 5. Beim Ansatz OEM lag die mittlere, logarithmierte Zahl aktiver Eubacteria bei 7,42 und bei OHK/OEM lag sie bei 7,92.

10 Wochen später nach der Vererdung lag die Aktivität, der Eubacteria bei den meisten Ansätzen unter der Nachweisgrenze. Lediglich die Ansätze EM, K/KANNE und KANNE zeigten mit 7,60; 8,21 und 7,23 eine eubakterielle Aktivität.

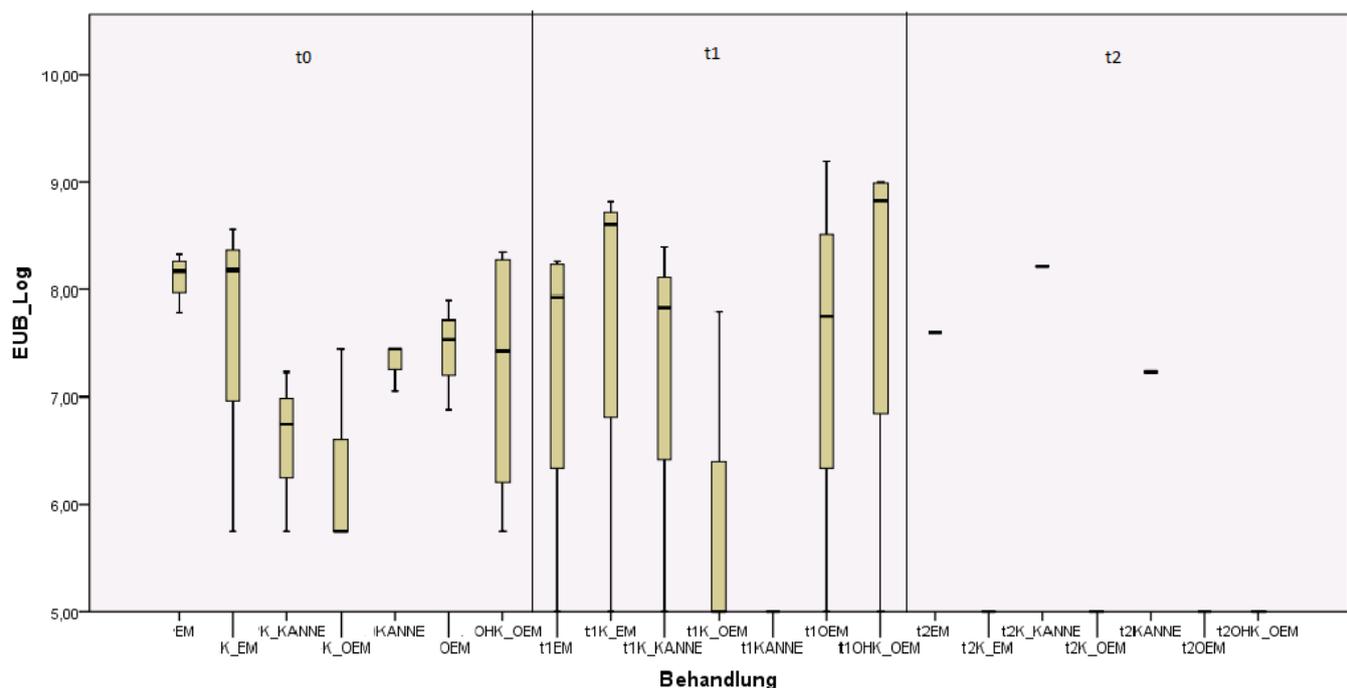


Abb. 2i.) Dynamik der Eub338- markierten (stoffwechselaktiven) Eubacteria im Feldversuch.

Ordinate: dekadischer Logarithmus der gezählten Keime  
sonst Legende wie bei Abb.2a.)

Abbildung 2j.) stellt die gesamte logarithmierte Bakterienzahl der verschiedenen Ansätze im Zeitverlauf dar. Vor dem Beginn der Fermentation betrug die Keimdichte/g bei dem Ansatz EM 9,23; beim Ansatz K/EM 8,48; beim Ansatz K/OEM 8,97; beim Ansatz KANNE 8,87; beim Ansatz OEM 9,05; sowie 8,65 beim Ansatz OHK/OEM.

Nach 4 Wochen Fermentation lag die Anzahl der Keime/g bei allen Versuchsansätzen im Mittel höher, als zuvor. So betrug sie beim Ansatz EM 9,47; beim Ansatz K/EM 9,33; beim Ansatz K/KANNE 9,00; beim Ansatz K/OEM 9,08; beim Ansatz KANNE 9,41; beim Ansatz OEM 9,25; und beim Ansatz OHK/OEM 9,38.

Nach 10 Wochen Vererdung sinkt die mittlere, logarithmierte Keimzahl in allen Fällen wieder ab. Sie betrug nunmehr 7,60 beim Ansatz EM; 8,94 beim Ansatz K/EM; 8,88 beim Ansatz K/KANNE; 8,64 beim Ansatz K/OEM; 8,77 beim Ansatz KANNE; 9,05 beim Ansatz OEM und 8,90 beim Ansatz OHK/OEM.

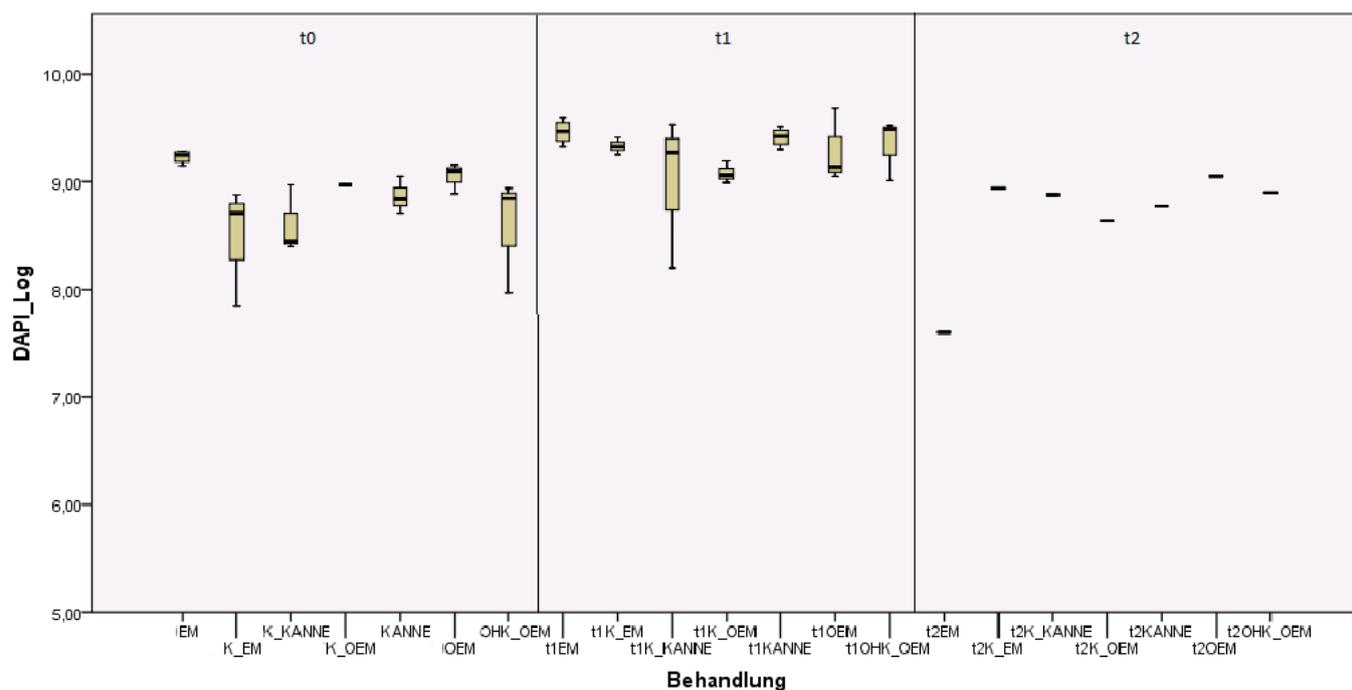
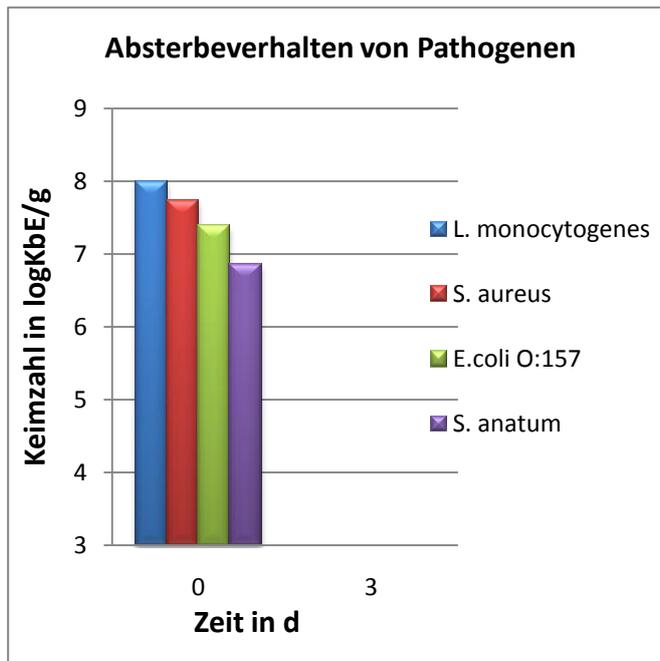


Abb. 2j.) Dynamik der mittels DAPI-Färbung ermittelten bakteriellen Gesamtzahl (lebend und tot) im Feldversuch

Ordinate: dekadischer Logarithmus der gezählten Keime  
sonst Legende wie bei Abb.2a.)

## 3.2. Untersuchungen zur Tenazität von pathogenen Bakterien im Laborversuch

Zum Startzeitpunkt der Untersuchungen konnte eine pathogene Gesamtkeimzahl von 8,27 log KbE/g gezählt werden. Diese setzte sich zusammen aus 7,99 log KbE/g *Listeria monocytogenes*, 7,74 log KbE/g *Staphylococcus aureus*, 7,40 log KbE/g *E.coli* O:157, *Salmonella* Anatum 6,86 log KbE/g. Bereits nach 72h Stunden sanken die Keimzahlen unter die Nachweisgrenze von 3 log KbE/g, wie es in Abb. 3a zu erkennen ist. Auch im Direktausstrich konnten keine pathogenen Erreger gefunden werden. Zudem konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsansätzen HK/OEM, OHK/OEM, OHK/EM oder HK/EM festgestellt werden, daher wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet.

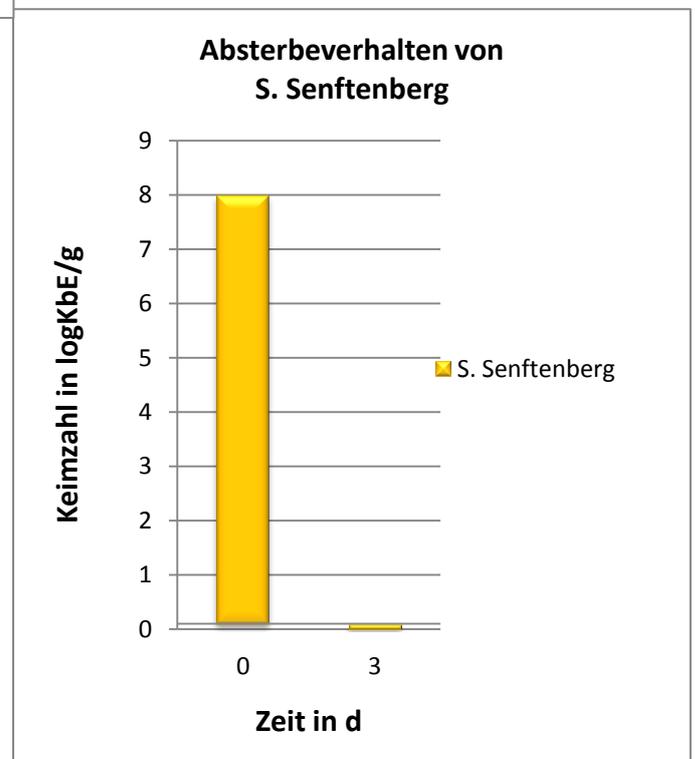


von 3 log KbE/g, wie es in Abb. 3a zu erkennen ist. Auch im Direktausstrich konnten keine pathogenen Erreger gefunden werden. Zudem konnten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsansätzen HK/OEM, OHK/OEM, OHK/EM oder HK/EM festgestellt werden, daher wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet.

Abb. 3a. Absterbeverhalten von Pathogenen im Zeitverlauf, unabhängig von den Matrices

Wie in Abbildung 3 b. dargestellt, ist ein Absterben von *Salmonella* Senftenberg, von den anfänglich 7,98 log KbE/g Salmonellen bis zu unter der Nachweisgrenze nach 3 Tagen Fermentation zu beobachten. Der Erreger konnte auch über die Anreicherung nach Preuss nicht mehr nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den getesteten Varianten HK/EM bzw. HK/OEM bestanden nicht, daher wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet.

Abb. 3b.) Absterbeverhalten von *S. Senftenberg* im Zeitverlauf, unabhängig von den Matrices



## 3.3. Untersuchungen zur Tenazität von ECBO-Viren im Laborversuch

Von den drei beimpften Lindenholzkeimträger ließen sich zum Startzeitpunkt  $< 3,98 \log$  PbE/ml (Plaque bildenden Einheiten) nachweisen. Dieselbe Konzentration konnte auch nach dem Vortexen der Keimträger in der jeweiligen Matrix gemessen werden. Nach drei Tagen sank die Konzentration der Partikel auf den Keimträgern aus dem Versuchsansatz HK/EM auf  $< 2,85 \log$  PbE/ml bzw. auf  $< 1,85 \log$  PbE/ml bei dem Ansatz HK/OEM. Nach 7 Tagen lag die Konzentration auf den Keimträgern bei dem Ansatz HK/EM bei  $< 1,65 \log$  PbE/ml und unter der Nachweisgrenze von  $1,00 \log$  PbE/ml bei HK/OEM, wie in Abb. 4. dargestellt.

