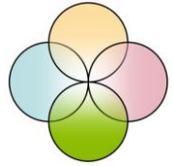


Institut für Bakteriologie u. Mykologie An den Tierkliniken 29 D-04103 Leipzig  
Direktorin: Prof. Dr. M. Krüger

**Veterinärmedizinische Fakultät**  
**Zentrum für Infektionsmedizin**

**Sprecher: Prof. Dr. G. Alber**  
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 2**

### **Stufe 2.: Dekontamination von Klärschlämmen**

*Bearbeiter: Dipl.-Biol. Hendrik Scheinemann*

*Projektleiterin: Prof. Dr. Monika Krüger*

Abschlussbericht für die Förderer:



**Bildungs- und Demonstrationszentrum  
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)

10.01 <b>Projektkennblatt</b> der <b>Deutschen Bundesstiftung Umwelt</b>			
AZ	<b>27937/02</b>	Referat	<b>23</b>
		Fördersumme	<b>61.390 €</b>
<b>Antragstitel</b>	<b>Labor- und Felduntersuchungen zur Abfall-/Klärschlamm-Verwertung aus dezentralen Abwasserbehandlungen für die Herstellung hochwertiger Schwarzerdeböden (Terra Preta)</b>		
<b>Stichworte</b>	Boden, Dekontamination		
<b>Laufzeit</b>	<b>Projektbeginn</b>	<b>Projektende</b>	<b>Projektphase(n)</b>
<b>12 Monate</b>	<b>01.03.2011</b>	<b>29.02.2012</b>	<b>2</b>
Zwischenberichte			
<b>Bewilligungsempfänger</b>	Universität Leipzig Institut für Bakteriologie und Mykologie Veterinärmedizinische Fakultät An den Tierkliniken 29 04103 Leipzig	Tel 03419739180 Fax 0341 9738199	Projektleitung Prof. Dr. Monika Krüger Bearbeiter Dipl.-Biol. Hendrik A. Scheinemann
<b>Kooperationspartner</b>	BDZ Leipzig, Dipl. Ing. W.-M. Hirschfeld AZV Leisnig, Dipl. Ing. Kerstin Hertel Tilia Umwelt GmbH Leipzig, Dipl. Ing. Christoph Hug		
<b>Zielsetzung und Anlass des Vorhabens</b>			
<p>Die Verbringung menschlicher und tierischer Fäkalien auf landwirtschaftlich genutzte Böden führt zu einer Akkumulation von Schadstoffen mit Ökotoxizität wie Antiinfektiva, Entzündungshemmer, Hormone und Schwermetalle. Menschliche Fäkalien enthalten je nach Krankenstand pathogene Mikroorganismen und Medikamente. In der 2. Projektphase werden Erkenntnisse aus der 1. Projektstufe auf Klärschlämme aus dezentralen Kläranlagen übertragen, um aus den Schlämmen mittels der Terra Preta (TP)-Technologie fruchtbare, für die Ökosysteme unschädliche anthropogene Schwarzerden zu erzeugen. Die in der ersten Projektphase angelegten TP-Areale werden durch Neuanbau von Hafer hinsichtlich Produktivität (Ernteergebnis) weiter verfolgt.</p>			

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

### 1. Laborversuche:

1.1. Charakterisierung von Klärschlämmen aus dezentralen Kläranlagen des AZV Leisnig. Mikrobiologische Parameter, kulturell: aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ), anaerobe GKZ, Enterobakterien, Laktobazillen, Clostridium perfringens, C. sporogenes, Clostridien-GKZ, Staphylokokken, Enterokokken, Hefen, Schimmelpilze, Salmonellen, Listeria monocytogenes, Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung, Spezifizierung der kultivierten Bakterien mittels MALDI-TOF. Das Fermentationsergebnis wird durch pH-Wert-Messungen, durch Analyse der Gärsäuren verifiziert. Die Biozönosen werden mittels TGGE charakterisiert

1.2. Charakterisierung der Klärschlämme hinsichtlich Gehalt der Antibiotika Clindamycin, Ciprofloxacin, des Entzündungshemmers Diclofenac sowie von Östrogenen.

1.3. In vitro-Untersuchungen zur Degradierung von Salmonella –Serovaren, Listeria monocytogenes, EHEC-E. coli Clostridium perfringens, Clostridium botulinum,

1.4. In vitro-Untersuchungen zum Abbau der Antibiotika Clindamycin, Ciprofloxacin, des Entzündungshemmers Diclofenac sowie von Östrogenen.

### 2. Feldversuche

2.1. Die unter Pkt. 1.1. bereit gestellten Klärschlämme werden durch Zusatz von mikrobiell aktivierter Holzkohle, Gesteinsmehl, Bentonit, fermentierbarem Substrat (Grünschnitt, Getreide, Gemüseabfälle, Brotreste etc.) 4 Wochen fermentiert, mikrobiell analysiert und vererdet. Durch die zeitliche Verzögerung des Projektbeginns wurden Bepflanzungen der unterschiedlichen Ansätze in 2011 nicht mehr realisiert. Die Bepflanzung wird dann im Frühjahr 2012 erfolgen.

## ***Ergebnisse und Diskussion***

### 1. Laboruntersuchungen

Unter Laborbedingungen konnten Klärschlämme erfolgreich von pathogenen Mikroorganismen dekontaminiert werden. 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 nur schwach reduziert. Hefen und Schimmelpilze sanken unter die Nachweisgrenze. Mit Hilfe des TGGEs konnte ein Florenwechsel nachgewiesen werden. Die Schlämme vor und nach der Fermentation unterschieden sich stark in ihren Fingerprints

- 1.2. Die Klärschlammtraces unterscheiden sich sehr stark im Gehalt von den Antibiotika Clindamycin, Ciprofloxacin und des Entzündungshemmers Diclofenac. Östrogenen konnten nicht nachgewiesen werden.
- 1.3. 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 nicht zwangsläufig Folge der pH-Wert-Absenkungen oder Produktion von kurzkettigen Fettsäuren und Milchsäure
- 1.4. Ein Abbau der Antibiotika Clindamycin, Ciprofloxacin, des Entzündungshemmers Diclofenac sowie von Östrogenen konnte nicht nachgewiesen werden.

## 2. Felduntersuchungen

Die Klärschlammtraces konnten aus rechtlichen Gründen nicht im Lehr- und Versuchsgut Oberholz ausgebracht und auf Bodenverbessernde Eigenschaften getestet werden. Aus diesem Grunde wurde auf den umgesetzten Versuchsfeldern aus Projektteil 1 Sommerhafer angezogen, um den Effekt von Terra Preta auf Ernteerträge auch im Folgejahr zu untersuchen. Bodenverbessernde Effekte wie stärkere Wasseraufnahme und subjektiv frühere Keimung konnten beobachtet werden, jedoch keine positiven Effekte auf die Ernteerträge. Die nicht vorhandenen positiven Effekte sind vermutlich auf systematische Fehler zurückzuführen.

## ***Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation***

Die Ergebnisse unserer Arbeit wurden anlässlich einer Humusfachtagung in Kaindorf (8224 Österreich) am 20.1.2012 vorgestellt, sowie zum Doktorandensymposium in der Veterinärmedizin Leipzig am 30.3.2012. Zudem wird die Arbeit in einem Posterbeitrag zur DVG-Tagung 27.06.2012 - 29.06.2012 in Leipzig dargestellt.

## ***Fazit***

Mit der hier genutzten milchsäuren Fermentation ist es möglich Klärschlammtraces zu hygienisieren. Die dabei verwendete Methode ist mit einfachen Mitteln umsetzbar. Die entstehenden Traces haben positive Effekte auf die Versuchsfelder. Weiter Untersuchung zur Bodenverbesserung sowie zu den Details der Hygienisierung sind sehr zu empfehlen

**Inhalt**

<b>Projektkennblatt</b> .....	<b>2</b>
<b>Inhalt</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>10</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1. Herstellung der Terra Preta</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2. Mikrobiologische Untersuchungen</b> .....	<b>15</b>
2.2.1. Probenentnahme .....	15
2.2.2. Kulturelle mikrobiologische Untersuchung .....	15
2.2.3. Gattungs-/ Artbestimmung mittels Maldi – TOF MS (Bruker) .....	16
2.2.4. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) .....	16
2.2.5. Communityanalyse mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE).....	17
<b>2.3. Untersuchung zum Absterbeverhalten ausgesuchter Pathogene</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4. Untersuchung zum Abbau von Arzneimittelrückständen</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5. Gär säuren-, Laktat und Alkoholbestimmung</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6. pH-Wert-Messung</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7. Felduntersuchung zum Ernteertrag von Sommerhafer</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2. Mikrobiologische Untersuchungen</b> .....	<b>27</b>
3.2.2.1. Betrachtung der aeroben Gesamtkeimzahl .....	27
3.2.2.2. Betrachtung der anaeroben Gesamtkeimzahl.....	28
3.2.2.3. Betrachtung der aeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl .....	30
3.2.2.4. Betrachtung der Keimzahl der Enterokokken.....	32
3.2.2.5. Betrachtung der Keimzahl der Laktobazillen .....	33
3.2.2.6. Betrachtung der Keimzahl der Clostridien .....	35
3.2.2.7. Betrachtung der Keimzahl der Hefen und Schimmelpilzen .....	36
3.2.2.8. Betrachtung der sporenbildenden Sulfitreduzierern .....	38
3.2.3. Qualitative Keimfloraveränderungen während der Fermentation der Klärschlämme..	40
3.2.4. Ergebnisse der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) .....	48

3.2.5.	Ergebnisse der Fringerprint-Communityanalyse mittels Tempertaugaridentengel- elektrophorese (TGGE) .....	49
3.3.	<b>Degradierung von Pathogenen im Kuhdung- und Klärschlammgemisch .....</b>	<b>55</b>
3.4.	<b>Ergebnisse der Untersuchung zum Abbau von Arzneimittelrückständen .....</b>	<b>65</b>
3.5.	<b>Ergebnisse der Gärsäuren-, Laktat- und Alkoholbestimmung .....</b>	<b>67</b>
3.6.	<b>Ergebnisse der pH-Wertbestimmung .....</b>	<b>68</b>
3.7.	<b>Ergebnisse der Felduntersuchungen zum Haferertrag.....</b>	<b>71</b>
4.	<b>Interpretation und Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.2.	<b>Interpretation der mikrobiologischen Untersuchungen .....</b>	<b>72</b>
4.2.2.	Interpretation der quantitativen Keimflorenveränderung .....	72
4.2.3.	Interpretation der qualitativen Keimflorenveränderung .....	73
4.2.4.	Interpretation der FISH - Untersuchungen .....	75
4.2.5.	Interpretation der Floraanalysen mittel TGGE.....	75
4.3.	<b>Interpretation der Degradierung von Pathogenen im Kuhdung- und Klärschlammgemisch.....</b>	<b>76</b>
4.4.	<b>Interpretation der Untersuchung auf pharmazeutische Wirkstoffe .....</b>	<b>77</b>
4.5.	<b>Interpretation der Gärsäuren- und Alkoholanalyseergebnisse unter Einbeziehung der pH-Wert Messungen (4.6.) .....</b>	<b>78</b>
4.6.	<b>Siehe 4.5. ....</b>	<b>78</b>
4.7.	<b>Interpretation der Felduntersuchungen auf Wachstum und Ertrag des Hafers .....</b>	<b>79</b>
5.	<b>Fazit .....</b>	<b>81</b>
6.	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>