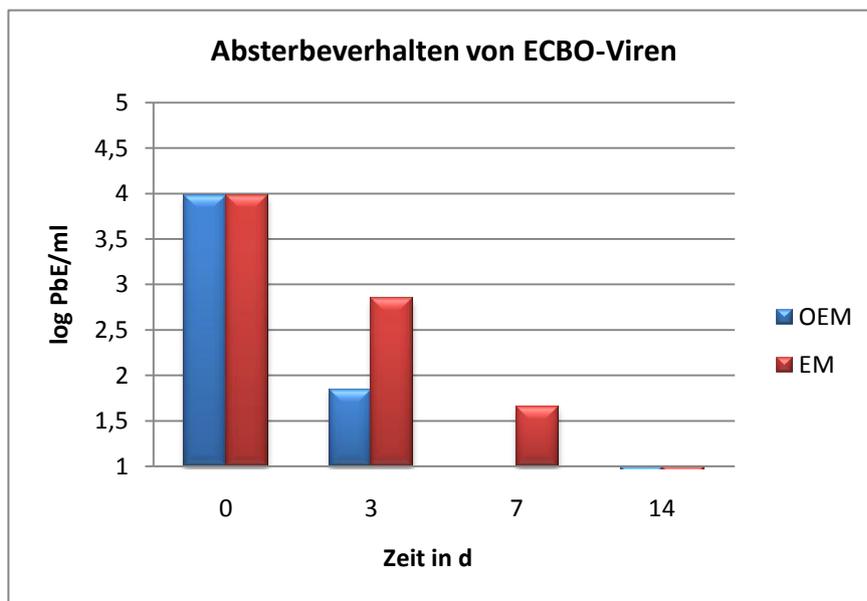


Abb.4.) Absterbeverhalten von ECBO-Viren im Zeitverlauf, in Abhängigkeit von den Matrices

3.4. Untersuchungen zur Tenazität von *Ascaris suum* -Eiern

In Abb. 5 ist das Absterbeverhalten von *Ascaris suum* im Verlauf von der 3. Woche zur 8. Woche, in den Matrices HK/OEM bzw. HK/EM dargestellt. Die Embryonierungsrate der Spulwurmeier sinkt in beiden Fällen von 96,8% auf 0%.

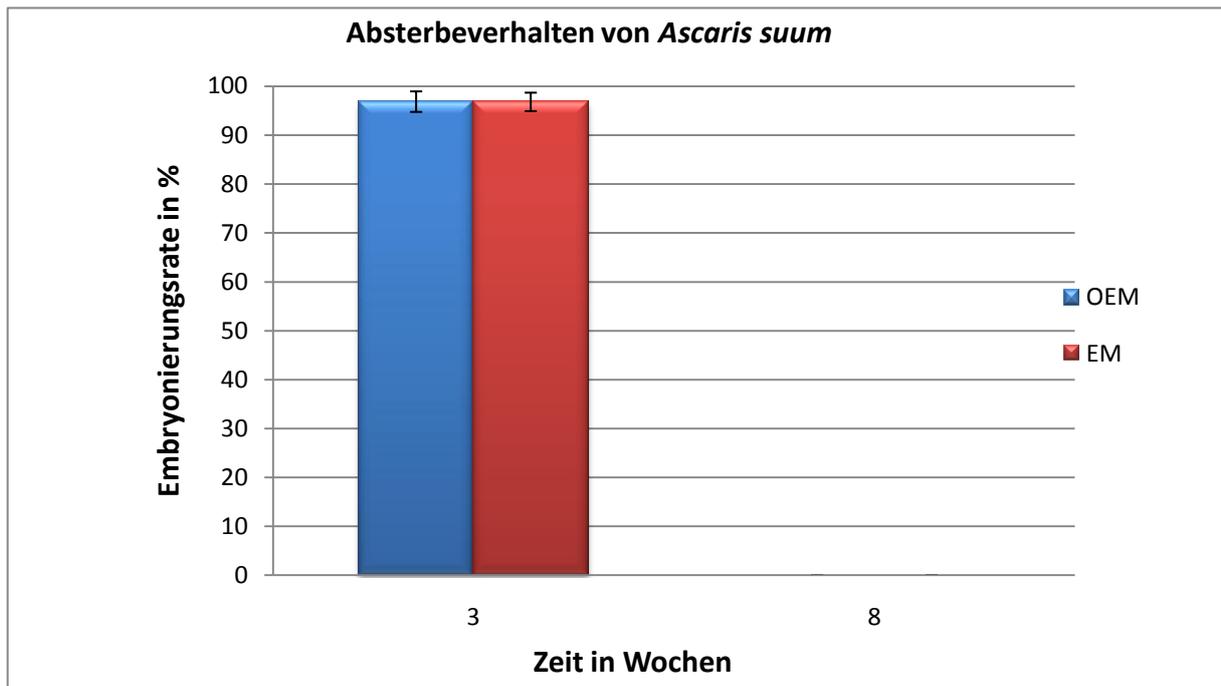


Abb. 5.) Absterbeverhalten von *Ascaris suum* - Eiern im Zeitverlauf in den Matrices OEM und EM.

## 3.5. Abbau/Adsorption von Sulfadiazin

In Abbildung 6 ist die Abbau-/Adsorptionsrate von Sulfadiazin im Zeitverlauf dargestellt. Von dem zum Startzeitpunkt in die Matrices hinzu gegebenen Sulfadiazin (Endkonzentration von 10mg/kg) sind unmittelbar nach Zugabe im Mittel nur noch 1,59 mg bzw. 2,37mg im Versuchsansatz OEM bzw. EM nachweisbar. Nach einer Woche beträgt die mittlere Konzentration noch 0,56mg bzw. 0,80mg, nach der zweiten 0,4 bzw. 0,61 mg und nach der dritten Woche beträgt die Endkonzentration 0,32 bzw. 0,5 mg.

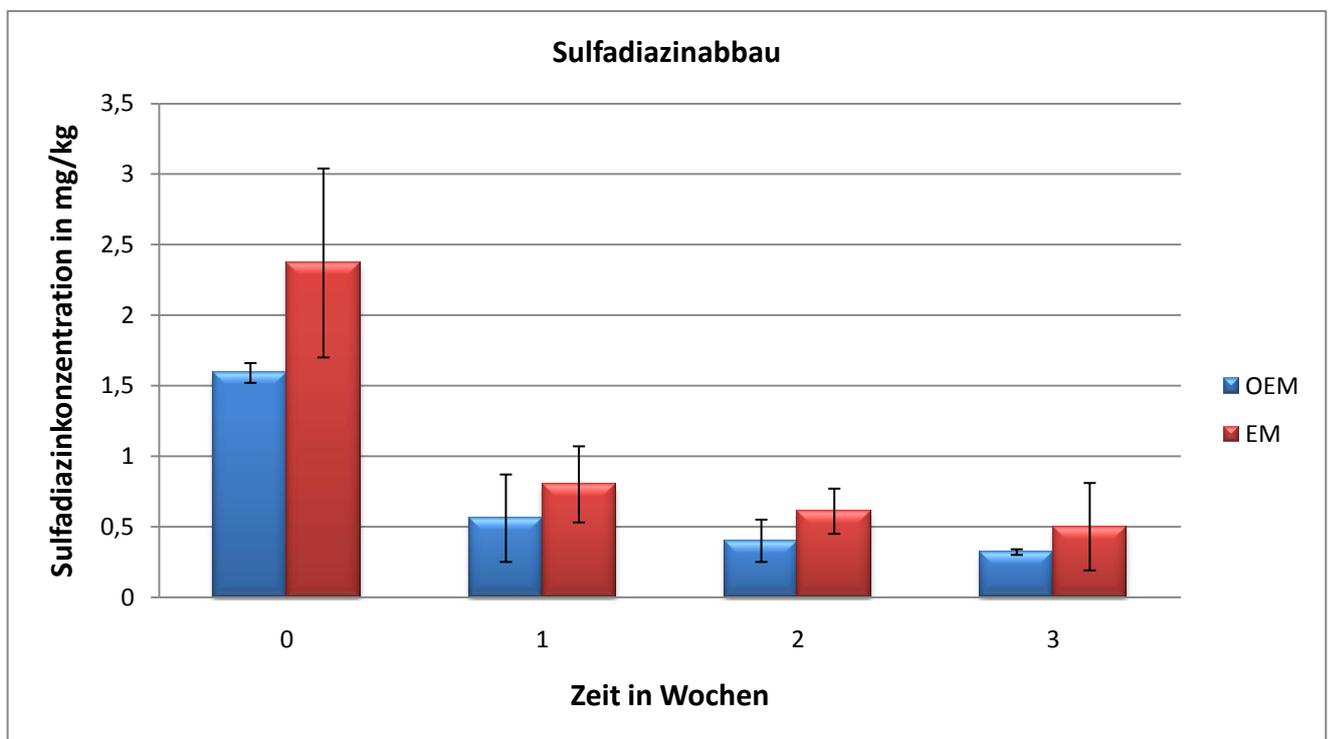


Abb. 6.) Sulfadiazinabbau im Zeitverlauf in den Matrices OEM und EM

## 3.6. Reifegradbestimmung der Terra Preta

## 3.6.1. Reifegradbestimmung mittels der elektronischen Nase

In Abbildung 7 ist die Hauptkomponentenanalyse der Messungen der elektronischen Nase dargestellt. Die jeweils 3 Quadrate der *gleichen* Farbe stellen die Leitwerte der Sensorik der letzten 3 Sekunden der Messung dar. Je weiter die Punkte *unterschiedlicher* Farben von einander entfernt sind, desto größer sind die Unterschiede in der Zusammensetzung der Gasphase.  $t_0$  OHK/OEM unterscheidet sich demnach stärker im Sensorenbild von  $t_1$  EM als  $t_2$  Kanne von  $t_2$  EM.

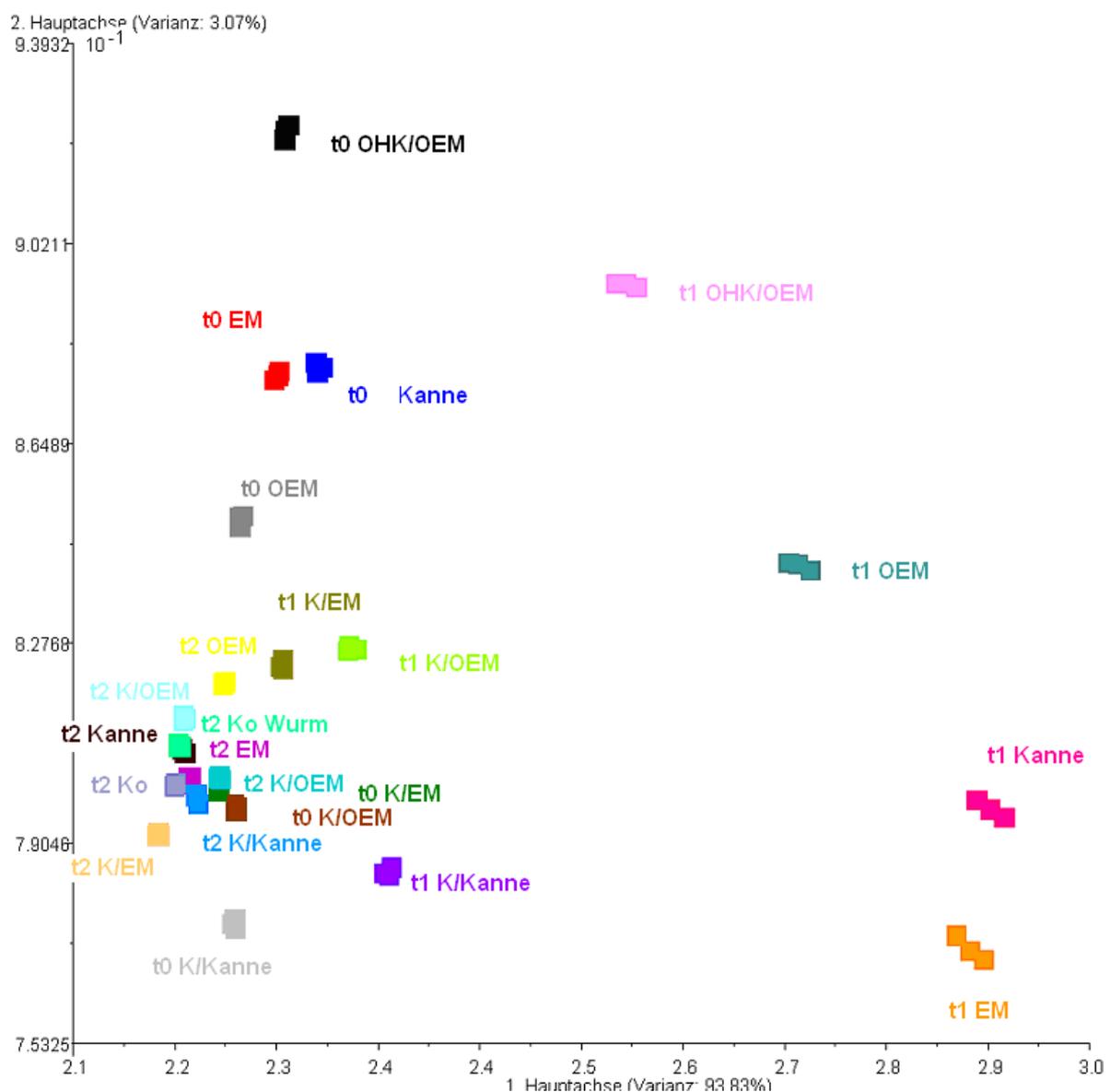


Abb. 7.) Hauptkomponentenanalyse des Sensorarrays der elektronischen Nase

Betrachtet man nun die Zeitschritte unabhängig von der Zusammensetzungen der Matrices der einzelnen Versuchsansätze sieht man wie in Abbildung. 8. dargestellt, eine relativ starke Überlappung einzelner Werte nahe dem Koordinatenursprung. Dies wird auch in Tabelle 2 deutlich, die die Trennbarkeit der Klassen beschreibt. Hierbei steht 1 für eine sehr gute Trennbarkeit und keine Überschneidungen 0 für eine vollständige Überlagerung.