## Abbildungsverzeichnis

	<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1.)</b>	Ausbildung der 2 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A und T sowie der 3 Wasserstoffbrücken zwischen G und C	<b>18</b>
<b>Abb. 2.)</b>	Prinzip der DNA-Auftrennung in der Gradientengelelektrophorese	<b>19</b>
<b>Abb. 3a.)</b>	Verlauf der mesophilen aeroben Keimflora während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>28</b>
<b>Abb. 3b.)</b>	Verlauf der mesophilen anaeroben Keimflora während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>29</b>
<b>Abb. 3c.)</b>	Verlauf der mesophilen aeroben Gram-negativen Keimflora während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>31</b>
<b>Abb. 3d.)</b>	Verlauf der Keimzahl der Enterokokken während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>33</b>
<b>Abb. 3e.)</b>	Verlauf der Keimzahl der Laktobazillen während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>34</b>
<b>Abb. 3f.)</b>	Verlauf der Keimzahl der Clostridien während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>36</b>
<b>Abb. 3g.)</b>	Verlauf der Keimzahl der Hefen und Schimmelpilzen während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>37</b>
<b>Abb. 3h.)</b>	Verlauf der sporenbildenden Sulfitreduzierer während der Fermentation der Klärschlammgemische	<b>39</b>
<b>Abb. 4.)</b>	FISH - DAPI – Färbung des Klärschlammgemisches	<b>48</b>
<b>Abb. 5.)</b>	FISH Cy3 - EUBmix – Färbung des Klärschlammgemisches	<b>48</b>
<b>Abb. 6.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 1	<b>49</b>
<b>Abb.7.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 2	<b>50</b>
<b>Abb. 8.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 3	<b>50</b>
<b>Abb. 9.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 4	<b>51</b>
<b>Abb. 10.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 5	<b>51</b>
<b>Abb. 11.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 6	<b>52</b>
<b>Abb. 12.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 7	<b>52</b>
<b>Abb. 13.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 8	<b>53</b>
<b>Abb. 14.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 9	<b>53</b>

<b>Abb. 15.)</b>	TGGE Bandenmuster Schlammgemisch 10	<b>54</b>
<b>Abb. 16 a.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Clostridium perfringens</i> während der Fermentation im Kuhdung	<b>55</b>
<b>Abb. 16 b.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Staphylococcus aureus</i> während der Fermentation im Kuhdung	<b>56</b>
<b>Abb. 16 c.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Escherichia coli</i> O:157 während der Fermentation im Kuhdung	<b>57</b>
<b>Abb. 16 d.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Salmonella</i> Senftenberg während der Fermentation im Kuhdung	<b>58</b>
<b>Abb. 16 e.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Listeria monocytogenes</i> während der Fermentation im Kuhdung	<b>59</b>
<b>Abb. 16 f.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Clostridium sporogenes</i> während der Fermentation im Kuhdung	<b>60</b>
<b>Abb. 16 g.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Staphylococcus aureus</i> während der Fermentation im Klärschlamm	<b>61</b>
<b>Abb. 16 h.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Escherichia coli</i> O:157 während der Fermentation im Klärschlamm	<b>62</b>
<b>Abb. 16 i.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Salmonella</i> Senftenberg während der Fermentation im Klärschlamm	<b>63</b>
<b>Abb. 16 j.)</b>	Verlauf der Keimzahl von <i>Listeria monocytogenes</i> während der Fermentation im Klärschlamm	<b>64</b>
<b>Abb. 17 a.)</b>	pH-Werte der Klärschlammgemische im Verlauf von 7 Tagen Fermentation	<b>68</b>
<b>Abb. 17 b.)</b>	pH-Werte während des Pathogenabbauversuches im Verlauf der 3- tägigen Fermentation im Kuhdung	<b>69</b>
<b>Abb. 17 c.)</b>	pH-Werte während des Pathogenabbauversuches im Verlauf der 3- tägigen Fermentation im Klärschlamm	<b>70</b>
<b>Abb. 18.)</b>	mittleres Ährengewichts auf den unterschiedlichen Versuchsbeeten	<b>71</b>
<b>Abb. 19.)</b>	Versuchsfelder	<b>80</b>
<b>Abb. 20.)</b>	Versuchsfeld 3	<b>80</b>

## Tabellenverzeichnis

	<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>
<b>Tab. 1.</b>	Reaktionsansatz für die PCR	<b>20</b>
<b>Tab. 2.</b>	PCR-Protokoll	<b>20</b>
<b>Tab. 3.</b>	Gelzusammensetzung	<b>21</b>
<b>Tab. 4.</b>	Silberfärbeprotokoll	<b>22</b>
<b>Tab. 5.</b>	Nachweis ausgewählter Bakterienspezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten	<b>40</b>
<b>Tab. 6.</b>	Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelrückstände der Klärschlammgemische vor der Fermentation	<b>65</b>
<b>Tab. 7.</b>	Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelrückstände der Klärschlammgemische nach der Fermentation	<b>66</b>
<b>Tab. 8.</b>	Gärsäuren- und Alkoholanalyseergebnisse, Ergebnisse in g/kg Originalsubstanz	<b>67</b>

## Abkürzungen

### Abkürzungen

KbE	Kolonie bildende Einheiten
log KbE/g	dekadischer Logarithmus der Kolonie bildende Einheiten pro Gramm
PbE	Plaue bildende Einheiten
GKZ	Gesamtkeimzahl
MPN	most probable number (semiquantitatives Keimzählungsverfahren)
OS	Originalsubstanz
lvK	leicht verwert- bzw. verdaubare Kohlenstoffquelle
MDT	Magendarmtrakt
TGGE	Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese
A	Adenosin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
EGW	Einwohnergleichwert
SFSRM(s)	sporenbildender, sulfitreduzierender Mikroorganismus (Plural)

Schlammbezeichnung	Einwohnerzahl	Bemerkung	Abkürzung
<b>KA Altenhof Mitte</b>	64	Einwohner	KS1
<b>KA Bockelwitz</b>	144	Einwohner	KS2
<b>Kita Bortewitz</b>	35 EGW	Einwohner + Grippe u. Kindergarten	KS3
<b>Altenhof West</b>	31	Einwohner	KS4
<b>Elsner B-E</b>	16	Einwohner	KS5
<b>Turnhalle Clennen</b>	20 EGW	Einwohner + Sporthallennutzung	KS6
<b>Gut Haferkorn</b>	50 EGW	Einwohner + Schulungsteilnehmer	KS7
<b>KKA Elsner Naunhof</b>	8	Einwohner	KS8
<b>KKA Weise 4EW</b>	4	Einwohner	KS9
<b>KKA V. Peter 2 EW</b>	2	Gewerbe- Einwohnergleichwerte	KS10

## 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) sowie 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 Sulfonamid 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. (Scheinemann, et al., 2010)

In der zweiten Projektstufe stehen demgegenüber Klärschlämme aus dezentralen Kläranlagen im Vordergrund der Betrachtung. Insbesondere die Charakterisierung des Keimflorewechsels während der Hygienisierung mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wie dem TGGE stand dabei im Vordergrund um ggf. den Einfluss von nicht kultivierbaren Mikroorganismen zu untersuchen. Das vorliegende Projekt mit dem Aktenzeichen 27937 wird gefördert von der DBU – Deutschen Bundesstiftung Umwelt und unterstützt vom dem BDZ – Bildungs- und Demonstrationszentrum für dezentrale Abwasserbehandlung – e.V.

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

### 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Fäkale Abfälle 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 mikrobiellen Kontaminanten werden mit Fäkalien und Urin Pharmazeutika oder deren Abbauprodukte ausgeschieden, die Folge therapeutischer Maßnahmen bei Menschen und Tieren. Diese sind dann in den Fäkalien nachweisbar, belasten dann den Boden, wenn sie als Wirtschaftsdünger verwendet werden. Ciprofloxacin z. B. gehört zu den Fluoroquinolonen und wurde in der Umwelt im Milligrammbereich, in Klärschlamm bis zu 10 mg/kg (McClellan, et al., 2010.). Die Ciprofloxacinkonzentrationen in Ackerböden enthielten 0.45 mg/ kg (Golet, et al., 2003) sowie 0.75 mg/ kg (Martinez-Carballo, et al., 2007) . und in Schweinemist, 0.64–33.98 mg/ kg, in Geflügelmist 0.68–45.59 mg/ kg sowie 0.49–29.59 mg/kg in Rindermist (Zhao, et al., 2010)

Diese Wirkstoffe führen einerseits zur Selektion und Anreicherung resistenter Mikroorganismen in der Umwelt. (Urban, et al., 1950), andererseits zur Eliminierung bestimmter Bodenbakterien, die für die Aufrechterhaltung der Bodenfruchtbarkeit essentiell sind. Der Boden stellt auch das Habitat für zahlreiche Krankheitserreger dar. Darum ist es wesentlich, Resistenselektionen zu minimieren. (Dantas, et al., 2008). Weiterhin können Antibiotika aus den Fäkalien von den Pflanzen aufgenommen werden und auf diesem Wege die Konsumenten (Tiere, Menschen) erreichen. Wenn Antiinfektiva auf Ackerland verbracht werden, können sie auch unter Umständen Wachstum und Entwicklung von Pflanzen beeinträchtigen. (Jjemba, 2002a) (Jjemba, 2002b) (Feng, et al., 2009)

Das Ziel des Projektes bestand darin, durch Nutzung der milchsauren Fermentation fäkaler Abfälle mittels Terra Preta-Technologie die in Fäkalien enthaltene Pathogene zu degradieren, und enthaltene Pharmazeutika abzubauen.