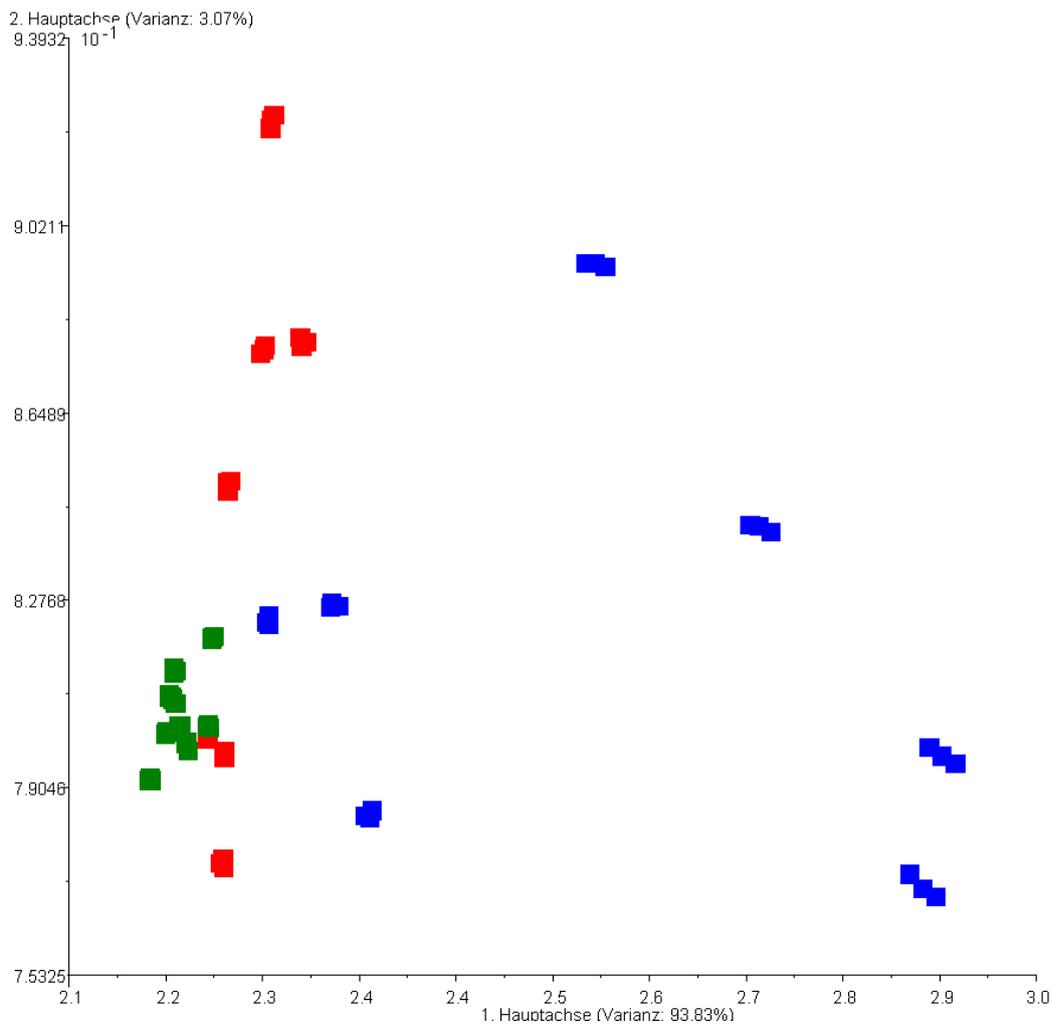


Abb. 8.) Hauptkomponentenanalyse des Sensorarrays der elektronischen Nase, Einzelproben in zeitliche Gruppen zusammengefasst

Tab. 2.) Darstellung der Trennbarkeit der verschiedenen Gruppen der PCA

	T0	T1	T2
T0		0.482	0.524
T1	0.482		0.539
T2	0.524	0.539	

### 3.6.3. Reifegradbestimmung mittels Gär-, Laktat- und Alkoholbestimmung

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aus der Gär säure-, Laktat- und Alkoholbestimmung des Laboransatzes (37°C) nach 8 Wochen Fermentation dargestellt.

Tab. 3.) Gär säure-, Laktat- und Alkoholgehalt im Substrat des Laboransatzes I

in g/ kg OS	OHK/OEM	HK/OEM	HK/EM	OHK/EM
Essigsäure	1,7	1,3	1,3	2,0
Propionsäure	0,4	0,5	0,3	0,8
Buttersäure	1,7	4,7	2,9	2,6
Milchsäure	5,0	4,4	3,7	5,1
Alkohol:				
- Ethanol	2,63	2,68	2,45	1,93
- Propanol	0,80	0,18	0,53	0,64
- Butanol	<0,05	0,06	0,06	0,05
- 2,3 Butandiol	<0,05	0,07	0,07	0,07
- 1,2 Propandiol	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse aus der Gär säure-, Laktat- und Alkoholbestimmung des Feldansatzes (27°C) nach 4 Wochen Fermentation dargestellt.

Tab. 4.) Gär säure-, Laktat- und Alkoholgehalt im Substrat des Feldansatzes

in g/kg OS	OEM	Kanne	EM	OHK /OEM	K/EM	K/Kanne	K/OEM
<b>Essigsäure</b>	10,80	10,30	10,70	12,90	8,05	8,32	10,20
<b>Milchsäure</b>	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
<b>Propionsäure</b>	1,71	3,00	2,60	2,29	0,11	1,22	1,66
<b>i-Buttersäure</b>	0,19	0,14	0,12	0,11	0,15	0,08	0,14
<b>n-Buttersäure</b>	8,34	5,91	7,26	6,29	8,54	9,40	9,90
<b>i-Valeriansäure</b>	0,09	0,06	0,05	0,06	0,11	0,06	0,11
<b>n-Valeriansäure</b>	0,31	0,36	0,18	0,33	0,38	0,32	0,29
<b>n-Caprönsäure</b>	1,55	0,88	0,39	1,01	3,58	3,18	1,60
<b>Ethanol</b>	2,39	4,74	3,62	3,74	0,63	0,76	0,52
<b>Propanol</b>	0,25	0,35	0,40	0,40	0,11	0,13	0,11
<b>Butanol</b>	0,39	0,19	0,27	0,47	0,08	0,24	0,09
<b>2,3 Butandiol</b>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
<b>1,2 Propandiol</b>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse aus der Gär säure-, Laktat- und Alkoholbestimmung von Feld und Laboransätzen nach 4 Wochen Fermentation bei Raumtemperatur (21°C) und bei 37°C

dargestellt. Es wurde dabei zum einen die Temperatur (Angabe in °C) variiert und zum anderen der Anteil an leicht verdaulichen Kohlenstoffquellen erhöht (Zusatz: C) das X beider Temperaturangabe steht für Außentemperatur, die den Tageszeitlichen Schwankungen ausgesetzt war. Die Buchstaben KL stehen dafür, dass anstelle von Kuhdung Klärschlamm verwendet wurde.

Tab. 5.) Gär säure-, Laktat- und Alkoholgehalt des Laboransatzes II

in g/kg OS	OEM C 21°C	OEM C 37°C	EM C 21°C	EM C 37°C	EM X°C	EM 37°C	OEM X°C	OEM 37°C	KL OEM C 37°C	KL EM C 37°C
<b>Essigsäure</b>	3,0	5,89	11,2	9,75	7,48	3,64	6,18	3,89	3,6	3,7
<b>Milchsäure</b>	12,1	22,09	26,0	6,7	0,94	< 0,2	1,45	< 0,2	0,6	0,5
<b>Propionsäure</b>	1,0	0,68	2,0	1,29	0,99	1,07	1,26	0,93	1,4	0,9
<b>i-Buttersäure</b>	0,2	0,08	0,1	0,09	0,08	0,23	0,12	0,28	0,4	0,3
<b>n-Buttersäure</b>	12,1	1,00	0,9	4,69	8,81	7,45	11,9	6,57	21,3	17,5
<b>i-Valeriansäure</b>	0,1	0,08	0,1	0,1	0,09	0,39	0,13	0,49	0,4	0,4
<b>n-Valeriansäure</b>	0,2	0,21	<0,05	0,79	0,27	1,73	0,31	1,73	1,7	1,0
<b>n-Caprionsäure</b>	2,4	0,34	<0,05	2,67	2,09	5,72	1,47	6,33	1,4	2,1
<b>Ethanol</b>	1,3	2,23	2,4	1,52	0,57	< 0,05	0,29	< 0,05	3,8	5,3
<b>Propanol</b>	0,1	< 0,05	1,9	< 0,05	0,17	< 0,05	0,12	< 0,05	0,2	0,7
<b>Butanol</b>	0,2	< 0,05	<0,05	< 0,05	0,17	< 0,05	0,13	< 0,05	0,2	0,2
<b>2,3 Butandiol</b>	<0,05	< 0,05	<0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	<0,05	<0,05
<b>1,2 Propandiol</b>	<0,05	< 0,05	<0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	<0,05	<0,05

## 3.6.3. Reifegradbestimmung mittels pH-Wert Messung

In Abbildung 9a.) sind die pH-Werte der Poolproben des Laborversuches zum Startzeitpunkt, nach 3- und 8- wöchiger Fermentation abgebildet. Unabhängig von der Zusammensetzung des Ansatzes, sinken die pH-Werte von 6,0 bis 6,3 auf einen Bereich zwischen pH 4,1 und 4,6 nach 3 Wochen und 4,1 bis 4,3 nach 8 Wochen. Der pH-Wert vom Ansatz HK/EM sinkt von 6,00 auf 4,4 nach 3 Wochen und auf 4,1 nach 8 Wochen, vom Ansatz HK/OEM von 6,3 auf 4,4 nach 3 Wochen und auf 4,1 nach 8 Wochen, vom Ansatz OHK/EM von 6,00 auf 4,40 darauf auf 4,1; vom Ansatz HK/OEM von 6,00 auf 4,40 darauf auf 4,1; vom Ansatz OHK/EM von 6,00 auf 4,10 wo er dann stagniert.

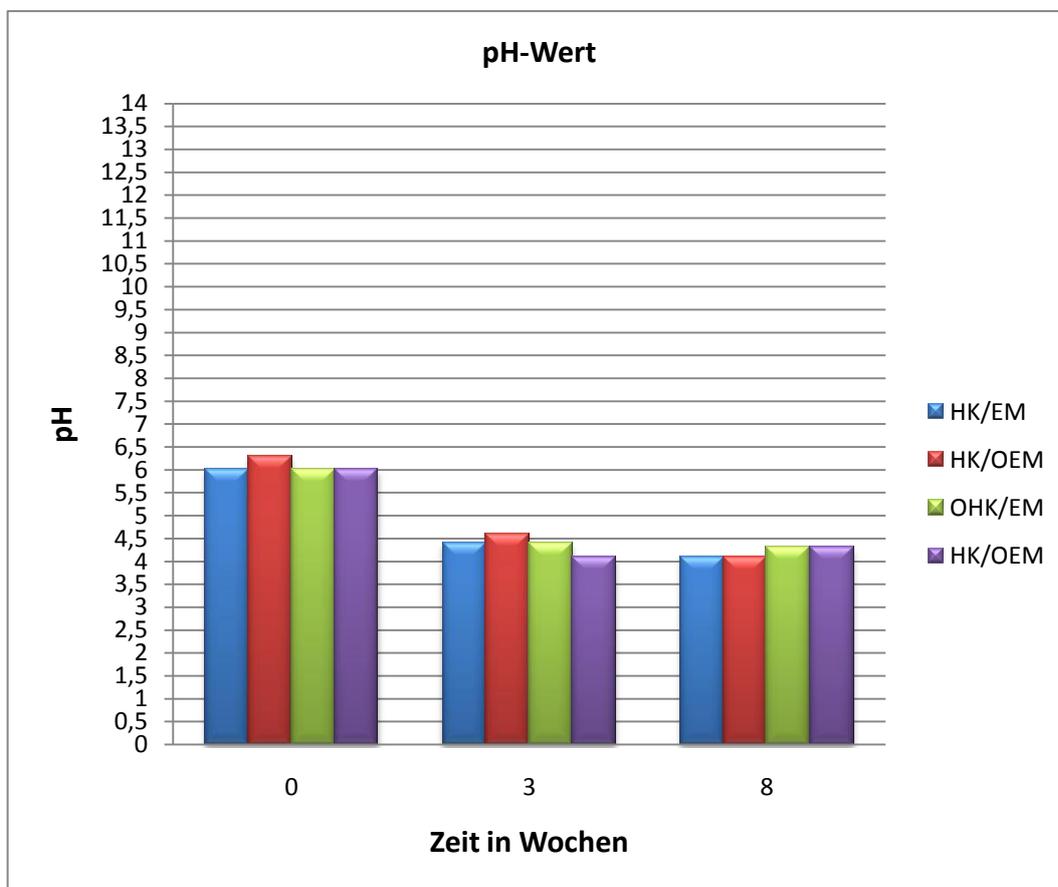


Abb. 9a.) pH-Werte der Matrices der Laborversuche I vor, nach 3 und nach 8 Wochen Fermentation

In Abbildung 9b.) sind die mittleren pH-Werte des Feldversuches vor und nach 4- wöchiger Fermentation abgebildet. Unabhängig von der Zusammensetzung des Ansatzes sinkt der pH-Wert von 6,36-7,26 auf einen einheitlichen Bereich zwischen pH 5,13 und 5,48. Der pH-Wert vom Ansatz EM sinkt von 6,36 auf 5,13, vom Ansatz OEM von 6,48 auf 5,28; vom Ansatz OHK/OEM von 7,07 auf 5,14; vom Ansatz Kanne von 6,37 auf 5,21; vom Ansatz K/EM von 7,19 auf 5,44 vom Ansatz K/Kanne von 7,25 auf 5,16 und vom Ansatz K/OEM von 7,26 auf 5,48.

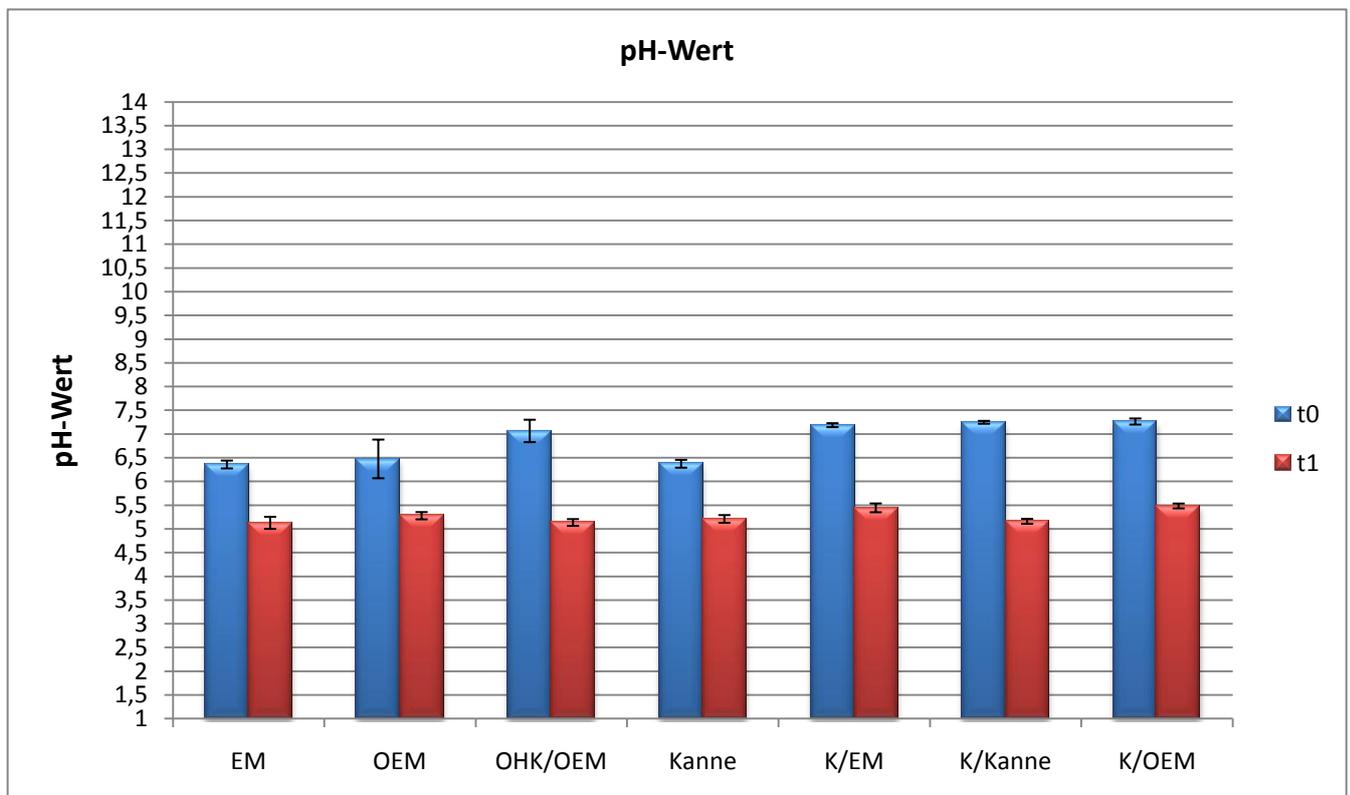


Abb. 9b.) Mittlere pH-Werte der Matrices des Feldversuches vor und nach der Fermentation

## 4. Interpretation und Diskussion

### 4.1. Interpretation der kulturellen bakteriologischen Untersuchungen

#### 4.1.1. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Labormaßstab

Durch den Fermentationsprozess werden die für Fäkalabfälle typischen Enterobakterien reduziert. Der Zusatz fermentierbarer Kohlenhydrate zum Fermentationsansatz reduziert durch Bildung von Milchsäure und kurzkettigen Fettsäuren diese Erregergruppe bis unter die Nachweisgrenze und es entsteht durch diesen Prozess eine Fermentationsflora, in der Laktobazillen und aerobe Sporenbildner dominieren. Die mesophile Gesamtkeimzahl (Abb. 1a. und 1b.) wird während der Fermentation um den Faktor  $10^3$  unabhängig von der Zusammensetzung der unterschiedlichen Matrices und der Dauer der Behandlung reduziert. Die verbleibenden mesophilen Bakterien gehören überwiegend zu sporenbildenden, Gram-positiven, aerotoleranten Bakterien, während vor Beginn der Fermentation Gram-negative Keime und Laktobazillen die mesophile Gesamtkeimzahl dominierten. Die Gram-negative Flora (1c.) wird von ca.  $10^6$  KBE/g auf unter die Nachweisgrenze der Kulturmethode reduziert, Laktobazillen (Abb. 1e.) sinken um 2,5 bis 3 Zehnerpotenzen. Ähnliche Ergebnisse werden auch bei den Enterokokken (Abb. 1d.) und den Hefen (Abb. 1f.) erzielt. Laktobazillen (Abb. 1d.) scheinen im Untersuchungsgut sehr inhomogen verteilt zu sein, da nach 3 und 8 Wochen Fermentation die Standardabweichungen sehr hoch liegen, was mit methodischen Einflüssen nicht erklärbar ist. Das Absterben der Pilzflora im Verlauf der Zeit (Abb. 1f.) ist als Folge der Anaerobiose zu sehen. Die meisten Pilze sind Aerobier. Schwankungen in den Pilzkonzentrationen zum Zeitpunkt Null sind dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein Schimmelpilzen geschuldet, die z.T. so schnell wuchsen, dass auf der Platte die Hefepilze verdrängt wurden, die zumeist die hohe Konzentration

#### 4.1.2.1. Dynamik der Bakterienflora im Zeitverlauf von 8 Wochen im Feldversuch

Wie im Laborversuch tritt auch im Feldversuch durch die Fermentation ein signifikanter Abfall der aeroben, mesophilen Keimflora auf (siehe Abb. 2a.). Die Reduktion der aeroben Gesamtkeimzahl (GKZ) schwankt hierbei zwischen 1,5 und 3 Zehnerpotenzen. Nach der Fermentation war ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ansatz OHK/OEM und EM feststellbar. Dieser könnte mit dem Holzkohleanteil in diesem Ansatz zu erklären sein, denn zwi-

schen OEM und EM konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Der höhere Anteil der Keime bei dem Ansatz OHK/OEM könnte zum einen daher rühren, dass Mikroorganismen die Hohlräume der Holzkohle besiedeln und dadurch sich dem kulturellen Nachweis entziehen. OEM unterscheidet sich auch signifikant von OHK/OEM, EM jedoch nicht von OEM, so dass auch dies auf die Einflussnahme der Holzkohle schließen lässt. Der Ansatz KANNE unterscheidet sich mit ähnlich hoher Keimdichte wie OHK/OEM ebenso signifikant von OEM wie von EM. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Zuschlag von Kanne-Fermentgetreide einen positiven Einfluss auf die aerobe Gesamtkeimzahl *während der Fermentation* besitzt. Paradoxiertweise hatte der Ansatz KANNE zum Startzeitpunkt die niedrigsten Keimzahlen. Zudem besaß K/OEM eine signifikant höhere Gesamtkeimzahl als K/EM im Gegensatz zu den Ansätzen OEM und EM. Es scheint daher so, als hätte der Zuschlag von EM bei den Ansätzen mit dem hohen Fäkalanteil einen reduzierenden Effekt auf die Gesamtkeimzahl. Nach der Fermentation konnten ähnliche Florverschiebungen wie beim Laboransatz festgestellt werden. Zu Versuchsbeginn dominierende Gram-negative Bakterien und Laktobazillen wurden überwiegend durch Gram-positive Sporenbildner ersetzt.

Nach der Vererdung stiegen die mesophile Gesamtkeimzahlen wieder deutlich an, was auf den Substratabbau durch Bodenmikroorganismen und Kompostwürmer zurückzuführen ist. Bei der kulturellen Methode des Bakteriennachweises muss berücksichtigt werden, dass der Nährboden und die Kultivierbarkeit der Bakterien das Ergebnis beeinflussen. Da das Hauptaugenmerk auf den Nachweis der Fäkalkeime lag, die auf den ausgewählten Nährboden gut wachsen, überzeugen die Befunde davon, dass durch die Fermentierung Fäkalkeime degradiert werden. Die deutlich geringere aerobe Gesamtkeimzahl der Kontrollfelder geht auf den geringeren Anteil an organischem Material zurück. Hier bestehen auch Unterschiede zwischen Kontrollfeldern mit und ohne Kompostwürmer. Der Unterschied zwischen den Feldern begründet sich in den fäkalen Ausscheidungen der Würmer und den organischen Transportmatrices, in denen sich die Würmer befanden.

Analog zu den aeroben Gesamtkeimzahlen (GKZ) verhalten sich die anaeroben GKZ (Abb. 2b.). Der signifikant niedrige Keimgehalt des Ansatzes Kanne im Vergleich zu EM und OHK/OEM zum Zeitpunkt 0 ist vermutlich dem Zuschlag des Kanne-Fermentgetreides geschuldet, das hier einen hemmenden Effekt besitzt. Tendenziell kann dies auch bei der aeroben GKZ beobachtet werden, jedoch sind die Unterschiede im Turkey-HSD-Posthoc-Test nicht signifikant. Nach der Fermentation besitzt der Ansatz Kanne die höchste mittlere anaer-

robe GKZ ähnlich der aeroben GKZ, sie unterscheidet sich signifikant von der des Ansatzes EM.

Nach der Vererdung steigt die anaerobe GKZ deutlich an, was auf den Rekolonisierungseffekt zurückzuführen ist.

Parallel zum Laborversuch, konnte auch im Feldansatz eine Reduktion der Gram-negativen GKZ beobachtet werden. (Abb. 2c.) Es liegt daher nahe, dass diese Flora sowohl im Laborversuch als auch im Feldversuch eliminiert wird. Der Temperaturunterschied von 10°C zwischen den Labor- bzw. Feldversuchen scheint in dem betrachteten Zeitraum von 3-4 Wochen weniger relevant zu sein. Mit der Vererdung wurden wieder Gram-negative Keime nachweisbar, jedoch nicht in den Kontrollflächen, so dass ein möglicher Eintrag durch die Kompostwürmer oder deren Transportsubstrat eher unwahrscheinlich ist. In 2 Versuchsfeldern konnten Mäusenester entdeckt werden, die als mögliche Vektoren Gram-negativer Keime in Frage kommen.



Foto 4.) Potentieller Vektor im Versuchsfeld eine junge Brandmaus (*Apodemus agrarius*)

Für den zufälligen Eintrag von Fäkalkeimen durch Vektoren spricht auch der Keimverlauf der Enterokokkenkonzentrationen (Abb. 2d.). Vor der Fermentation sind Enterokokken deutlich über der Nachweisgrenze in allen Proben festzustellen. Während der Fermentation werden sie

eliminiert, sind dann aber wieder in niedrigerer Konzentration in vier Ansätzen, jedoch nicht in allen, nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied der Enterokokkenzahl zum Startzeitpunkt zwischen KANNE und OHK/OEM lässt sich zwar errechnen, jedoch ist die Streuung der Werte von KANNE zu hoch, um eine sichere Aussage treffen zu können.

Zum Startzeitpunkt ist die signifikant erhöhte Laktobazillenkonzentration (Abb. 2f.) des Versuchsansatzes EM im Vergleich zu KANNE, OEM und OHK/OEM auf die Zugabe der „effektiven Mikroorganismen“ zurückzuführen. Diese anfänglich erhöhte Konzentration wirkt sich jedoch nicht signifikant auf die Endkonzentration der Laktobazillen mit dem Abschluss der Fermentation aus. Ähnlich den Ergebnissen des Laborversuches sind auch die Konzentrationen der Laktobazillen in den verschiedenen Wiederholungen der Versuchsansätze ziemlich stark gestreut. Dies lässt auf eine inhomogene Verteilung der Mikroorganismen in dem Versuchsgefäß und auf Nester-Bildung schließen. Während der Vererdung nimmt die Konzentration der Laktobazillen jedoch wieder zu, zum Teil so stark, dass der Ausgangswert vor der Fermentation wieder erreicht wird. (KANNE ; OEM). Offensichtlich werden die Lebensbedingungen für bestimmte Laktobazillenspezies günstiger, so dass sie sich vermehren können. Das kann an den veränderten pH-Bedingungen (die Fermentationsprodukte wurden mit Gesteinsmehl pH-korrigiert) führen. Nur der EM-Ansatz bleibt nach Fermentation und Vererdung auf ähnlich hohem Laktobazillen-Niveau, was nahelegt, dass durch die hohe Startkonzentration noch genug Laktobazillen die Fermentation überstanden. Andererseits können auch Vektoren Fäkalkeime auf die Felder eingetragen haben.

Während die Clostridienzahlen (siehe Abb. 2g.) zu Beginn und auch nach der Fermentation unter der Nachweisgrenze liegen und nur vereinzelte *Clostridium perfringens* nachzuweisen war, steigt mit der Vererdung die Anzahl der kultivierbaren Clostridien sehr stark an. Lediglich bei den Kontrollfeldern liegt sie unter der Nachweisgrenze, so dass das fermentierte Substrat auf den Feldern vermutlich der ausschlaggebende Grund für diese starke Entwicklung sein wird.

Parallel dazu gibt die Abbildung 2.h) ein ähnliches Bild wider, jedoch mit einer höheren Auflösung. Darin ist zu erkennen, dass die sulfidreduzierende Clostridienpopulation tatsächlich um den Bereich von 2 Logstufen/g bei allen Ansätzen schwankt. Während der Fermentation ist kein signifikantes Wachstum oder Absterben der Population erkennbar. Erst mit der Vererdung steigt die Anzahl der sulfidreduzierenden Clostridien um den Faktor  $10^4$  bis  $10^6$ . Lediglich bei den Kontrollfeldern wurde eine geringere Konzentration unter  $10^3$  Keime/g festgestellt.

### Pilzflora

Die fungale Flora (Abb. 2f.) ist vor der Fermentation bei allen Ansätzen mit geringerem Fäkalanteil höher als bei den Ansätzen mit hohem Fäkalanteil. Der Hauptunterschied zwischen den Ansätzen liegt in diesem Falle in dem Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der Silage. Der signifikante Unterschied zwischen EM und OHK/OEM ist weder durch die Holzkohle noch durch die Laktobazillenquelle zu erklären. Wäre der Pilzgehalt durch die Holzkohle bestimmt, so müssten die Ansätze mit dem höheren Fäkalanteil, anstelle der Silage, eine ähnlich hohe Konzentration aufweisen, da sie alle Holzkohle enthalten. Wäre die Laktobazillenquelle gleichzeitig eine Pilzsporenquelle, so müsste der Ansatz OEM eine ähnlich niedrige Konzentration an fungaler Flora aufweisen wie OHK/OEM. Nach der Fermentation liegt die Konzentration der Pilze unter der Nachweisgrenze und steigt mit der Vererdung nur leicht an. Dabei werden für das Absterben, wie bereits im Laboransatz vermutet, der Konkurrenzdruck sowie die Anaerobiose verantwortlich sein. Die niedrige Pilzkonzentration zum Zeitpunkt der Probenentnahme nach der Vererdung soll jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass es teils erhebliche Populationsschwankungen der Pilze gab. So überwucherte wenige Tage nach Abschluss der Fermentation *Geotrichum spec.* die Versuchsfelder vollständig. Erst mit der Einbringung der Kompostwürmer, sowie der Sukzession von Springschwänzen, Ameisen etc. wurde der dichte Pilzteppich aufgelöst. Die nach dem Vererdungszeitraum genommenen Proben unterscheiden sich neben der Pilzkonzentration auch in der Art der Zusammensetzung. Vor der Fermentation konnten hauptsächlich Hefen gefunden werden, nach der Vererdung waren jedoch die Saccharomyceten nur in geringen Konzentrationen und nahezu gleichhäufig wie Ascomyceten vertreten.



Foto 5.) *Geotrichum spec.* überwuchert ein abgedecktes Versuchsfeld nahezu vollständig.