Der anaerobe Abbau von Fäkalien mittels 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 (Austin, 1989) zitiert Rosenfeld und ZoBell (Rosenfeld, et al., 1947) die mit Bakterienisolaten 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 (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. (Buck, et al., 1962) (Buck, et al., 1963) und Buck und Meyers (Buck, et al., 1965) (Buck, et al., 1966) fanden bei *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* und *Vibrio* antagonistische Aktivitäten gegen die Hefen *Rhodotorula minuta* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Austin (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

## 2. Material und Methoden

(Katzenelson, 1978) und Toranzo et al. (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. Bauwens und De Ley (Bauwens, et al., 1981) sowie Okami (Okami, 1986) fanden für Vertreter der Gattungen *Cytophaga* und *Flavobacterium* auch eine Antitumoraktivität, die sie bestimmten Polysacchariden zuordnen konnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Herstellung der Terra Preta

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

- 500 g Klärschlamm
- 94 g Weizenkleie
- 61,5 g Bentonit
- 61,5 g Gesteinsmehl
- 38,5g Holzkohlegruß\*
- 12 g Sägespäne

Auf Grund der Versuchserfahrungen aus dem ersten Projektteil sowie aus den Beobachtungen aus den Versuchen zur Degradierung von Pathogenen in Klärschlämmen, wurde hier auf eine zusätzliche Laktobazillenquelle verzichtet.

Nach der sorgfältigen Vermischung der verschiedenen Zuschlagstoffe wurden 27g der Matrices in 50 ml Yellowcaps (TPP) portioniert, tief gefroren und mit Versuchsbeginn bei 37°C anaerob bebrütet. Der Deckel wurde nur locker angeschraubt um einer Bombagierung vorzubeugen. Die Röhrchen wurden dann für 7 Tage bebrütet, wobei zu Beginn, nach dem 3. und 7. Tagen eine bakterielle Untersuchung stattfand.

## 2.2. Mikrobiologische Untersuchungen

### 2.2.1. Probenentnahme

Die Probenentnahmen erfolgten im Zentrum des jeweiligen Gefäßes. Pro Zeitpunkt wurden 0,5-1g Probenmaterial entnommen.

### 2.2.2. Kulturelle mikrobiologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der unterschiedlichen bakteriologischen Parameter wurden 0,5g der Probe eingewogen und in 4,5ml PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) aufgenommen. 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, Inkubationszeit 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 Differenzierung fand mittels biochemischer Methoden statt (Harnstoff- Indol- Beweglichkeitsmedium, Sifin; Eisen- Zweifachzucker- Agar nach Kligler, Sifin), sowie mittels Maldi-TOF MS.

## 2. Material und Methoden

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 ausverdünn 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 150µl Aqua dest. aufgenommen, mit 450µl 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:

- Eub- mix (Eub338; Eub785; Eub927; Eub1055; Eub1088)

Pro Probe wurden 10 Quadranten mikroskopisch ausgezählt. (Nikon Eclipse Ni, Plan Apo 100x, FL Filterset ET Cy 3, 5, DsRed, Tritc)

Untersucht wurden Proben der 10 Klärschlammgemische am 1. und 7. Versuchstag.

### 2.2.5. Mikroorganismen -Communityanalyse mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

Mit Hilfe der Gradientengelelektrophorese ist es möglich eine bakterielle Lebensgemeinschaft zu charakterisieren. Der Vorteil bei diesem Verfahren ist die Detektion von mitunter nicht kultivierbaren Spezies. Die in der PCR amplifizierte DNA Fragmente unterscheiden sich dabei nicht in der Länge sondern lediglich in der Sequenz, je nach dem von welcher Spezies sie gewonnen wurden. Da die Paarung von Adenosin(A) und Thymin(T) mit 2 Wasserstoffbrückenbindungen nicht so stark assoziiert sind, wie eine Paarung von Cytosin(C) und Guanin (G) mit 3 Wasserstoffbrücken, kommt es bei einem hohen GC-Anteil zu einem höheren Schmelzpunkt der DNA, als bei einem niedrigeren GC-Anteil. (vgl. Abb. 1.)

## 2. Material und Methoden

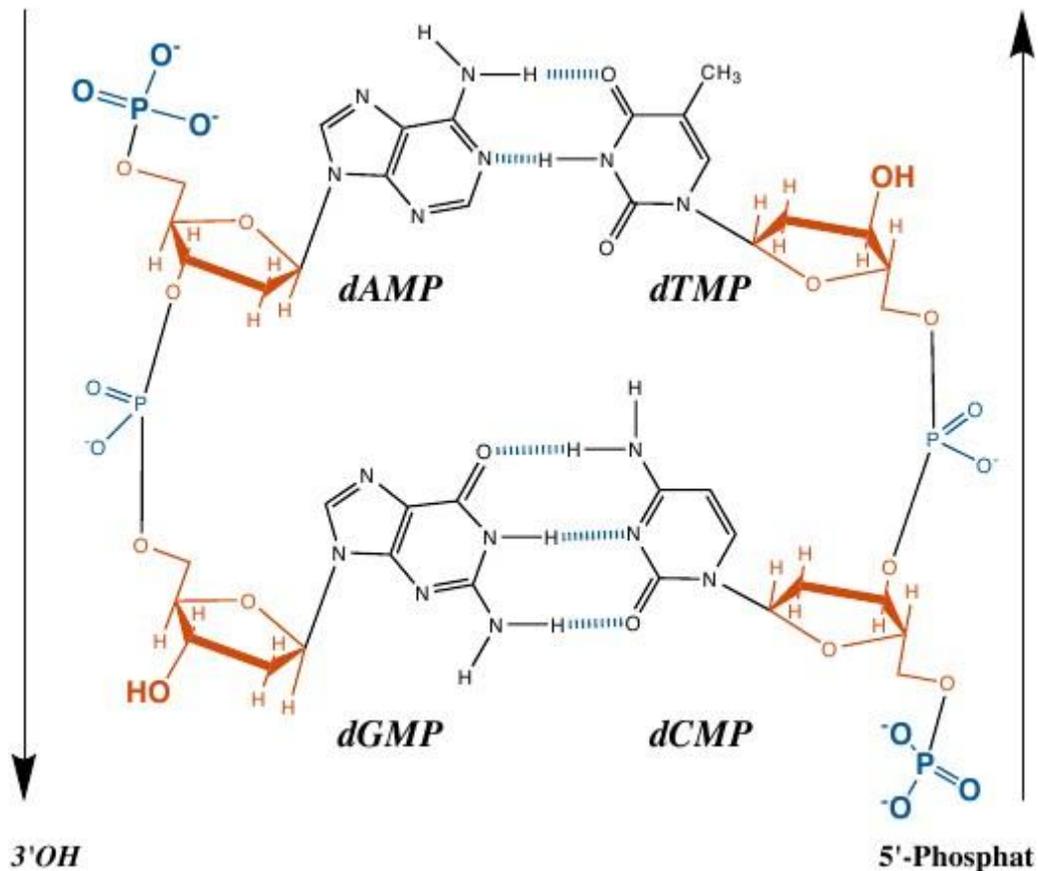


Abb. 1.) (Reinard, 2010) Ausbildung der 2 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A und T sowie der 3 Wasserstoffbrücken zwischen G und C

Je nach Sequenz kann es nun zur Blasenbildung im doppelsträngigen DNA-Fragment kommen, was die Laufgeschwindigkeit beeinflusst. Zudem trennt sich das Fragment mit steigender Temperatur vollständig auf. Um eine vollständige Auftrennung zu verhindern wurde am 5'-Ende des Forward-Primers eine GC-Klammer (Muyzer, et al., 1993) angebracht die ein beidseitiges Aufschmelzen verhindert und anstelle dessen eine Y-förmige Aufschmelzung ermöglicht. Je nach Sequenz kommt es zu einer früheren oder späteren Y-Aufgabelung entlang des Temperaturgradienten. Ab einer bestimmten Spreizung ist die Weiterwanderung im Gel faktisch unmöglich und die Bande aus diesen spezifischen Fragmenten „bleibt“ im Gel „stehen“, wie im Abb. 2.) dargestellt.

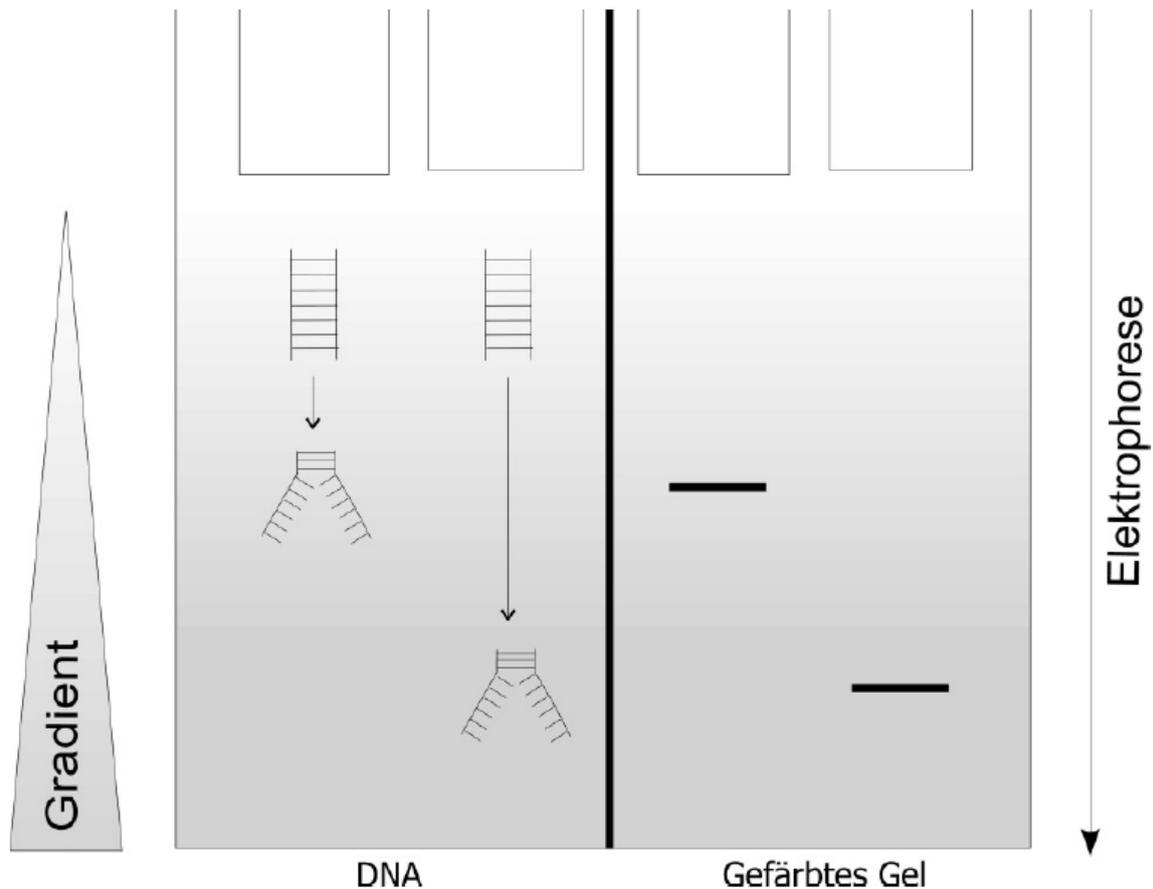


Abb. 2.) (Nölkes, 2008): Prinzip der DNA-Auftrennung in der Gradientengelelektrophorese