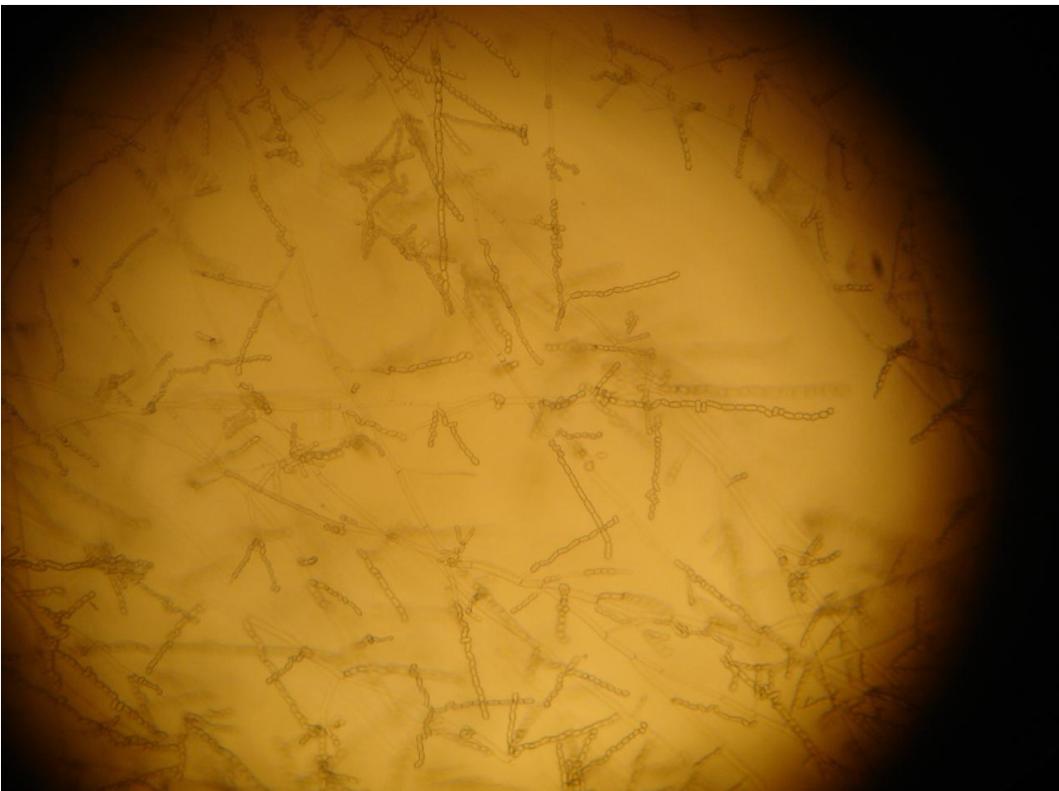


Foto 6.) Mikroskopische Aufnahme von *Geotrichum spec.* 1:400



Foto 7.) Mutmaßliche Antagonisten aus der Klasse der Springschwänze ca. 1:25

### 4.1.2.1. Interpretation der qualitativen Keimfloraveränderungen im Feldversuch

#### Gram-positive Bakterien

In Tabelle 1.) wird aus qualitativer Sicht deutlich, dass während der Fermentation eine Verschiebung der Bakterienpopulation stattfindet. Während im Ausgangsmaterial Gram-positive Kokken wie *Aerococcus viridans* sowie *Staphylococcus sciuri* noch in allen Proben zu finden sind, können sie weder nach der Fermentation noch nach der Vererdung gefunden werden. Dass diese Staphylokokken durch die Fermentation eliminiert werden, weist darauf hin, dass auch pathogene Staphylokokken wie MRSA diesen Prozess nicht überstehen dürften.

*Bacillus licheniformis* kommt in der Hälfte der Proben vor der Fermentation, jedoch in allen Proben nach der Fermentation vor. Mit großer Wahrscheinlichkeit waren die *B. licheniformis*-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze und haben sich während der Fermentation erhöht. Von der drastischen mesophilen Keimzahlreduktion bei der Fermentation wird *B. licheniformis* scheinbar weniger betroffen. *B. licheniformis* übersteht die Fermentation in Sporenform oder kann unter den Bedingungen eine gewisse Wachstumsrate aufrecht erhalten, denn Bern-

lohr beobachte (1960) auch Wachstum von *B. licheniformis* unter pH 5. Die ermittelten *B. licheniformis*-Konzentrationen lagen zwischen 3 und 5 log KbE/g nach der Fermentation.

In den allen Versuchsvarianten tritt bis auf Versuchsgefäß KANNE 1 *Lactobacillus plantarum* gemeinsam mit *Lactobacillus casei* auf, jedoch nie, mit Ausnahme des Versuchsgefäßes KANNE 1, zusammen mit *Lactococcus lactis*. Eventuell liegt auch bei letzterem eine Konkurrenz um eine ökologische Nische vor, die von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus plantarum* ggf. gemeinsam und unter Umständen in Interaktion genutzt wird. In lediglich 3 Gefäßen ist nach der Fermentation noch *L. plantarum* nachweisbar, in keinem jedoch *Lactobacillus casei* oder *Lactococcus lactis*. Nach der Vererdung ist keiner der drei Mikroorganismen mehr nachweisbar. Folglich erscheint das vererdete Fermentationsprodukt als inadäquater Lebensraum für diese Bakterienspezies.

*Clostridium perfringens*, ein sporenbildender, anaerober, toxinbildender Krankheitserreger, kommt im Magendarmtrakt (MDT) und Boden vor und verursacht eine Vielzahl von Erkrankungen. Während der Fermentation konnte keine Vermehrung des Erregers festgestellt werden. Als Sporenbildner kann er die Fermentation überdauern. Wachstum kommt bei pH-Werten unter 6 nicht vor. Da jedoch schon bei pH 6,5 das Optimumsplateau (Fuchs, et al., 1957) erreicht wird, ist der pH-Wert vermutlich ein sehr wichtiger Faktor für eine Hygienisierung. In den vererdeten Proben war *C. perfringens* nicht mehr auffindbar und wurde vermutlich durch andere Bodenorganismen antagonisiert.

*Paenibacillus lactis* ist hingegen ein aerober Sporenbildner, der häufig in Molkereien in Fermentationsprodukten nachgewiesen wird. Die Konzentration lag bei diesem schwärmenden Bakterium zwischen 3-5 log KbE/g. Die pH-Bedingungen waren im Fermentationsgut ausreichend, um ein Wachstum zu befördern. Scheldeman et al. (2004) postulierten, dass Wachstum noch im pH-Bereich zwischen 5 und 6 möglich ist.

Ähnlich den zuvor genannten aeroben Sporenbildnern *Paenibacillus lactis* sowie *B. licheniformis* verhält sich der bodenbürtige *Lysinibacillus fusiformis*. Gefunden wurde er zum Startzeitpunkt in 8 Gefäßen und nach der Fermentation in 17. Obgleich sein pH-Optimum bei 7-8 liegt, kann er im Bereich von pH 5,5 noch wachsen (Ahmed, et al., 2007). Mit der Vererdung kam es zu einem starken Populationsanstieg von *L. fusiformis*, so dass er in allen Feldern in hohen Konzentrationen von 7-8 log KbE/g zu finden war.

*Lactobacillus acidipisci* konnte lediglich nach der Fermentation in 8 Gefäßen gefunden werden und ist ein Laktatbildner, der erstmalig von Tanasupawat et al. (2000) beschrieben wurde

und bei der Fermentation von Fischen in Thailand genutzt wird. Er wächst in einem pH-Bereich von über 4,0 und unter 8,5 sowie einer Temperaturspanne von 25-37°C. In den betreffenden Gefäßen konnte er sich nur mit einer Konzentration von 3-5 log KBE/g etablieren und scheint eher Begleitflora als ein Leitkeim zu sein.

### Gram-negative Bakterien

*E. coli* trat in allen Proben auf, jedoch nicht in K/EM und K/KANNE. Stattdessen war in diesen Ansätzen *Raoultella ornithinolytica* nachzuweisen. Nach der Fermentation waren beide Spezies nicht mehr nachweisbar. Für pathogene Gram-negative Bakterienspezies wäre das ein wünschenswerter Hygienisierungseffekt. Der Nachweis beider Spezies in den Vererdungsproben deutet auf Wiederbesiedlung oder Wiedereintrag durch Vektoren hin.

Ebenso wie *E. coli* sowie *R. ornithinolytica* kommt *Pantoea agglomerans* in Fäkalien von Menschen und Tieren vor, auch auf Pflanzen und Samen. Er ist opportunistisch pathogen. Im Gegensatz zu den zwei Ersteren konnte bei *P. agglomerans* jedoch keine Wiederbesiedlung beobachtet werden.

Typische Keime der Bodenflora konnten nur nach der Vererdung in allen Feldern nachgewiesen werden. Durch den Vererdungsprozess entstehen völlig neue mikrobielle Ökosysteme. So wurden *Serratia marcescens* und *Lactobacillus spec.* nachgewiesen, die zuvor in keinem Ansatz gefunden worden sind, z.B. *Lactobacillus coryniformis*. *L. coryniformis* ist als Fungizidbildner (Magnusson, et al., 2001) bekannt und mit einer Konzentration von 5-6 log KBE/g eventuell auch mitverantwortlich für den sehr geringen Anteil von Pilzen in den Böden. Zudem wurde eine hohe Konzentration von *Clostridium tertium* ermittelt. Sie lag bei 5-6 log KBE/g in den Versuchsfeldern, exklusive der Kontrollen. *Clostridium tertium* gilt als aerotolerant und apathogen, kann jedoch bei immunsupprimierten Patienten zu einer Infektion führen (Thaler, et al., 1986).

### 4.1.2.3. Interpretation der Ergebnisse der Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung (FISH)

Der Vorteil der FISH-Methode liegt darin begründet, dass sie entgegen dem Plattenkulturverfahren die tatsächliche Zahl der im Untersuchungsmaterial enthaltenen Mikroorganismen in der jeweiligen Matrix abbildet. So ist es möglich unabhängig von den Kulturanforderungen der Keime die tatsächliche Keimzahl zu quantifizieren. Deutlich sieht man den Unterschied in

Abbildung 2i.) nach der Fermentation, wo die in der FISH metabolisch aktiven Eubacteriaceae um 1-3 Logstufen höher lagen als die kultivierbare Gesamtkeimzahl. Die in der DAPI-Färbung (Abb. 2j.) ermittelte Keimzahl aller Bakterien (lebend und tot) lag sogar um 2-4 Logstufen darüber. Durch die Markierung der metabolisch aktiven Bakterien ist es zudem auch möglich zu diskriminieren, ob die Keime in vegetativer Form vorkommen oder in inaktiver Form oder als Dauerstadien, wie Sporen verharren.

Aus Abb. 2i.) geht weiterhin hervor, dass die metabolische Aktivität zum Startzeitpunkt unterschiedlich ist. Die Ansätze EM und K/EM weisen die höchste Aktivität auf. Dies liegt vermutlich daran, dass die zugegebene EM-Suspension frisch angesetzt war, während Kanne – Fermentgetreide, da länger als 6 Monate fermentiert, nur moderat aktiv war, betrachtet man vergleichend die DAPI-Färbung 2j.). Mit der Fermentation steigt die Streuung der Werte unverhältnismäßig stark an, so dass eine oder mehrere Wiederholungen in jeder Versuchsreihe unter der Nachweisgrenze liege, andere deutlich darüber. Dies kann für eine ungleichmäßige Verteilung von aktiven Nestern in der Matrix sprechen. Ungewöhnlich erscheint es jedoch, dass bei dem Ansatz KANNE nach der Fermentation keine aktiven Eubacteriaceae über der Nachweisgrenze nachzuweisen waren. Vermutlich befand sich dieser Ansatz am Ende des Fermentationsprozesses. Der Ansatz K/KANNE zeigte demgegenüber eine hohe Aktivität, was möglicherweise auf den höheren Anteil von Sägespänen zurückzuführen ist. Betrachtet man jedoch die DAPI-Färbung liegen die Bakterienzahlen aller Proben über dem Niveau vor der Fermentation, dies deutet auf eine vorherige Zellvermehrung und eine anschließende Konservierung, möglicherweise durch den pH-Wert hin. Nach der Vererdung konnte nur in wenigen Poolproben eine metabolische Aktivität festgestellt werden. Das Gesamtkeimzahlniveau (DAPI-Färbung) lag einheitlich leicht unter dem Niveau nach der Fermentation.

### 4.2. Diskussion und Interpretation der Untersuchungen zur Tenazität von pathogenen Bakterien im Laborversuch

Nach bereits drei Tagen Bebrütung konnten keine der zugegebenen Pathogene mehr nachgewiesen werden, was für eine sehr geringe Tenazität unter diesen Bedingungen spricht. Dabei scheint der pH-Wert nicht der einzige ausschlaggebende Grund gewesen zu sein, der für die Abtötung der Pathogene beitrug. Der pH-Wert sank auf 4,1-4,5 (Werte nicht dargestellt), ein Bereich in dem z.B. *E. coli* noch Zellteilungen durchführen kann, solange andere Bedingungen nicht zusätzlich limitierend wirken, wie etwa eine Laktatkonzentration in der Umgebung die über 25-50 mM (ca. 2,25- 4,5g/l) beträgt (Presser, et al., 1998).

Um auszuschließen, dass unter optimalen Bedingungen kultivierte Bakterien eine geringere Tenazität besitzen als unter widrigen Bedingungen kultivierte, wurden die Pathogene 24h einem hypotonen Stress ausgesetzt. Hinsichtlich der Tenazität regierten die gestressten und ungestressten Erreger gleichlautend.

### 4.3. Diskussion und Interpretation der Untersuchungen zur Tenazität von ECBO-Viren im Laborversuch

Der Virustiter nahm bereits innerhalb weniger Tage deutlich ab. Nach sieben Tagen war er im Ansatz OEM nicht mehr nachweisbar, im Ansatz EM sank er von  $<3,98 \log \text{PbE/ml}$  auf  $<1,65 \log \text{PbE/ml}$ , nach 14 Tagen lag der Virustiter unter der Nachweisgrenze. Damit fand ein erfolgreicher Abbau der Viren schneller statt, als bei Monteith et.al. (1986) beschrieben. Bei unseren Untersuchungen wurden Keimträger verwendet und nicht die Gesamtmatrix untersucht wie in der Studie von 1986.