#### 2.2.5.1. Isolation der DNA

Die dafür Notwendige Template-DNA wurde mit dem PowerSoil-Kit (MoBio) jeweils aus der unfermentierten und der 7 Tage fermentierten Matrix gewonnen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.5.2 Polymerase – Kettenreaktion PCR

Mit Hilfe des universalen Primerpaares U968-GC-f ((5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3')) und L1401-r ((5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3')) (Biasucci, et al., 2008) (Nölkes, 2008) (Watanabe, et al., 2001) (Zoetendal, et al., 1998) (Nübel, et al., 1996) wurde die Amplifikation der variablen Regionen V6 bis V8 vom Nukleotid 968 bis 1401 (Nummerierung nach E.coli (Brosius, et al., 1981)) durchgeführt.

Der Mastermix für die Reaktionsansätze ist in Tabelle 1 dargestellt.

## 2. Material und Methoden

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die PCR

<b>Reagenzien</b>	<b>Mastermix, einfach</b> Menge in $\mu\text{l}$
Forward Primer U968-GC-f (30pmol/ $\mu\text{l}$ TIB MolBiol)	0,75
Reverse Primer L1401-r (30pmol/ $\mu\text{l}$ TIB MolBiol)	0,75
NH <sub>4</sub> -Puffer (10x, Invitek)	5
MgCl <sub>2</sub> -Puffer (50mM, Invitek)	5
BSA(0,5mg/ml Sigma) - Aqua dest.	36,5
dNTPs (10mM/ml)	0,75
Taq-Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ , Invitek)	0,75
<b>Gesamt</b>	<b>47,5</b>

Template	2,5
----------	-----

Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin direkt in den Thermocycler(Biometra) verbracht und mit dem Protokoll der Tabelle 2 amplifiziert.

Tabelle 2: PCR-Protokoll (Nölkes, 2008)

Anzahl	Schritt	Temperatur	Zeit
1x	Denaturierung	94°C	5 min
35x	Denaturierung	94°C	30 sec
	Anlagerung	56°C	20 sec
	Verlängerung	68°C	40 sec
1x	Verlängerung	68°C	7 min
1x	Pause	15°C	bis Entnahme

Der Erfolg der PCR wurde anschließend im horizontalen Agarosegel überprüft. Das Gel wurde aus 2,7g Agarose (Peqlab) und 150 ml TBE-Puffer hergestellt und während der Herstellung mit 6  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung (1%ig Roth) versehen.

10 $\mu\text{l}$  PCR-Produkt wurden mit 2  $\mu\text{l}$  Stopplösung vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese fand in einer TBE-Puffer-Wanne bei 80V für 50 min statt.

Parallel zu den Proben lief ein Standard (Fermentas GenRuler 100 bp plus) und eine negativ Kontrolle als Mastermix mit  $Aq_{dest}$  anstelle des Templates mit. Lagen die Proben in dem Bereich von 430 bp und war die negativ Kontrolle negativ, wurde die PCR als erfolgreich gewertet und das Produkt auf mittels Acrylamidgel in der TGGE analysiert.

### 2.2.5.3. Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

Das Gel wurde wie in Tabelle 3 dargestellt zusammengemischt und im Wasserbad (54°C) erwärmt und regelmäßig geschüttelt.

Tabelle 3: Gelzusammensetzung (Biometra, 2010)

Stoff (Endkonzentration)	Stammlösung	Menge
Acrylamid (6%ig, Fluka)	40% (0,4% Bisacrylamid, Roth)*	7,5 ml
Harnstoff (8M, Fluka)	Feststoff	24 g
TAE-Puffer (1fach)	10fache Stammlösung	5 ml
Glycerol (2%ig, Roth)	40%	2,5 ml
Formamid (20%, Roth)	~100%	10 ml
mit Aqua <sub>bidest</sub> auffüllen		auf 50 ml

\*modifiziert (ursprüngliches Verhältnis 37,5:1)

Nach der Abkühlung des Gemisches wurden 40µl einer 20%igen APS-Lösung (Roth) sowie 45µl TEMED (Roth) hinzugegeben um die Polymerisation zu starten. Sofort nach der Zugabe der Katalysatoren wurde das Gel über einem Sterilfilter (0,44µm, TPP) in das Gelsandwich hineingespritzt um dort innerhalb von 3h zu polymerisieren.

Nach der Polymerisation wurde das Gel pro Applikatortasche mit 5µl Amplifikat und Ladungspuffer im Verhältnis 5:2 beladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 350 V über 20 h hinweg mit dem TGGE Maxi (Biometra) durchgeführt. Der Temperaturgradient ging dabei von 31 bis 49°C.

Die Silberfärbung (Tabelle 4.) entsprach den Anweisung aus dem Handbuch des TGGEs wurde jedoch an wichtigen Punkten modifiziert. (schräggedruckt)

## 2. Material und Methoden

Tabelle 4: Silberfärbeprotokoll

Schritt	Zeit	wässrige Lösung
Fixierung	30 min	500 ml 10%ig Eisessig (Roth) 30% EtOH
Sensitivierung	2x 30 min	500 ml 30%ig EtOH
Waschen	30 sec Gel abspülen (Spritzflasche) dann 5x10 min Wasserbad	frisches Aq <sub>dest</sub>
Silberbindung	30 min	500ml Aq <sub>dest</sub> 0,8g AgNO <sub>3</sub> (VEB Feinchemie Sebnitz) 500µl Formaldehyd(37% Roth)
Waschen	10 sec Gel abspülen 30 sec Wasserbad 10 sec Gel abspülen	frisches Aq <sub>dest</sub>
Entwicklung	Bis zum Erscheinen der Banden. <i>Tipp: Lösung 2 auf 45°C erhitzen.</i>	Lösung 1: 2g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Merck) in 10ml Aq <sub>dest</sub> Lösung2: 12g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Merck) in 500ml Aq <sub>dest</sub> 500µl von Lösung 1 in 2 geben sowie 500µl Formaldehyd(37%)
Entwicklungsstopp	30 min <i>Tipp: Lösung auf 45°C erhitzen.</i>	7,3g EDTA(Natriumsalz, Roth) und 10g Glyzin in Aq <sub>dest</sub>

Nach der Entwicklung wurde das Gel mit einem Flachbettscanner (Canon Lide 110) eingescannt, mit Gelcompare II (Applied Maths) korrigiert und ausgewertet. Die Clusteranalyse wurde mit der UPGMA-Methode berechnet, mit der Bandenmusteranalyse nach Dice und einer Toleranz von 0,9%.

### 2.3. Untersuchung zum Absterbeverhalten ausgesuchter Pathogene.

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

Wie in Punkt 2.1. beschrieben, wurden vier Matrices hergestellt (an Stelle des Schlammes wurde jedoch Kuhdung verwendet), zu 27g in 50ml-Gefäße eingewogen, mit 3ml Pathogensuspension versetzt und bei 37°C fermentiert. Jeder Ansatz hatte 3 Wiederholungen. Dabei wurden die Klärschlamme mit verschiedenen Pathogenen gleichzeitig beimpft um Mehrfachbelastungen zu simulieren. Die Endkonzentration in den Reaktionsgefäßen betrug:

Mix 1:

- $6 \cdot 10^6$  *Salmonella* Anatum (Wildstamm)
- $7,63 \cdot 10^6$  *Listeria monocytogenes* (Wildstamm)
- $7,75 \cdot 10^6$  E.coli O:157 (Wildstamm)
- $5,5 \cdot 10^6$  *Clostridium perfringens* (Wildstamm)

Mix 2

- $6,67 \cdot 10^7$  *Salmonella* Senftenberg (DSMZ No. 10062)
- $9,17 \cdot 10^6$  *Staphylococcus aureus* (Wildstamm)
- $2,47 \cdot 10^7$  *Clostridium sporogenes* (Wildstamm)

Mix 3

- $3,33 \cdot 10^7$  *Salmonella* Senftenberg (DSMZ No. 10062)
- $5,08 \cdot 10^6$  *Listeria monocytogenes* (Wildstamm)
- $4,58 \cdot 10^6$  *Staphylococcus aureus* (Wildstamm)
- $5,17 \cdot 10^6$  E.coli O:157 (Wildstamm)
- $3,67 \cdot 10^6$  *Clostridium perfringens* (Wildstamm)
- $1,23 \cdot 10^7$  *Clostridium sporogenes* (Wildstamm)

Die Probenentnahme erfolgte nach ausgehend von den Erfahrungen aus dem ersten Projektteil (Scheinemann, et al., 2010) drei Tage nach der Beimpfung. Hierbei wurden je 0,5 g aus dem Gefäß entnommen, in 4,5 ml PBS aufgenommen und mit Hilfe von Verdünnungsreihen die Pathogen-Keimzahl bestimmt

## 2. Material und Methoden

Um die für die Tenazitätsuntersuchungen vorgesehenen Erreger besser von der Begleitflora abgrenzen zu können, wurden gegen Rifampicin und Streptomycin resistente Mutanten selektiert (Linde, 1981) (Linde, et al., 1990) Standard-Glukose-Nähragar 1 wurde mit Schafblut (5%ig v/v Oxoid), Rifampicin (300mg/l Eremfat, Fatol) und Streptomycinsulfat (400mg/l Roth) zur selektiven Anzucht dieser Erreger substituiert. Der Nachweis der Salmonellen erfolgte mittels Gassner- Agar (Sifin) der ebenso mit Rifampicin und Streptomycin substituiert wurde, die Anreicherung mittels Preuss-Medium (Merck).

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.