### 4.4. Diskussion und Interpretation der Untersuchungen zur Tenazität von *Ascaris suum* - Dauerstadien

Die Tenazität von Spulwurmeiern ist als sehr hoch anzusehen, sie beträgt mitunter mehrere Jahre auf Freilandflächen (Larsen, et al., 1999), bis zu 88 Tagen in Rindergülle (Ade-Kappelmann, 2008) und über 90 Tage in Klärschlämmen (Ghigliette, et al., 1997). Die vollständige Inaktivierung in dem dargestellten Versuch erfolgte zwischen der 3. und der 8. Woche. Wie O'Donnell. Et al. (1984) darstellte, ist der Absterbevorgang Temperatur- und Sauerstoffabhängig. Sie beobachtete jedoch eine vollständige Inaktivierung erst nach mehr als 15 Monaten bei 25°C sowie nur eine schwache Inaktivierung bei 4°C über 2 Jahre hinweg. Dabei stellte sie zudem eine schnellere Inaktivierung bei anaerober Behandlung fest. Daher kann man davon ausgehen, dass die anaerobe Bebrütung bei 36°C über 8 Wochen ausschlaggebend für die Inaktivierung war.

### 4.5. Diskussion und Interpretation zum Abbau von Sulfadiazin im Laborversuch

Hamscher (2006) schreibt, es gebe einen Zusammenhang zwischen der Absorbtionsfähigkeit des Bodens und dem Anteil des organischen Kohlenstoffes sowie des pH-Wertes. Es ist im Modell festgestellt worden, dass je nach Bodenart Sulfadiazin gebunden, immobilisiert und

damit unwirksam gemacht wird. So erscheint es wahrscheinlich, dass auch an einigen Teilen der Matrix und insbesondere an die Holzkohle Sulfadiazin adsorbiert. Somit wäre es dann auch erklärbar, dass direkt nach der Zugabe von 10mg/kg Wirkstoff nur noch 1,5 – 3mg/kg nachweisbar sind. Die Unterschiede zwischen den beiden geprüften Behandlungen sind nicht signifikant.

### 4.6. Diskussion zur Reifegradbestimmung der Terra Preta

#### 4.6.1. Diskussion der Eignung der elektronischen Nase

Die elektronische Nase stellte sich als nicht geeignet für die Messung des Reifegrades heraus, da es mit ihr nicht möglich war, die unterschiedlichen Zeitpunkte voneinander zu trennen. So ist in Abb. 8) die Überlappung der Punktemengen unterschiedlicher Farbe zu sehen bzw. dass die Werte in Tabelle 2 nicht nahe dem Wert 1 sind. Die menschliche Nase ist jedoch sehr wohl in der Lage, zwischen den einzelnen Zeitstufen zu unterscheiden. Sie nimmt selektiver Gerüche wahr. So riecht der Startansatz eindeutig fäkal, der fermentierte Ansatz immer säuerlich, doch je nach Zusammensetzung, mal stärker aromatisch ähnlich einer Silage in den Laboransätzen. Im größeren Maßstab war der Geruch eher stechend. Nach der Vererdung hingegen rochen die Feldproben alle sehr stark erdig-aromatisch, so ähnlich wie Regenwürmer im Transportmaterial.

#### 4.6.2. Diskussion zur Eignung der Laktat- Alkohol- und Gärssäurebestimmung als Maß für den Reifegrad der Ansätze

Aus Tabelle 3. wird deutlich, dass die Unterschiede in den Fermentationsprodukten des Laboransatzes in den einzelnen Ansätzen relativ gering sind. Lediglich zwischen OHK/OEM und HK/OEM ist die Konzentration der Buttersäure um den Faktor 2,76 unterschiedlich. Ein Unterschied in der Mikrobiota konnte bei diesen Ansätzen auch in der Laktobazillenkeimzahl festgestellt werden, so dass der geringe Anteil an Buttersäure in dem Ansatz OHK/OEM Folge oder Ursache für den Mangel an Laktobazillen sein könnte. Die Milchsäurekonzentration liegt bei allen Ansätzen mit einer Spanne von 3,7 bis 5,1 g/kg und damit als Hemmsubstanz über der Konzentration von 25-50 mM, die für eine Wachstumshemmung des Modellorganismus *E.coli* bei einem pH-Wert zwischen 4,1 und 4,5 notwendig ist (Presser, et al., 1998). Die pH-Wert-Senkung, die Laktatproduktion sowie die Produktion der anderen Fermentationsprodukte sind die ausschlaggebenden Gründe für die mikrobielle Populationsverschiebung.

In Tabelle 4 überraschten bei allen Ansätzen die sehr geringe Milchsäurekonzentration und die dafür umso höhere Essigsäurekonzentration. Die Ursachen der Unterschiede hierfür sind in der zu geringen Konzentration leicht fermentierbarer Kohlenstoffquellen zu suchen, da diese Ansätze mit Grassilage hergestellt worden waren, deren leicht fermentierbare Kohlenstoffverbindungen bereits verwertet waren. Dennoch fand auf der Basis der geringen Zugabe von Getreideschrot eine Absenkung des pH-Wertes statt, verursacht durch die Essigsäure. Eine Absenkung des pH-Wertes führt nach Untersuchungen von Barredo et al. (1991) zu einer Verstärkung der toxischen Wirkung von volatilen Fettsäuren auf methanogene Bakterien, ein ähnlicher Effekt wie er durch Laktat ausgeführt wird.

Die Feldansätze unterscheiden sich untereinander wenig, lediglich die Ansätze mit dem erhöhten Fäkalanteil weisen einen deutlich geringeren Alkoholanteil auf. Dies kann auf unterschiedliche Mikroorganismen hinweisen, jedoch konnten mit den verwendeten Methoden keine Unterschiede festgestellt werden.

Um die Einflussfaktoren auf das Fermentationsergebnis besser beurteilen zu können, wurden die Einflüsse der Fermentationstemperatur und der leicht verwertbaren Kohlenstoffquellen (lvK) geprüft. Die Tab. 5 fasst die Ergebnisse des Laborversuches II unter Verwendung der Mischungsverhältnisse aus dem Feldversuch sowie der Temperaturen aus Feldversuch und Laborversuch I zusammen. Der Getreideanteil wurde ggf. erhöht. Danach ist die Laktatproduktion substrat-, temperatur- und laktobazillenquellenkonzentrationsabhängig. Generell lässt sich feststellen, dass die Erhöhung der lvK mit einer erhöhten Laktatkonzentration einherging. Die Temperaturerhöhung führte lediglich bei dem Ansatz OEM – C zu einer erhöhten Laktatkonzentration, bei allen anderen Ansätzen eher zu einer Verringerung, da nach der Inkubationszeit unter 37°C der Bakterienstoffwechsel mit großer Sicherheit forciert ist, wird das Laktat dann von Laktatpaltern verwertet und ist dann nicht mehr nachweisbar. Bei den Ansätzen die anstelle der Kuhfäkalien Klärschlamm aus Haushalten enthielten, fiel auf, dass die Laktatbildung wesentlich geringer war, jedoch Buttersäure verstärkt gebildet wurde. Diese geht insbesondere auf den Stoffwechsel von Clostridien zurück. Der Ansatz mit dem Klärschlamm wurde nur am Rande betrachtet und die kulturell- mikrobiologischen Untersuchung bezog sich nur auf die gramnegative Gesamtkeimzahl sowie die Enterokokken. Beide Ergebnisse waren jedoch mit denen aus den anderen Ansätzen identisch.

Schlussfolgernd kann hier festgestellt werden, dass leicht abbaubare Kohlenstoffverbindungen eine wichtige Rolle spielen und dass Laktat nicht zwangsläufig das alleinige inhibierende

Fermentationsprodukt ist. Die erarbeiteten Zusammenhänge sollten in weiteren Versuchen zeitlich aufgelöst werden, um insbesondere die ersten 2 Wochen der Fermentation näher zu beleuchten.

#### 4.6.3. Eignung des pH-Wertes zur Beurteilung des Reifegrades

Die pH-Wert-Messung stellt neben der bakteriologischen Überprüfung eine sehr aussagekräftige und wenig aufwändige Methode dar, um etwas über den Reifegrad der Terra Preta aussagen zu können. Mit der Fermentation steigt die Azidität je nach Versuchsansatz relativ zügig an. Parallel dazu verändert sich auch das Keimspektrum. Je nach Art und Zustand der zu hygienisierenden Matrices, müssen über eine noch zu definierte Zeitspanne Anaerobiose sowie erniedrigte pH-Werte aufrecht erhalten werden.

### 5. Fazit

Die Terra Preta-Technologie, die die Prozessschritte Komponentenmischung, Fermentation und Vererdung involviert, ist geeignet, fäkale Abfälle aus veterinärmedizinischen Kliniken, die sowohl pathogene Erreger (Bakterien, Pilzen Viren, Parasitenstadien), Medikamente als auch schwer abbaubare Materialien wie Holzspäne enthalten, in einen Zustand zu überführen, von dem keine Infektiosität mehr ausgeht. Weiterhin konnte in einem ersten Versuch mit dem Sulfonamid Sulfadiazin gezeigt werden, dass dieses innerhalb kurzer Zeit zum größten Teil absorbiert wird. Die in den Abfällen enthaltenen Holzspäne wurden während der Vererdung abgebaut. Pathogene Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Anatum, die besonders widerstandsfähige *Salmonella* Senftenberg, der säuretolerante (Cheung, 2003) *E. coli* O157 und *Staphylococcus aureus* werden innerhalb von 3 Tagen inaktiviert. Viren am Beispiel der sehr widerstandsfähigen ECBO-Viren, die für Desinfektionsmittelprüfungen verwendet werden, werden innerhalb von 7 bis 14 Tagen, Spulwurmeier innerhalb von 8 Wochen inaktiviert, wobei das Zeitfenster zwischen der 4. und 8. Woche nicht näher beprobt wurde. Zur Beurteilung der erfolgreichen Fermentation genügt nach dem aktuellen Stand der Untersuchungen eine einfache, kostengünstige pH-Wert-Messung. Die Feststellung der endgültigen Terra Preta-Reife bedarf noch weiterer Untersuchungen. Die Bewertung der Daten zum Einfluss der erzeugten Terra Preta-Varianten auf die Bodenfruchtbarkeit am Beispiel von Zuckermais ergaben entgegen der Literatur (Steiner, et al., 2009) (Glaser, 2007) keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollfeldern. (Ergebnisse nicht dargestellt) Als Ursache kann

der Einfall von Rabenvögeln in die randständigen Kontrollfelder angesehen werden (vermutl. *Corvus corax*). Dadurch wurden zahlreiche Maispflanzen zerstört, so dass für den Vergleich mit den Terra Preta-Flächen nur wenige Pflanzen zur Verfügung standen. Weiterhin wurde der gesamte Maisbestand durch Befall mit dem Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) sowie Maisbeulenbrand (*Ustilago maydis*) stark geschädigt.

**Literaturverzeichnis**

- Ade-Kappelmann, Katja. 2008.** Untersuchungen zur seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Gärresten aus Bioabfällen nach der von Gärresten aus Bioabfällen nach der. *INAUGURAL-DISSERTATION Veterinärmedizin Freie Universität Berlin*. Journal-Nr. 3255, 2008.
- Ahmed, Iftikhar, et al. 2007.** Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2007, Bde. 1117-1125, DOI 10.1099/ij.s.0.63867-0.
- Austin, B. 1989.** Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 1989, Bd. 67, DOI: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb02517.x.
- Barredo, M. S. und Evison, L. M. 1991.** Effect of Propionate Toxicity on Methanogen-Enriched Sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at Different pH Values. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 57, 1991, Bde. 1764-1769.
- Bauwens, M und de Ley, J. 1981.** Improvements in taxonomy of *Flavobacterium* by DNA: rRNA hybridizations. In the *Flavobacterium-Cytophaga* Group. *Weinheim: Verlag Chemie*. ed, Weeks, O B., 1981.
- Bernlohr, Robert W. und Novelli, G D. 1960.** Some characteristics of bacitracin production by *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1960, Bd. 87, 232-238.
- Buck, J D und Meyers, S P. 1965.** Antiyeast activity in marine environments: ecological considerations. *Limnology and Oceanography*. 10, 1965, 385-391.
- . 1966. In vitro' inhibition of *Rhodotorula minuta* by a variant of the marine bacterium *Pseudomonas piscicida*. *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*. 13, 1966, 181-187.
- Buck, J D, et al. 1963.** Inhibition of yeasty by marine bacterium. *Journal of Bacteriology*. 58, 1963, 1132-1135.
- Buck, J D, Meyers, S P und Kamp, K M. 1962.** Marine bacteria with antiyeast activity. *Science*. 138, 1962, 1339-1340.
- Cheung, Chi-Yeun. 2003.** Charakterisierung der Säureresistenz von verotoxinbildenden *Escherichia coli* (VTEC) und ihre Bedeutung bei der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen. *Dissertation Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin*. 2003.
- Conn, Vanessa M. und Franco, Christopher M.M. 2004.** Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. DOI: 10.1128/AEM.70.3.1787-1794.2004, 2004.
- Dantas, Gautam, et al. 2008.** Bacteria Subsisting on Antibiotics. *Science*. 320, 2008, DOI: 10.1126/science.1155157.
- Fuchs, Anna-Riitta und Bonde, G J. 1957.** The Nutritional Requirements of *Clostridium perfringens*. *Journal of General Microbiology*. 16, 1957, Bde. 317-329, DOI 10.1099/00221287-16-2-317.
- Ghigliette, Roberta, et al. 1997.** SURVIVAL OF ASCARIS SUUM EGGS IN AMMONIATREATED WASTEWATER SLUDGES. *Bioresource Technology*. 59, 1997, Bde. 195-198.
- Glaser, Bruno. 2007.** Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 362, 187-196, 2007, doi:10.1098/rstb.2006.1978.

- Glathe, H., Knoll, K. H. und Makawi, A. A. 1962.** Das Verhalten von Salmonellen in verschiedenen Bodenarten. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde Band 100 Heft 3.* 1962, S. 224-233.
- Hamscher, Gerd. 2006.** Tierarzneimittel in der Umwelt: Vorkommen, Verhalten, Risiken. [Buchverf.] Fritz H. Frimmel und B. Margit Müller. *Heil-Lasten Arzneimittelrückstände in Gewässern.* Heidelberg : Springer-Verlag, 2006.
- Hamscher, Gerd, et al. 2004.** DIFFERENT BEHAVIOR OF TETRACYCLINES AND SULFONAMIDES IN SANDY. *Environmental Toxicology and Chemistry*,. 2004, Vol. 24, No. 4, pp. 861–868, 2005.
- Jiang, Xiuping, Morgan, Jennie und Doyle, Michael P. 2002.** Fate of Escherichia coli O157:H7 in Manure-Amended Soil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 2002.
- Katzenelson, E. 1978.** Survival of viruses: Indicators of Viruses in Water and Food. *Ann Arbor: University of Michigan Press.* ed. Berg G., 1978, 39-50.
- Krassilnikova, E N. 1961.** Antibiotic properties of micro-organisms isolated from various depths of world oceans. *Mikrobiologiya.* 30, 1961, 545-550.
- Larsen, M. N. und Roepstorff, A. 1999.** Seasonal variation in development and survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs on pastures. *Parasitology Cambridge.* 119, 1999, Bde. 209-220, doi: 10.1017/S0031182099004503.
- Linde, Klaus. 1981.** Hochimmunogene Salmonella-Mutanten mit zwei unabhängig voneinander attenuierenden Markern als potentielle Impfstoffe aus vermehrungsfähigen Bakterien. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* 249, 1981, 350-361.
- Linde, Klaus, Beer, J. und Bondarenko, V. 1990.** Stable Salmonella live vaccine strains with two or more attenuating mutations and any desired level of attenuation. *Vaccine.* 8, 1990, 278-282.
- Magnusson, Jesper und Schnürer, Johan. 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 67, 2001, Bde. 1-5, DOI: 10.1128/AEM.67.1.1–5.2001.
- Minamisawa, Kiwamu, et al. 2004.** Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia Isolated. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. DOI: 10.1128/AEM.70.5.3096–3102.2004, 2004.
- Monteith, H. D., Shannon, E. E. und Derbyschire, J. B. 1986.** The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. *Journal of Hygiene Cambridge.* 97, 1986, Bde. 175-184, doi: 10.1017/S0022172400064457 .
- O'Donnell, Cathlene J, et al. 1984.** Survival of Parasite Eggs Upon Storage in Sludge. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 48, 1984, Bde. 618-625.
- Okami, Yoshiro. 1986.** Marine Microorganisms as a Source of Bioactive Agents. *Microbial Ecology.* 12, 1986, 65-78.
- Pouillard, J. 2002.** A forgotten discovery: doctor of medicine Ernest Duchesne's thesis (1874-1912). *Hist Sci Med.* 2002, Bd. 36, PMID: 12094813 .
- Presser, K. A., Ross, T. und Ratkowsky, D. A. 1998.** Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 64, 1998, Bde. 1773–1779.
- Rosenfeld, William D. und ZoBell, Claude E. 1947.** Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of bacteriology.* 1947, Bd. 54, 393-398.
- Scheldeman, Patsy, et al. 2004.** *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54, 2004, Bde. 885-891, DOI 10.1099/ij.s.0.02822-0.

- Schikora, Adam, et al. 2008.** The Dark Side of the Salad: Salmonella typhimurium Overcomes the Innate Immune Response of Arabidopsis thaliana and Shows an Endopathogenic Lifestyle. *PLoS ONE*. e2279. doi:10.1371/journal.pone.0002279, 2008, 3(5).
- Steiner, C., Teixeira, W. G. und Zech, W. 2009.** The Effect of Charcoal in Banana (Musa Sp.) Planting Holes – An On-Farm Study in Central Amazonia, Brazil. [Buchverf.] William I. Woods, et al. *Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision*. s.l. : Springer Verlag, 2009, S. 423-432.
- Tanasupawat, Somboon, et al. 2000.** Lactobacillus acidipiscis sp. nov. and Weissella thailandensis sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 2000, Bde. 1479–1485.
- Thaler, Michael, Gill, Vee und Pizzo, Philip A. 1986.** Emergence of Clostridium tertium as a Pathogen in Neutropenic Patients. *The American Journal of Medicine*. 81, 1986, Bde. 596-600.
- Thies, Kerstin. 2003.** Tiergesundheit und seuchenhygienische Aspekte bei extensiver Schweinefreilandhaltung im Rahmen der Landschaftspflege. Hannover : INAUGURAL-DISSERTATION, 2003. Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Toranzao, E, Baraja, J L und Heterick, F M. 1982.** Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 28, 1982, 231-238.
- Tyler, Heather L. und Triplett, Eric W. 2008.** Plants as a Habitat for Beneficial and/or human Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2008, 46.
- Urban, G. und Pottenstein, H. 1950.** Untersuchung über die Penicillinausscheidung. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Volume 212, 1950, Bde. 1-2, DOI: 10.1007/BF00245670.
- Walter, R. 2000.** *Umweltvirologie, Viren in Wasser und Boden*. Wien : Springer Verlag, 2000. S. 33-35. ISBN 3-211-83345-5.

Fotoimpressionen



Foto 8.) Versuchsfelder kurz nach der Fermentation bestückt 8.April 2010



Foto 9.) Kontrollfeld am 5. Juli 2010, lediglich 3 von 9 Pflanzen sind aufgegangen



Foto 10.) Versuchsfeld am 5. Juli 2010 lediglich 5 von 9 Pflanzen sind aufgegangen



Foto 11.) Versuchsfeld am 12. Juli 2010 die nachgesetzten Neupflanzen sind deutlich kleiner (rechte Reihe)



Foto 12.) Versuchsfeld am 23. Juli 2010



Foto 13.) Versuchsfeld vom 29. Juli.2010



Foto 14.) Versuchsfeld am 19.08.2010



Foto 15.) Versuchsfelder nach der Ernte (Aufgenommen am 11.11.2010)



Foto 16.) Versuchsfeld nach der Ernte, mit Holzkohlezuschlag (Aufgenommen am 11.11.2010)



Foto 17.) Versuchsfeld nach der Ernte, ohne Holzkohlezuschlag (Aufgenommen am 11.11.2010)

**Anhang:**

Tab. 6.) Laboransatz 1 Keimzahlen zum Startzeitpunkt, den Nährmedien nach geordnet, Entnahme aus den Mischgefäßen

t0	aerob	anaerob	Gassner	CATC	MRS	Sab	aerob	anaerob	Gassner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut					Blut	Blut				
	dekadischer Logarithmus											
<b>HK/OEM</b>	7,00E+08	5,55E+08	2,40E+06	7,65E+05	4,80E+07	5,95E+05	8,84509804	8,74429298	6,38021124	5,88366144	7,68124124	5,77451697
<b>OHK/OEM</b>	1,20E+08	3,70E+08	4,00E+06	2,00E+06	6,65E+07	1,15E+04	8,07918125	8,56820172	6,60205999	6,30103	7,82282165	4,06069784
<b>OHK/EM</b>	1,85E+08	1,55E+08	1,00E+06	9,00E+05	2,95E+07	2,15E+04	8,26717173	8,1903317	6	5,95424251	7,46982202	4,33243846
<b>HK/EM</b>	1,85E+08	1,10E+08	4,15E+05	7,00E+05	3,25E+07	2,90E+05	8,26717173	8,04139269	5,6180481	5,84509804	7,51188336	5,462398
							0	0	0	0	0	0

Anhang:

Tab. 7.) Laboransatz 1 Keimzahlen, den Nährmedien nach geordnet, 3 Wochen fermentiert

t1	aerob	anaerob	Gass- ner	CATC	MRS	Sab	aerob	anaerob	Gass- ner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut					Blut	Blut				
	dekadischer Logarithmus											
<b>OHK/OEM 1</b>	1,75E+05	8,00E+04	1	1	2,25E+05	1,00E+00	5,24303805	4,90308999	0	0	5,35218252	0
<b>OHK/OEM 2</b>	1,40E+05	5,00E+04	1	1	1,10E+05	1,00E+00	5,14612804	4,69897	0	0	5,04139269	0
<b>OHK/OEM 3</b>	1,35E+05	1,40E+05	1	1	3,30E+04	1,00E+00	5,13033377	5,14612804	0	0	4,51851394	0
<b>OHK/OEM 4</b>	2,10E+05	4,40E+05	1	1	1,48E+06	1,00E+00	5,32221929	5,64345268	0	0	6,16879202	0
<b>MW</b>	1,65E+05	1,78E+05	1,00E+00	1,00E+00	4,61E+05	1,00E+00	5,21E+00	5,10E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,27E+00	0,00E+00
<b>STABW</b>	3,49E+04	1,79E+05	0,00E+00	0,00E+00	6,81E+05	0,00E+00	8,96E-02	4,07E-01	0,00E+00	0,00E+00	6,91E-01	0,00E+00
	aerob	anaerob	Gass- ner	CATC	MRS	Sab	aerob	anaerob	Gass- ner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut					Blut	Blut				
<b>OHK/EM1</b>	3,20E+05	1,30E+05	1	1	3,00E+03	1	5,50514998	5,11394335	0	0	3,47712125	0
<b>OHK/EM2</b>	4,10E+05	1,90E+05	1	1	5,20E+04	1	5,61278386	5,2787536	0	0	4,71600334	0
<b>OHK/EM3</b>	3,15E+05	1,40E+05	1	1		1	5,49831055	5,14612804	0	0		0
<b>OHK/EM4</b>	2,00E+05	2,20E+05	1	1	7,00E+03	1	5,30103	5,34242268	0	0	3,84509804	0
<b>MW</b>	3,11E+05	1,70E+05	1,00E+00	1,00E+00	2,07E+04	1,00E+00	5,48E+00	5,22E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,01E+00	0,00E+00
<b>STABW</b>	8,61E+04	4,24E+04	0,00E+00	0,00E+00	2,72E+04	0,00E+00	1,30E-01	1,08E-01	0,00E+00	0,00E+00	6,36E-01	0,00E+00

Anhang:

	aerob	anaerob	Gass- ner	CATC	MRS	Sab	aerob	anaerob	Gass- ner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut					Blut	Blut				
	dekadischer Logarithmus											
<b>HK/OEM1</b>	1,60E+05	2,35E+05	1	1	1,45E+04	1,00E+00	5,20411998	5,37106786	0	0	4,161368	0
<b>HK/OEM2</b>												
<b>HK/OEM3</b>	2,40E+05	1,10E+05	1	1	8,60E+04	1,00E+00	5,38021124	5,04139269	0	0	4,93449845	0
<b>HK/OEM4</b>	2,20E+05	1,70E+05	1	1	9,20E+04	1,00E+00	5,34242268	5,23044892	0	0	4,96378783	0
<b>MW</b>	2,07E+05	1,72E+05	1,00E+00	1,00E+00	6,42E+04	1,00E+00	5,31E+00	5,21E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,69E+00	0,00E+00
<b>STABW</b>	4,16E+04	6,25E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,31E+04	0,00E+00	9,27E-02	1,65E-01	0,00E+00	0,00E+00	4,55E-01	0,00E+00
	Aerobe GKZ	Anaero- be GKZ	Gassner	CATC	MRS	Sab						
<b>HK/EM1</b>	1,65E+05	6,00E+04	1	1	9,00E+03	1,00E+00	5,21748394	4,77815125	0	0	3,95424251	0
<b>HK/EM2</b>	2,30E+05	1,15E+05	1	1	3,00E+03	1,00E+00	5,36172784	5,06069784	0	0	3,47712125	0
<b>HK/EM3</b>	1,35E+05	5,00E+04	1	1	3,00E+03	1,00E+00	5,13033377	4,69897	0	0	3,47712125	0
<b>HK/EM4</b>					1,00E+03							
<b>MW</b>	1,77E+05	7,50E+04	1,00E+00	1,00E+00	4,00E+03	1,00E+00	5,24E+00	4,85E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,64E+00	0,00E+00
<b>STABW</b>	4,86E+04	3,50E+04	0,00E+00	0,00E+00	3,46E+03	0,00E+00	1,17E-01	1,90E-01	0,00E+00	0,00E+00	2,75E-01	0,00E+00

Anhang:

Tab. 8.) Laboransatz 1 Keimzahlen, den Nährmedien nach geordnet, 8 Wochen fermentiert, rot dargestellte Werte wurden als Ausreißer nicht Berücksichtigt

t2	aerob	anae-rob	Gassner	CATC	MRS	Sab		aerob	anaerob	Gassner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut						Blut	Blut				
dekadischer Logarithmus													
<b>OHK/OE M1</b>	1,15E+05	6,00E+04	1	1	2,00E+04	1		5,06069784	4,77815125	0	0	4,30103	0
<b>OHK/OE M2</b>	2,05E+05	1,15E+05	1	1	-	1		5,31175386	5,06069784	0	0		0
<b>OHK/OE M3</b>	1,40E+05	1,70E+05	1	1	2,35E+04	1		5,14612804	5,23044892	0	0	4,37106786	0
<b>OHK/OE M4</b>	1,55E+05	8,00E+04	1	1	-	1		5,1903317	4,90308999	0	0		0
<b>MW</b>	<b>1,54E+05</b>	<b>1,06E+05</b>	<b>1,00E+00</b>	<b>1,00E+00</b>	<b>1,45E+04</b>	<b>1,00E+00</b>		<b>5,18E+00</b>	<b>4,99E+00</b>	<b>0,00E+00</b>	<b>0,00E+00</b>	<b>2,89E+00</b>	<b>0,00E+00</b>
<b>STABW</b>	3,79E+04	4,82E+04	0,00E+00	0,00E+00	2,47E+03	0,00E+00		1,05E-01	1,96E-01	0,00E+00	0,00E+00	4,95E-02	0,00E+00
	aerob	anae-rob	Gassner	CATC	MRS	Sab		aerob	anaerob	Gassner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut						Blut	Blut				
<b>OHK/EM1</b>	9,50E+04	1,45E+05	1	1	1,00E+04	1		4,97772361	5,161368	0	0	4	0
<b>OHK/EM2</b>	5,00E+05	1,90E+05	1	1	-	1		5,69897	5,2787536	0	0		0
<b>OHK/EM3</b>	2,05E+05	9,00E+04	1	1	9,00E+04	1		5,31175386	4,95424251	0	0	4,95424251	0
<b>OHK/EM4</b>	1,00E+05	8,00E+04	1	1	2,00E+04	1		5	4,90308999	0	0	4,30103	0
<b>MW</b>	<b>2,25E+05</b>	<b>1,26E+05</b>	<b>1,00E+00</b>	<b>1,00E+00</b>	<b>4,00E+04</b>	<b>1,00E+00</b>		<b>5,25E+00</b>	<b>5,07E+00</b>	<b>0,00E+00</b>	<b>0,00E+00</b>	<b>4,42E+00</b>	<b>0,00E+00</b>
<b>STABW</b>	1,90E+05	5,12E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,36E+04	0,00E+00		3,38E-01	1,76E-01	0,00E+00	0,00E+00	4,88E-01	0,00E+00