Um zudem den Effekt der mikrobiellen Flora zu prüfen wurde die Keimsuspension (1 und 2) zum Einen in die native Matrix gegeben und zum Anderen(Mix3) in dieselbe jedoch zuvor autoklavierte Matrix. Zudem wurde getestet, ob für die Degradierung in Klärschlämmen die Startkonzentration der Laktobazillen einen Einfluss ausübt. Dafür wurden zum in 2.1. beschriebenen Ansatz je 95ml „Effektive Mikroorganismen“ nativ (EM) und autoklaviert (OEM) hinzugegeben. Die Laktobazillenkonzentration vom eingesetzten EM betrug rund  $10^7$  KbE und somit verdünnt im Substrat ca.  $10^6$  KbE

Auf Grundlage dieser Ergebnisse und der Ergebnisse der Floraentwicklung der 10 weiteren Klärschlämme wurde ein Folgeexperiment für die Untersuchung des Pathogenabbaus in Klärschlämmen durchgeführt. Dabei wurde ein Pathogengemisch aus

- $8,42 \cdot 10^7$  *Salmonella* Senftenberg (DSMZ No. 10062)
- $2,73 \cdot 10^8$  *Listeria monocytogenes* (Wildstamm)
- $1,91 \cdot 10^8$  *Staphylococcus aureus* (Wildstamm)
- $1,48 \cdot 10^8$  E.coli O:157 (Wildstamm)

(Angaben stellen die Endkonzentrationen in den Gefäßen dar.)

in eine Klärschlammatrix wie in 2.1. beschrieben hinzugeben und für 3 Tage fermentiert. Dabei wurden keine zusätzlichen Laktobazillen hinzugegeben, jedoch die Matrix in der einen Versuchsreihe vor Zugabe der Pathogenen autoklaviert

### 2.4. Untersuchung zum Abbau von Arzneimittelrückständen

Um den Abbau der Pharmazeutika in der Fäkalmatrix zu untersuchen, wurde diese wie in 2.1. beschrieben hergestellt. Die 50 ml Röhren wurden anaerob bei 37°C bebrütet und nach 7, eingefroren (-18°C). Nach Abschluss dieser Versuchsreihe, wurden die Proben gefroren zur GWA Umweltanalytik (Ohratalsperre Luisenthal) geschickt und dort mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit einem Massenspektrometer analysiert. Der Anteil der Klärschlämme betrug in der jeweiligen Mischung ~65,1 % (Masse).

Während zu Beginn der Fermentation je eine Matrixprobe von dem jeweiligen Ausgangsklärschlamm analysiert wurde, wurden nach 7 Tagen Fermentation nur Proben analysiert, in denen die Ausgangswerte deutlich über der Nachweisgrenze lagen.

### 2.5. Gär säuren-, Laktat und Alkoholbestimmung

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

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

## 2. Material und Methoden

Die Probenmenge entsprach ca. 25g pro Probe. Die nativen und autoklavierten (steril) Matrices aus dem Pathogen-Degradierungs-Versuch 2.3. (nur Kuhdung) wurden am Tag 0 (t0) und Tag 3 (t1) beprobt.

### 2.6. 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)

### 2.7. Felduntersuchungen zum Ernteertrag von Sommerhafer

Auf den Feldern des ersten Projektteils (Scheinemann, et al., 2010) wurde im Frühjahr 2011 nach dem Mais Sommerhafer gesät. Es sollte der Effekt der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien der Erden, auf den Ertrag getestet werden. Die Saat erfolgte per Hand in 8 Reihen pro 1qm Beet. Gemessen wurden neben dem Ährengewicht, die Kornzahl pro Ähre und das Korngewicht. Zur statistischen Auswertung wurde, auf Grund der nicht vorhandenen Normalverteilung der Messwerte, der Friedmann-Test genutzt und im Anschluss der Post Hoc Test nach Mann Whitney. Aus den Kontrollfeldern wurden 150 Ähren gewogen, aus den Versuchsfeldern mit dem Attribut „K/“ jeweils 50 Ähren und aus den weiteren Feldern jeweils 100 Ähren.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2.1. Betrachtung der Aeroben Gesamtkeimzahl

Abb. 3a.) stellt die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl im Verlauf der Zeit dar. Klärschlammgemisch 6 besitzt zum Startzeitpunkt im arithmetischen Mittel mit 6,91 log KbE/g die höchste Keimdichte, die Gemische 1,4,7,8,9 und 10, liegen mit 6,37 log KbE/g; 6,38 log KbE/g 6,36 log KbE/g, 6,26 log KbE/g, 6,29 log KbE/g und 6,30 log KbE/g auf einem sehr ähnlichen Niveau. Lediglich die Gemische 2,3 und 5 haben mit Gesamtkeimzahlen von 4,94 log KbE/g, 4,80 log KbE/g und 5,69 log KbE/g niedrigere Werte.

Nach 3 Tagen Fermentation hat sich die aerobe Gesamtkeimzahl von Schlammgemisch 2,3 und 5 mit 6,73 log KbE/g, 6,57 log KbE/g und 6,07 log KbE/g den Keimzahlen der Gemischen 4,8,9,10 mit 6,94 log KbE/g, 6,38 log KbE/g, 7,04 log KbE/g und 6,39 log KbE/g stark genähert. Während Schlammgemisch 6 und 7 mit 5,30 log KbE/g und 5,87 log KbE/g unter den Wert von 6 log KbE/g liegen. Die Werte für Schlammgemisch 1 stehen in keinem der nachfolgenden Parameter für Tag 3 zur Verfügung.

Nach 7 Tagen ist in allen Proben die aerobe Gesamtkeimzahl deutlich gesunken. Mit 4,32 log KbE/g besitzt Schlammgemisch 7 die geringste anaerobe Gesamtkeimzahl, Schlammgemisch 2 mit 6,11 log KbE/g die höchste. Mit einem Wert von 4,40 log KbE/g liegt Schlammgemisch 1 im Keimzahlbereich von Schlammgemisch 7. Klärschlammgemisch 3,4,5,6,8,9 und 10 haben ähnliche Keimkonzentrationen mit 5,59 log KbE/g, 5,82 log KbE/g, 5,16 log KbE/g, 5,31 log KbE/g, 5,16 log KbE/g, 5,78 log KbE/g und 5,53 log KbE/g.

### 3. Ergebnisse

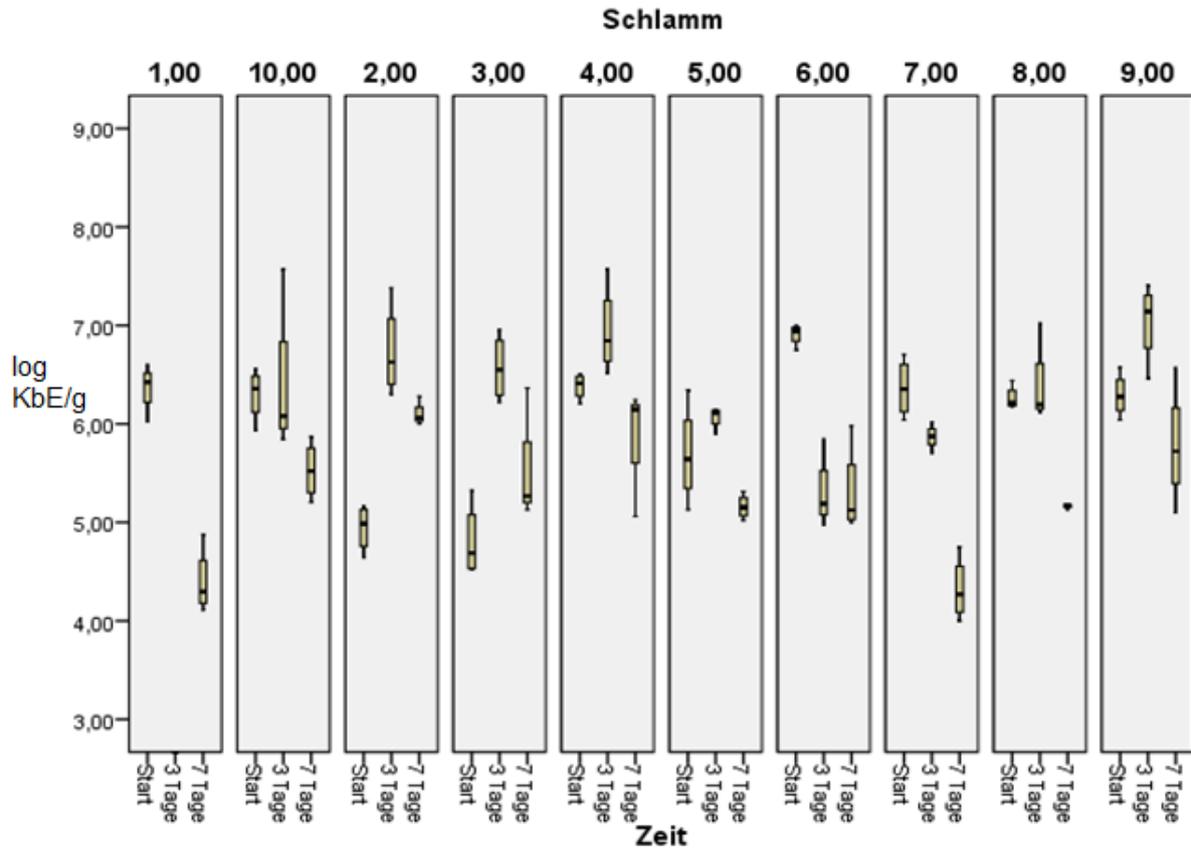


Abb. 3a.) Verlauf der mesophilen **aeroben Keimflora** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangebe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

#### 3.2.2.2. Betrachtung der anaeroben Gesamtkeimzahl

Abb. 3b.) stellt die anaerobe mesophile Gesamtkeimzahl im Verlauf der Zeit dar. Klärschlammgemisch 6 besitzt zum Startzeitpunkt im arithmetischen Mittel mit 7,20 log KbE/g die höchste Keimdichte, die Gemische 1,4,5,7,8,9 und 10, liegen mit 6,52 log KbE/g; 6,45 log KbE/g 6,24 log KbE/g, 7,09 log KbE/g, 6,53 log KbE/g, 6,38 log KbE/g und 6,19 log KbE/g nahezu innerhalb einer Logarithmus stufe. Lediglich die Gemische 2 und 3, mit anaeroben Gesamtkeimzahlen von 5,27 log KbE/g und 5,01 log KbE/g, besitzen deutlich niedrigere Werte.

Nach 3 Tagen Fermentation hat sich die anaerobe Gesamtkeimzahl von Schlammgemisch 2 und 3 sehr stark auf 7,20 log KbE/g bzw. 7,35 log KbE/g erhöht. Zu einem Zuwachs kam es auch bei Schlammgemisch 4 und 9 auf 7,62 log KbE/g bzw. 7,46 log KbE/g. Die Klärgemische 5,6,7,8 und 10 verharren mit 6,27 log KbE/g, 6,95 log KbE/g, 7,25 log KbE/g, 6,75 log KbE/g und 6,11 log KbE/g ungefähr auf dem Startniveau.

Nach 7 Tagen Fermentation sank die anaerobe Gesamtkeimzahl von allen Gemischen im Verhältnis zum vorherigen Wert, mit Ausnahme von Schlammgemisch 10. Die Konzentration betrug in Schlammgemisch 1 bis 9: 4,98 log KbE/g, 6,70 log KbE/g, 6,31 log KbE/g, 6,03 log KbE/g, 5,62 log KbE/g, 5,97 log KbE/g, 5,53 log KbE/g, 5,58 log KbE/g, 5,74 log KbE/g und bei Schlammgemisch 10 6,49 log KbE/g.

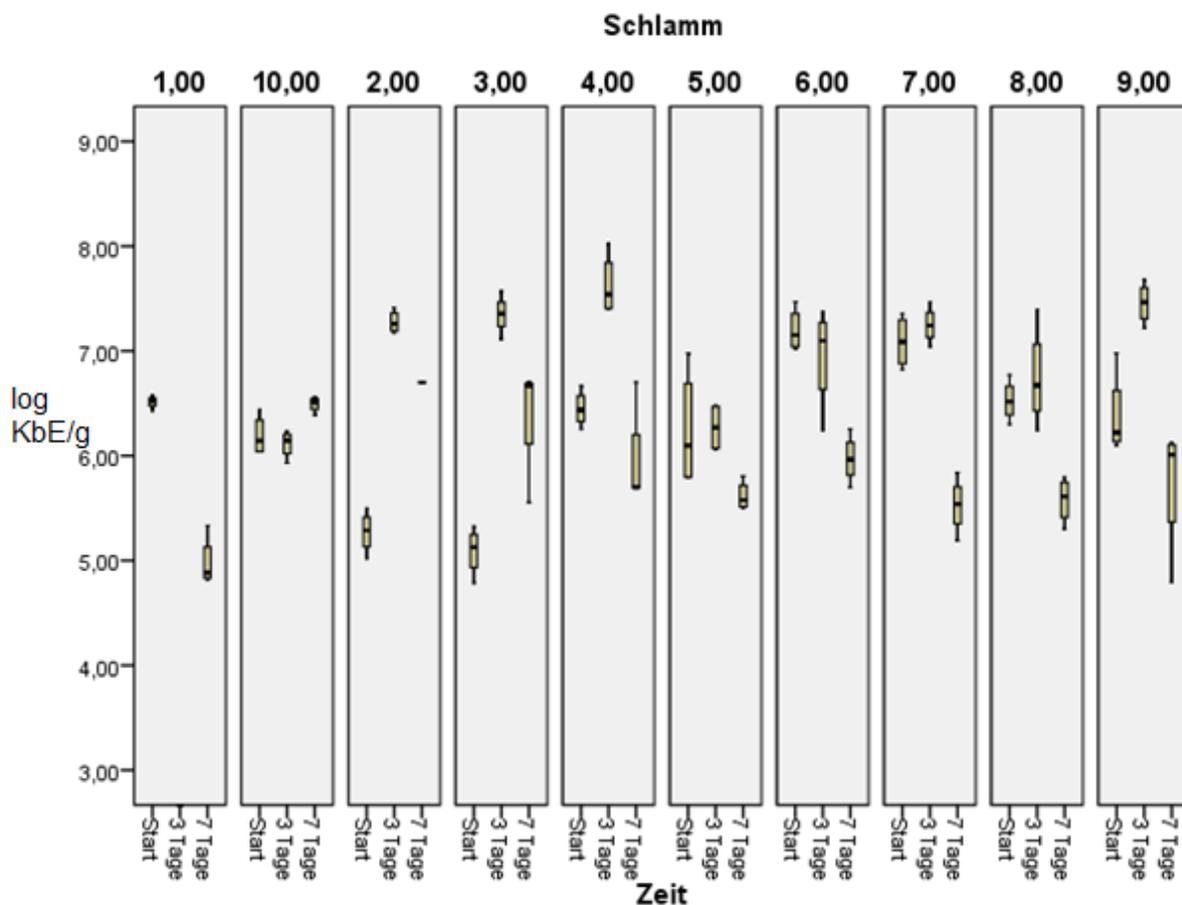


Abb. 3b.) Verlauf der mesophilen **anaeroben Keimflora** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangebe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2.3. Betrachtung der aeroben Gram-negativen Gesamtkeimzahl

Abb.3c.) stellt die aerobe Gram-negative mesophile Gesamtkeimzahl im Verlauf der Zeit dar.

Vor der Fermentation war die Konzentration der aeroben Gram-negativen relativ inhomogen. Vielmehr sind 2 Gruppen erkennbar. Zum einen Schlammgemisch 1,10,4,6,7,8, mit einem Mittel von rund 5,44 log KbE/g: Es betrug in Schlammgemisch 1 5,56 log KbE/g, 5,38 log KbE/g in Schlammgemisch 4, 5,55 log KbE/g in Schlammgemisch 6, 5,52 log KbE/g in Schlammgemisch 7, 5,31 log KbE/g in Schlammgemisch 8 und 5,32 log KbE/g in Schlammgemisch 10

Die andere Gruppe bestehend aus Schlammgemisch 2,3,5 und 9 besaßen eine deutlich geringere Gram-negative Gesamtkeimzahl. Sie betrug in Schlammgemisch 2 3,49 log KbE/g, in Schlammgemisch 3 4,27 log KbE/g 4,20 log KbE/g in Schlammgemisch 5 sowie 4,33 log KbE/g in Schlammgemisch 9.

Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration in allen Ansätzen unter die Nachweisgrenze von 3,00 log KbE/g. Lediglich in Schlammgemisch 3 gab es in einer von vier Wiederholungen einen positiv Befund mit einer Keimkonzentration von 3,70 log KbE/g. Nach 7 Tagen Fermentation waren alle Proben negativ.

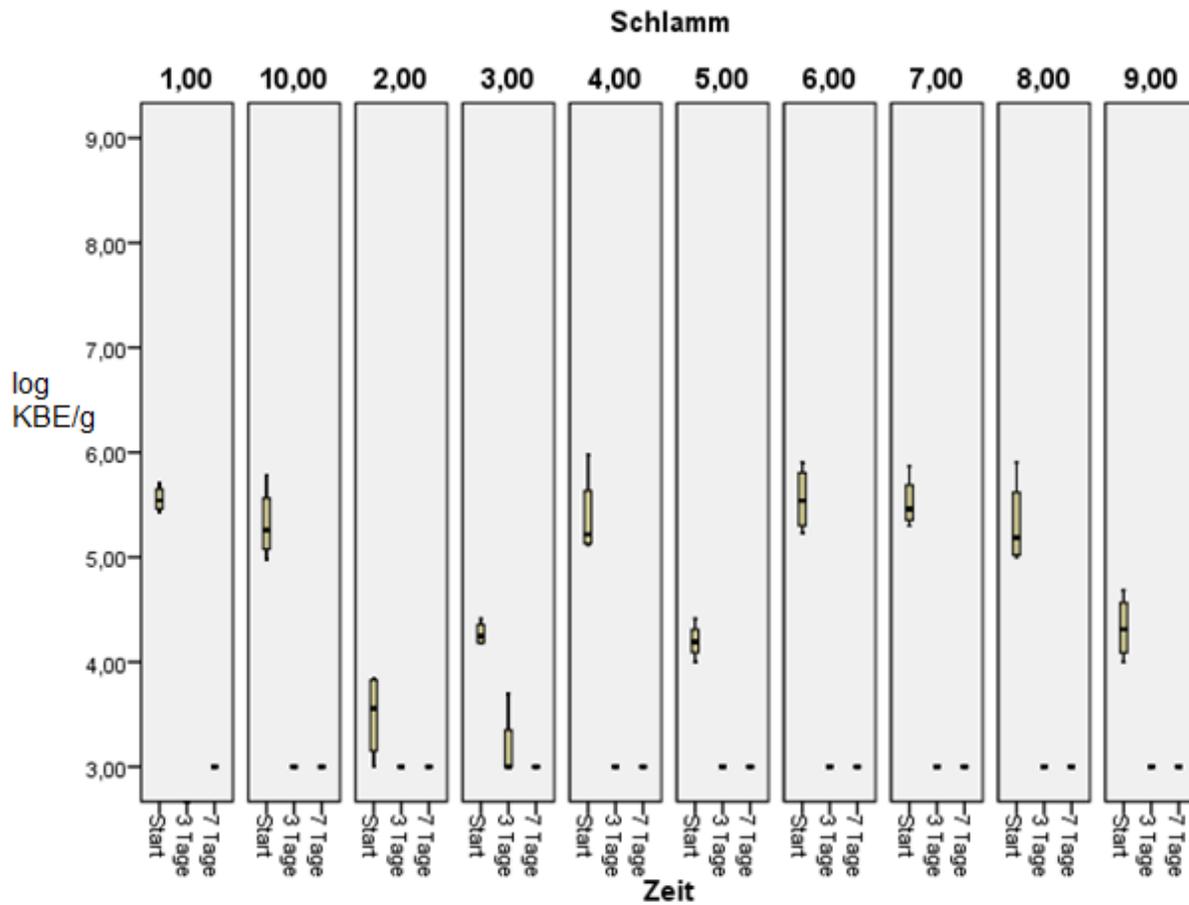


Abb. 3c.) Verlauf der mesophilen aeroben **Gram-negativen Keimflora** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangabe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2.4. Betrachtung der Keimzahl der Enterokokken.

Abb.3d.) stellt die aerobe Keimzahl der Enterokokken im Verlauf der Zeit dar. Vor dem Beginn der Fermentation war die Zahl der Enterokokken recht unterschiedlich. Sie betrug 4,46 log KbE/g in Schlammgemisch 1, 3,25 log KbE/g in Schlammgemisch 2, 3,46 log KbE/g in Schlammgemisch 3, 5,39 log KbE/g in Schlammgemisch 4, 4,40 log KbE/g in Schlammgemisch 5, 4,92 log KbE/g in Schlammgemisch 6, 4,96 log KbE/g in Schlammgemisch 7, 4,34 in Schlammgemisch 8, 3,27 log KbE/g in Schlammgemisch 9 sowie 3,82 log KbE/g in Schlammgemisch 10.