Anhang:

	aerob	anae- rob	Gassner	CATC	MRS	Sab		aerob	anaerob	Gassner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut						Blut	Blut				
dekadischer Logarithmus													
HK/OEM1	9,50E+04	1,45E+05	1	1	1,00E+04	1		4,97772361	5,161368	0	0	4	0
HK/OEM2	1,80E+05	5,00E+04	1	1	-	1		5,25527251	4,69897	0	0		0
HK/OEM3	2,05E+05	9,00E+04	1	1	9,00E+04	1		5,31175386	4,95424251	0	0	4,95424251	0
HK/OEM4	1,00E+04	8,00E+04	1	1	2,00E+04	1			4,90308999	0	0	4,30103	0
MW	1,23E+05	9,13E+04	1,00E+00	1,00E+00	4,00E+04	1,00E+00		5,18E+00	4,93E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,42E+00	0,00E+00
STABW	8,86E+04	3,97E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,36E+04	0,00E+00		1,79E-01	1,90E-01	0,00E+00	0,00E+00	4,88E-01	0,00E+00
	aerob	anae- rob	Gassner	CATC	MRS	Sab		aerob	anaerob	Gassner	CATC	MRS	Sab
	Blut	Blut						Blut	Blut				
HK/EM1	1,10E+05	3,00E+04	1	1	9,00E+04	1		5,04139269	4,47712125	0	0	4,95424251	0
HK/EM2	1,30E+05	9,00E+04	1	1	1,10E+04	1		5,11394335	4,95424251	0	0	4,04139269	0
HK/EM3	2,15E+05	7,50E+04	1	1	9,00E+03	1		5,33243846	4,87506126	0	0	3,95424251	0
HK/EM4	9,00E+04	4,00E+04	1	1	7,00E+03	1		4,95424251	4,60205999	0	0	3,84509804	0
MW	1,36E+05	5,88E+04	1,00E+00	1,00E+00	2,93E+04	1,00E+00		5,11E+00	4,73E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,20E+00	0,00E+00
STABW	5,50E+04	2,84E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,05E+04	0,00E+00		1,62E-01	2,25E-01	0,00E+00	0,00E+00	5,10E-01	0,00E+00

Anhang:

Tab. 9.) Embryonierungsraten der Spulwürmer im Zeitverlauf

	Woche1	Woche2	Woche3
<b>OEM 1</b>	64,24	95,51	0
<b>OEM 2</b>	75,22	97,22	0
<b>OEM 3</b>	95,04	97,75	0
<b>EM 1</b>	91,12	96,94	0
<b>EM 2</b>	87,12	97,37	0
<b>EM 3</b>	96,43	96	0

Tab. 10.) Keimzählung FISH-Sonde Eub und der Dapi-Färbung logarithmiert zur Basis 10

Name	Eub	Eub	Eub	Dapi	Dapi	Dapi
	t0	t1	t2	t0	t1	t2
<b>OEM1</b>	7,9	7,66	5	9,16	9,15	9,05
<b>OEM2</b>	6,88	7,83		8,89	9,13	
<b>OEM3</b>		5			9,05	
<b>OEM4</b>	7,53	9,19		9,1	9,68	
<b>OHK_OEM1</b>	6,66	5	5	8,85	9,01	8,9
<b>OHK_OEM2</b>	8,35	9		8,84	9,48	
<b>OHK_OEM3</b>	8,2	8,68		8,94	9,49	
<b>OHK_OEM4</b>	5,75	8,98		7,97	9,52	
<b>EM1</b>	8,15	8,26	7,6	9,15	9,33	7,6
<b>EM2</b>	7,78	8,2		9,22	9,6	
<b>EM3</b>	8,19	5		9,27	9,5	
<b>EM4</b>	8,33	7,66		9,28	9,43	
<b>KANNE1</b>	7,45	5	7,23	8,71	9,51	8,77
<b>KANNE2</b>	7,45	5		9,05	9,3	
<b>KANNE3</b>	7,05	5		8,84	9,44	
<b>KANNE4</b>		5			9,4	
<b>K_EM1</b>	8,18	8,82	5	8,88	9,33	8,94
<b>K_EM2</b>	8,56	8,61		7,84	9,41	
<b>K_EM3</b>	5,75	5		8,71	9,25	
<b>K_KANNE1</b>	7,23	8,4	8,21	8,4	8,2	8,88
<b>K_KANNE2</b>	5,75	7,83		8,45	9,27	
<b>K_KANNE3</b>	6,75	5		8,97	9,53	
<b>K_OEM1</b>	7,45	5	5	8,97	9,19	8,64
<b>K_OEM2</b>	5,75	5		8,97	8,99	
<b>K_OEM3</b>	5,75	7,79		8,97	9,06	
<b>Ko+Wurm</b>			5			8,01
<b>Ko-Wurm</b>			5			5

Tab. 11.) In vitro-Keimkonzentrationen der Pathogenen unter verschiedener Anzuchtbedingungen

Spezies	Normal	Stress
<i>L. monocytogenes</i>	7,99	6,48
<i>S. aureus</i>	7,74	7,79
<i>E.coli</i> O:157	7,40	7,30
<i>S. anatum</i>	6,86	7,35

Tab. 12.) In vitro-Keimkonzentrationen der Pathogenen im Zeitverlauf

<i>L. monocytogenes</i>		
	Start	3 Tage
<b>OHK/OEM</b>	7,99	0
<b>OHK/EM</b>	7,99	0
<b>HK/OEM</b>	7,99	0
<b>HK/EM</b>	7,99	0
<i>S. aureus</i>		
<b>OHK/OEM</b>	7,74	0
<b>OHK/EM</b>	7,74	0
<b>HK/OEM</b>	7,74	0
<b>HK/EM</b>	7,74	0
<i>E.coli</i> O:157		
<b>OHK/OEM</b>	7,40	0
<b>OHK/EM</b>	7,40	0
<b>HK/OEM</b>	7,40	0
<b>HK/EM</b>	7,40	0
<i>S.Anatum</i>		
<b>OHK/OEM</b>	6,86	0
<b>OHK/EM</b>	6,86	0
<b>HK/OEM</b>	6,86	0
<b>HK/EM</b>	6,86	0
<i>S. Senftenberg</i>		
<b>HK/EM</b>	7,98	0
<b>HK/OEM</b>	7,98	0

Anhang:

Tab. 13.) pH-Werte – vom Feldansatz vor und nach 4 Wochen Fermentation.

<b>t0</b>							
	<b>EM</b>	<b>OEM</b>	<b>OHK/OEM</b>	<b>Kanne</b>	<b>K/EM</b>	<b>K/Kanne</b>	<b>K/OEM</b>
	6,44	5,92	7	6,32	7,22	7,22	7,29
	6,41	6,75	7,17	6,31	7,14	7,28	7,31
	6,32	6,42	6,77	6,49	7,2	7,24	7,19
	6,26	6,81	7,32	6,37			
<b>MW</b>	6,3575	6,475	7,065	6,3725	7,18666667	7,24666667	7,26333333
<b>SA</b>	0,08261356	0,40779897	0,23614967	0,08261356	0,04163332	0,0305505	0,06429101
<b>t1</b>							
	<b>EM</b>	<b>OEM</b>	<b>OHK/OEM</b>	<b>Kanne</b>	<b>K/EM</b>	<b>K/Kanne</b>	<b>K/OEM</b>
	5,03	5,19	5,23	5,13	5,38	5,22	5,44
	5,2	5,24	5,14	5,31	5,4	5,13	5,47
	5,01	5,32	5,11	5,24	5,55	5,13	5,54
	5,27	5,36	5,06	5,16			
<b>MW</b>	5,1275	5,2775	5,135	5,21	5,44333333	5,16	5,48333333
<b>SA</b>	0,12763881	0,07675719	0,07141428	0,08124038	0,09291573	0,05196152	0,05131601
	<b>EM</b>	<b>OEM</b>	<b>OHK/OEM</b>	<b>Kanne</b>	<b>K/EM</b>	<b>K/Kanne</b>	<b>K/OEM</b>
<b>t0</b>	6,3575	6,475	7,065	6,3725	7,18666667	7,24666667	7,26333333
<b>t1</b>	5,1275	5,2775	5,135	5,21	5,44333333	5,16	5,48333333

Anhang:

Tab 14.) Sulfadiazinkonzentrationen, links OEM - rechts EM von oben nach unten Zeitschritte in Wochen 0,1,2 und 3

OEM		EM	
Probe	SDZ [mg/kg]	Probe	SDZ [mg/kg]
FTn_0_1_100520	1,56	FTa_0_1_100527	2,03
FTn_0_2_100520	1,67	FTa_0_2_100527	3,15
FTn_0_3_100520	1,55	FTa_0_3_100527	1,94
<b>MW</b>	<b>1,59</b>	<b>MW</b>	<b>2,37</b>
SA	0,07	SA	0,67
FTn_1_1_100520	0,89	FTa_1_1_100527	0,98
FTn_1_2_100520	0,51	FTa_1_2_100527	0,49
FTn_1_3_100520	0,28	FTa_1_3_100527	0,94
<b>MW</b>	<b>0,56</b>	<b>MW</b>	<b>0,80</b>
SA	0,31	SA	0,27
FTn_2_1_100520	0,23	FTa_2_1_100527	0,79
FTn_2_2_100520	0,45	FTa_2_2_100527	0,47
FTn_2_3_100520	0,52	FTa_2_3_100527	0,57
<b>MW</b>	<b>0,40</b>	<b>MW</b>	<b>0,61</b>
SA	0,15	SA	0,16
FTn_3_1_100520	0,33	FTa_3_1_100527	0,20
FTn_3_2_100520	0,30	FTa_3_2_100527	0,49
FTn_3_3_100520	0,33	FTa_3_3_100527	0,82
<b>MW</b>	<b>0,32</b>	<b>MW</b>	<b>0,50</b>
SA	0,02	SA	0,31

Tab. 15.) Keimzahlen – vom Feldansatz vor, nach 4 Wochen Fermentation sowie nach 10 wöchiger Vererdung, logarithmiert zur Basis 10

Anhang:

	aerobe Gesamtkeimzahl			anaerobe Gesamtkeimzahl			gramnegative Gesamtkeimzahl			Enterokokkenzahl			Laktobazillen- zahl			Pilzzahl			Clostridienzahl (auf Neo-Agar)			Sporenbildene sulfidre- duzierer		
	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2
EM	7,9	5,44	8	7,08	4,93	7,85	4,18	3	5,9	4,95	3	3,48	7,7	4,53	5,16	6,73	3	3	3	3	5,98	2,36	2,78	6,18
EM	7,88	5,24		8,18	5,11		4,9	3		5	3		8,2	4,48		7,18	3		3	3		2,32	2,48	
EM	7,9	5,2		7,69	5,24		5,08	3		4,7	3		8,34	5,79		6,11	3		3	3		2,18	2,48	
EM		4,88		7,31	4,9		4,6	3		4,2	3		7,3	5,88		7,05	3		3	3		1,96	3,18	
K/EM	7,4	4,98	8,19	7,31	5,13	8,48	5,9	3	5,62	5,52	3	3,7	6,48	4,39	5,42	4,16	3	3	3	3	5,93	1,56	0	6,65
K/EM	7,68	4,93		7,9	4,7		5,21	3		5,36	3		6,45	3,98		4,18	3		3	3		1,48	0	
K/EM	8,13	4,8		8,28	4,93		5,33	3		5,48	3		6,46	3,85		4,29	3		3	3		1,56	1,85	
K/KANNE	8,79	5,28	8,31	7,48	4,7	8,1	4,04	3	5,78		3	3	6,9	3	5,53	4,18	3	3,3	3	3	6,4	1,56	1,6	6,4
K/KANNE	7,95	5		7	4,78		5,61	3		6,62	3		7	3,48		4,16	3		3	3		1,96	1,6	
K/KANNE	7,48	5		7,36	5,26		6,04	3		5,85	3		6,85	4,15		4,41	3		3	3		1,56	0	
K/OEM	7,93	5,42	8,18	7,44	5,06	7,85	5,04	3	4,48	5,44	3	3,9	6,33	4,52	5,88	4,45	3	3,6	3	3	6,57	0	1,48	7,98
K/OEM	7,79	5,42		7,85	5,78		5,02	3		5,33	3		6,1	3,78		5,1	3		3	3		1,96	2,18	
K/OEM	7,8	5,34		7,95	5,3		5	3		5,68	3		6,68	4,89		4,62	3		3	3		1,96	1,6	
KANNE	6,95	5,62	8,37	6,19	5,48	7,85	5,04	3	6,08	4,58	3	3,48	6,32	3	6,19	5,98	3	3,7	3	3	6,93	2,36	2,18	5,98
KANNE		5,52		6,75	5,6		4,49	3		3,6	3		6,37	5,6		7,13	3		3	3		1,56	2,18	
KANNE	6,93	5,65		6,1	5,48		4,95	3			3		7,18	3		6,79	3		3	3		1,96	3,18	
KANNE		5,6		6,9	5,6		4,85	3		5,18	3		6,7	4,6		6,35	3		3	3		1,56	2,65	
Ko-Wurm			5			5,6			3			3			4,08			2,65			3			2,65
Ko+Wurm			6,93			6,3			3			3			4,41			2,88			3			2,88

## Anhang:

	aerobe Gesamtkeimzahl			anaerobe Gesamtkeimzahl			gramnegative Gesamtkeimzahl			Enterokokkenzahl			Laktobazillen- zahl			Pilzzahl			Clostridienzahl (auf Neo-Agar)			Sporenbildene sulfidre- duzierer		
	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2
OEM	7,1 5	5,36	8	8,24	5,24	8,2 9	4,85	3	5,83	4,6 1	3	5,2	6,8 8	4	7,3 5	6,3 7	3	3,4 8	3	3	4,9 8	2,36	2,08	6,9 8
OEM	7,5 1	5,2		7,34	5,18		5	3		5,4 6	3		7,4 5	3,6		7,3 1	3		3	3		2,18	2,9	
OEM		5,15		6,95	5		4,85	3		4,8 2	3		7,0 6	4,0 8		6,6 9	3		3	3		2,36	2,6	
OEM	7,3 2	5,16		7,43	5,33		5,04	3		5,1 8	3		7,0 6	5,5 6		6,3 2	3		3	3		1,56	3,18	
OHK/ OEM	7,0 6	5,45	7,8 5	8,24	5,41	7,3	5,26	3	5,75	5,7 9	3	3	6,4 5	3	6,1 3	5,9 1	3	3,4 8	3	3	5,9 8	2,63	2,08	5,9 8
OHK/ OEM		5,48		7,11	5,27		5,02	3		5,5 3	3		6,2 9	5,3 7		5,1 8	3		3	3		2,36	2,9	
OHK/ OEM		5,93		7,77	5,22		5,48	3		5,6 4	3		6,6 5	5,4		6,1	3		3	3		2,36	2,6	
OHK/ OEM	7,8 1	5,6		7,75	4,93		5,31	3		5,5 1	3		7,0 4	4,6 3		6,0 4	3		3	3		1,96	3,18	