Nach 3 Tagen Fermentation sind die Keimzahlen äußerst heterogen. Zum Einen unterscheiden sich die Mittelwerte der Keimzahlen zwischen den unterschiedlichen Gemischen, Nr. 7 mit 3,08 log KbE/g und 9 mit 6,70 log KbE/g um 3,63 log KbE/g (Rundung erst nach Subtraktion). Zum Anderen beträgt die Spannbreite der Einzelwerte bei Schlammgemisch 4 bis zu 3,10 log KbE/g und bei Schlammgemisch 2 bis zu 2,88 log KbE/g. Die Mittelwerte der Gemische 4 und 2 liegen bei 4,58 log KbE/g bzw. 3,72 log KbE/g. Die Mittelwerte der Gemische 3,5,6,8 und 10 liegen bei 3,33 log KbE/g, 3,77 log KbE/g, 4,05 log KbE/g, 5,63 log KbE/g und 5,37 log KbE/g. Auch ist die Entwicklung der Keimzahlen unterschiedlich. So steigt sie in Schlammgemisch 8,9 und 10 sinkt aber in allen anderen Schlammgemischen.

Nach 7 Tagen hingegen sinkt die Keimzahl der Enterokokken in allen untersuchten Gemischen. So in Schlammgemisch 1,2,5,6,7,8 unter die Nachweisgrenze von 3 log KbE/g. In Schlammgemisch 3,4,9 und 10 auf 3,4 log KbE/g, 3,58 log KbE/g, 4,98 log KbE/g und 3,27 log KbE/g.

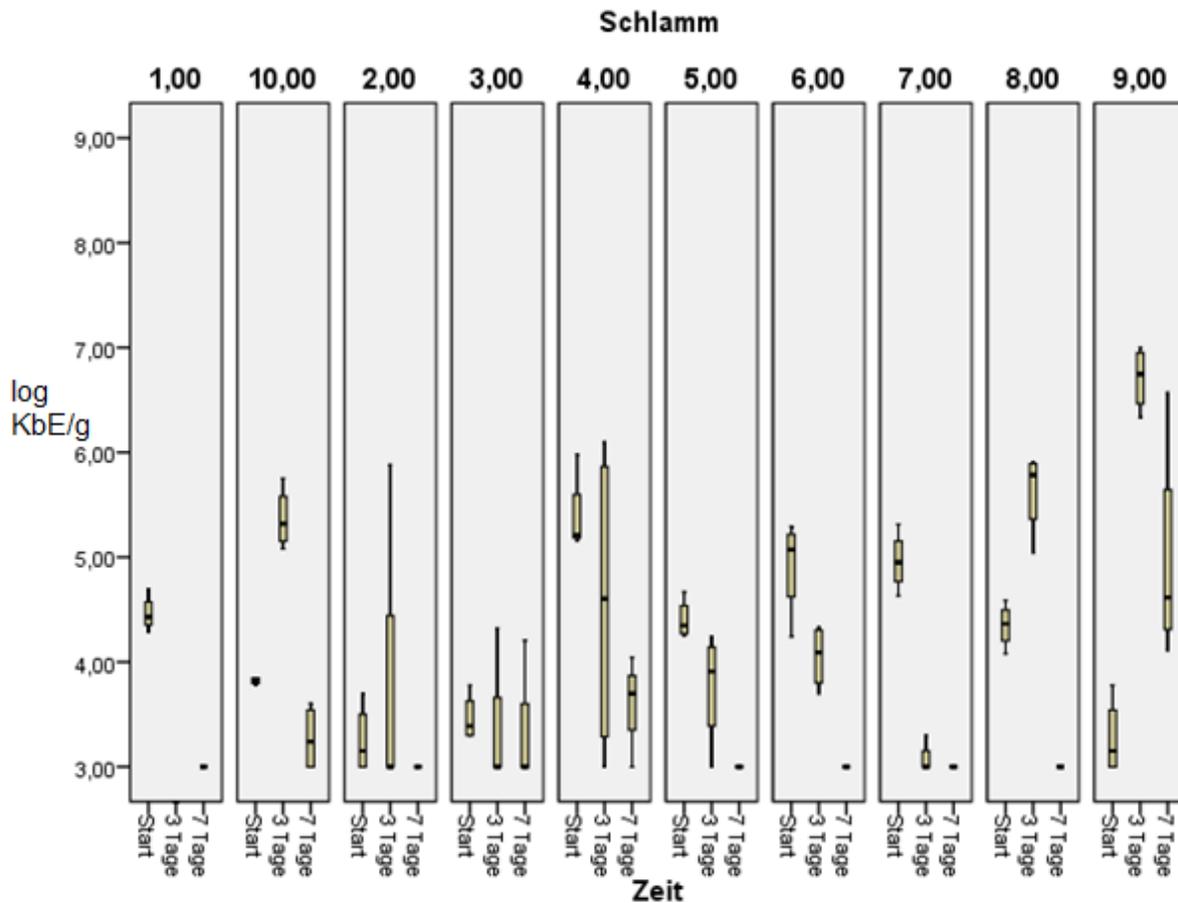


Abb. 3d.) Verlauf der **Keimzahl der Enterokokken** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangabe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3.2.2.5. Betrachtung der Keimzahl der Laktobazillen

Abb.3e. stellt die anaerobe Keimzahl der Laktobazillen im Verlauf der Zeit dar. Zu Beginn der Fermentation ist auch die Laktobazillenkonzentration der verschiedenen Klärschlammgemische recht divers. Mit 3,99 log KbE/g, 4,09 log KbE/g, 3,41 log KbE/g, 3,35 log KbE/g, 3,70 log KbE/g, und unter 3,0 log KbE/g liegen die Konzentration von den Gemischen 1,2,3,5,8 und 10 relativ niedrig. Schlammgemisch 4, 6,7, und 9 habe dagegen recht hohe Konzentration von 4,84 log KbE/g, 6,00 log KbE/g, 5,19 log KbE/g und 4,86 log KbE/g.

### 3. Ergebnisse

Nach 3 Tagen Fermentation steigt in allen untersuchten Gemischen die Konzentration der Laktobazillen deutlich an; in den Gemischen 2,3,4,5,6,7,8 und 9 auf ein recht ähnliches Niveau von 7,27 log KbE/g, 7,47 log KbE/g, 7,46 log KbE/g, 6,27 log KbE/g, 6,97 log KbE/g, 7,24 log KbE/g, 6,57 log KbE/g und 7,02 log KbE/g. Schlammgemisch 10 hat mit 5,85 log KbE/g eine verhältnismäßig geringe Konzentration, jedoch liegt sie bereits deutlich höher als noch zum Startzeitpunkt.

Nach 7 Tagen Fermentation sinkt in allen Schlämmen mit Ausnahme von Gemisch 10 die Laktobazillenkonzentration im Vergleich zum 3-Tage-Wert wieder ab. In Gemisch 1,2,3,4,5,6,7,8 und 9 konnten Konzentrationen von 4,00 log KbE/g, 6,54 log KbE/g, 6,71 log KbE/g, 6,65 log KbE/g, 5,20 log KbE/g, 4,00 log KbE/g, 5,39 log KbE/g, 5,64 log KbE/g und 5,73 log KbE/g gezählt werden.

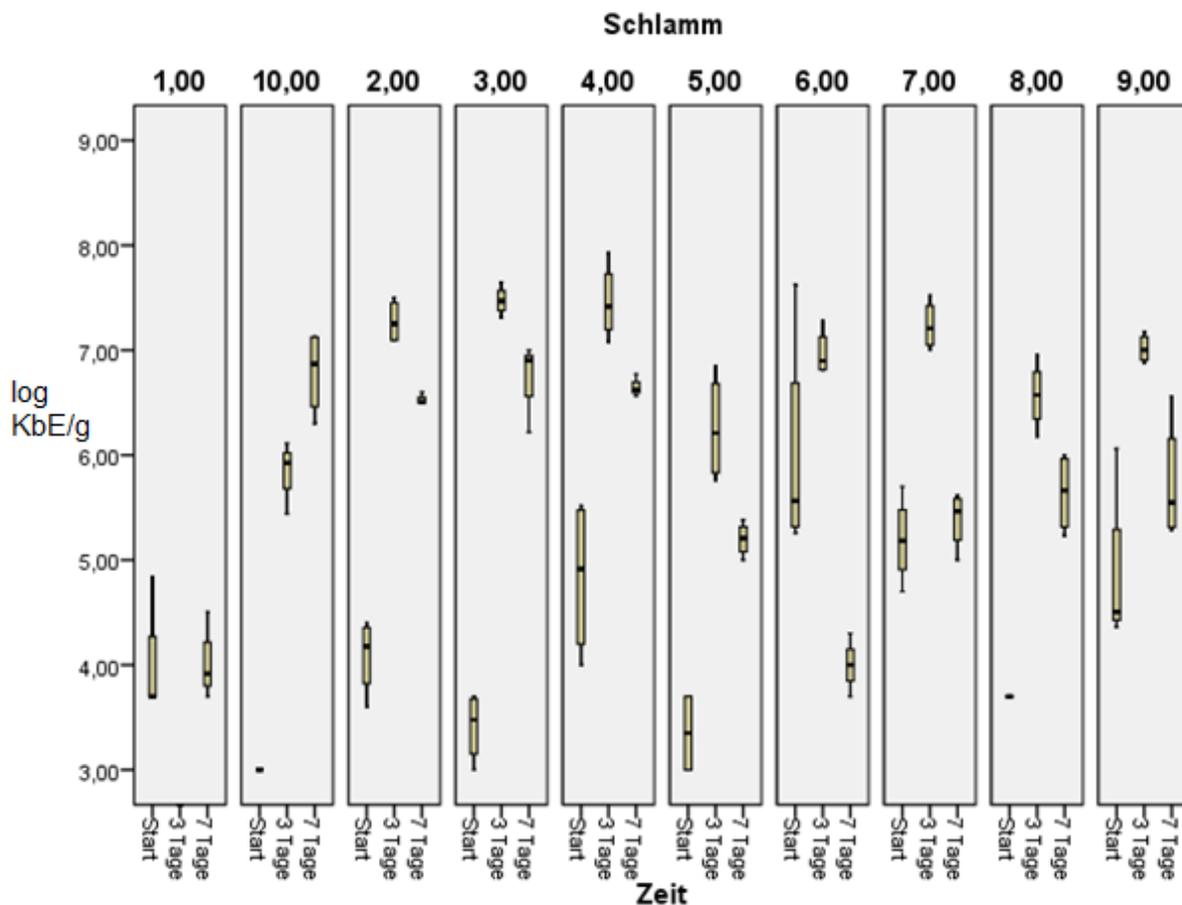


Abb. 3e.) Verlauf der **Keimzahl der Laktobazillen** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangabe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3.2.2.6. Betrachtung der Keimzahl der Clostridien

Abb.3f. stellt die anaerobe Keimzahl der Clostridien im zeitlichen Verlauf dar. Die Konzentration der Clostridien in den Klärschlammgemische 1,2,3,4,5,6,7,8,9 und 10 zum Startzeitpunkt beträgt 5,16 KbE/g, 4,42 log KbE/g, 3,93 log KbE/g, 5,60 log KbE/g, 5,81 log KbE/g, 6,15 log KbE/g, 4,45 log KbE/g, 4,28 log KbE/g, 3,42 log KbE/g und 4,34 log KbE/g.

Nach drei Tagen Fermentation sank die Konzentration in allen gezählten Proben unterschiedlich stark. In den Proben 2,3,4,5,6,7,8,9 und 10 auf 4,41 log KbE/g, 3,69 log KbE/g, 4,42 log KbE/g, 4,14 log KbE/g, 4,75 log KbE/g, 4,15 log KbE/g, 4,05 log KbE/g,  $\leq 3,00$  log KbE/g und 3,35 log KbE/g.

Nach 7 Tagen Fermentation sank in Gemisch 1 die Keimzahl der Clostridien auf 3,76 log KbE/g, im Gemisch 2 auf 4,27 log KbE/g, in Gemisch 3 auf  $\leq 3,00$  log KbE/g, in Gemisch 7 auf 4,16 log KbE/g, in Gemisch 8 auf 3,87 log KbE/g und in Gemisch 10 auf 3,17 log KbE/g. In Schlamm 9 bleibt die Anzahl der Clostridien unter der Nachweisgrenze von  $\leq 3,00$  log KbE/g. In den Gemischen 4,5, und 6 steigt die Konzentration der Clostridien leicht auf 4,56 log KbE/g, 4,53 log KbE/g und 4,80 log KbE/g, liegen aber weiterhin deutlich unter den Werten vor der Fermentation.

### 3. Ergebnisse

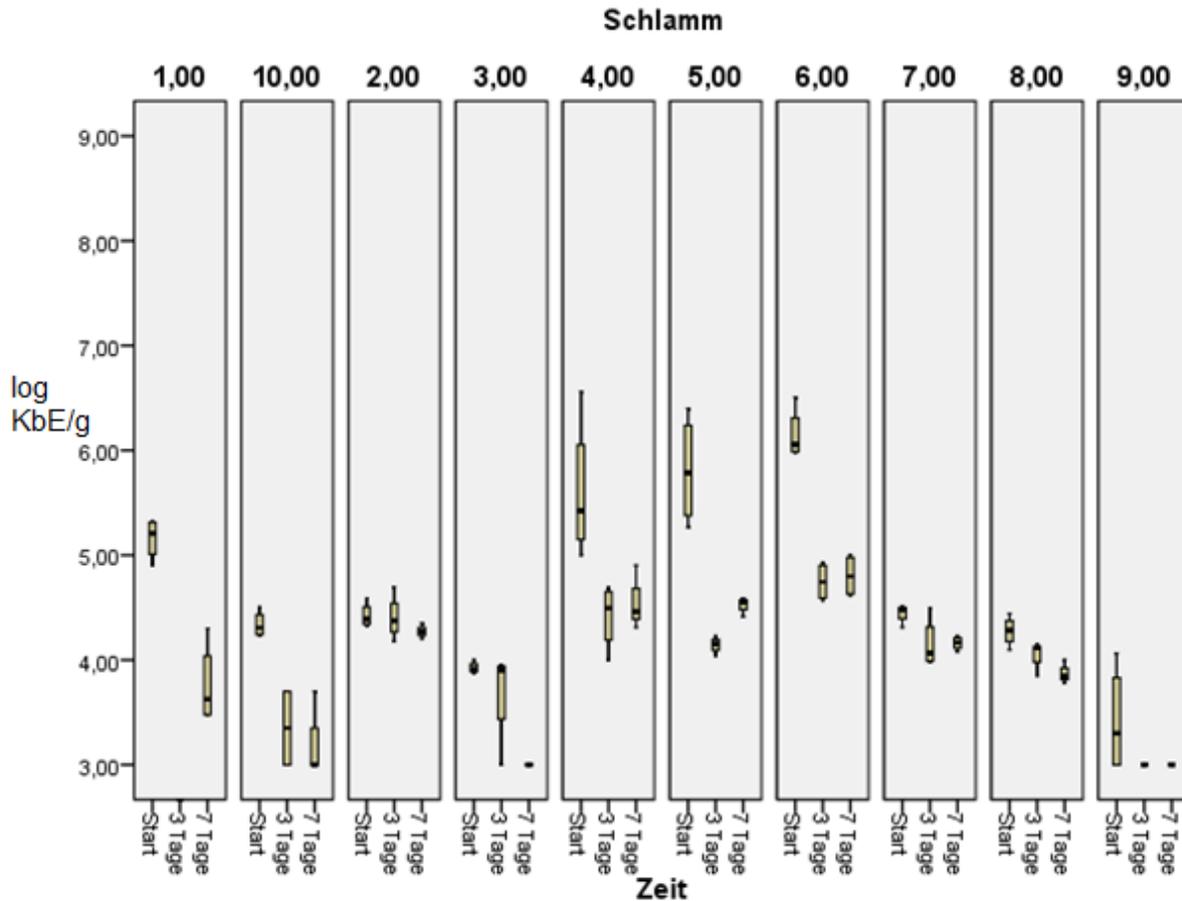


Abb. 3f.) Verlauf der **Keimzahl der Clostridien** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangabe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

#### 3.2.2.7. Betrachtung der Keimzahl der Hefen und Schimmelpilzen

Abb.3g. stellt die anaerobe Keimzahl der Hefen und Schimmelpilzen im zeitlichen Verlauf dar. Zu dem Beginn der Fermentation liegen die Konzentrationen der betreffenden Prokaryoten in den Gemischen 1,2,3,4,5,6,7,8,9 und 10 bei 5,78 log KbE/g, 3,56 log KbE/g, 4,50 log KbE/g, 3,78 log KbE/g, 5,23 log KbE/g, 3,36 log KbE/g, 5,04 log KbE/g, 6,92 log KbE/g, 3,78 log KbE/g und 4,88 log KbE/g. Nach drei Tagen Fermentation sinkt in allen Proben die Konzentration der Hefen und Schimmelpilze unter die Nachweisgrenze von 3,00 log KbE/g. Auch nach 7 Tagen sind keine Pilze nachweisbar lediglich eine Einzelprobe von Gemisch 4 weist eine Konzentration von 4,46 log KbE/g auf.

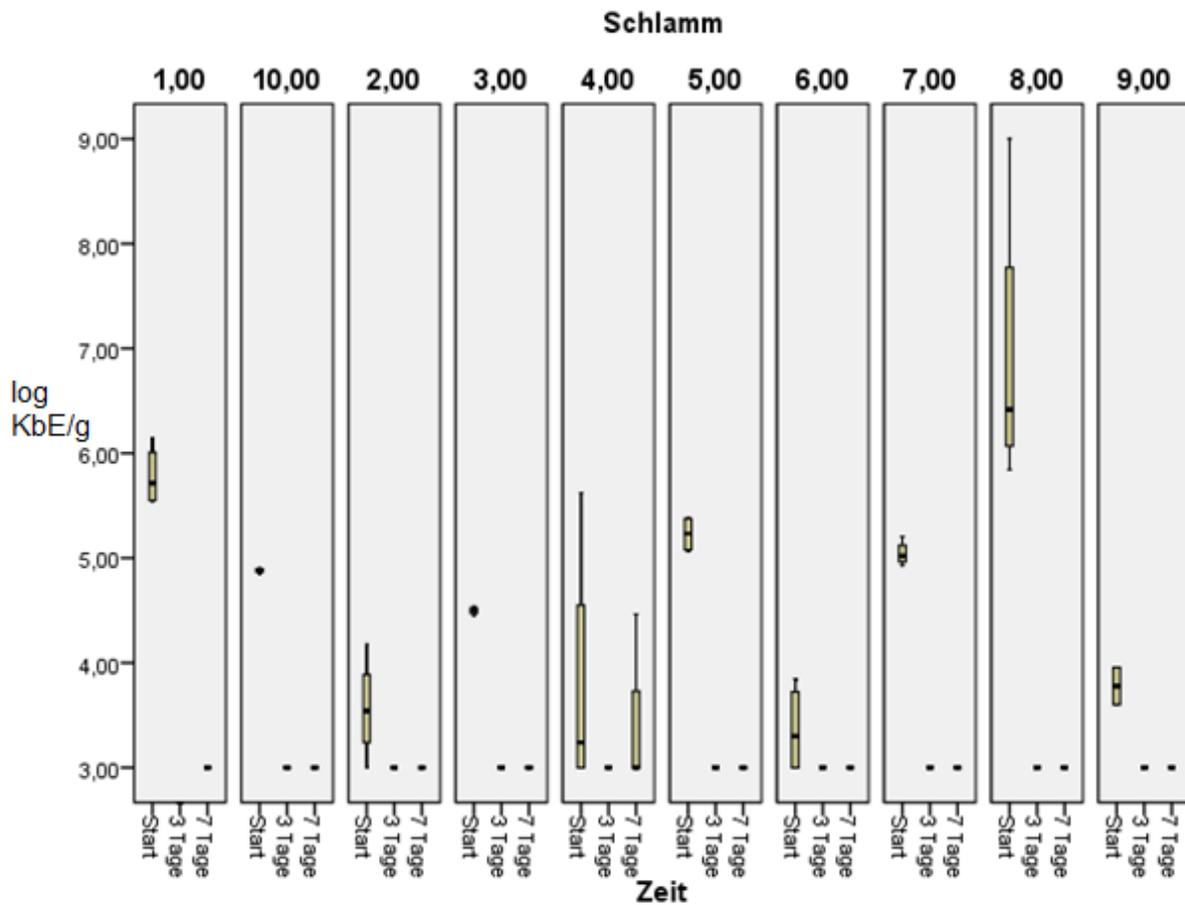


Abb. 3g.) Verlauf der **Keimzahl der Hefen und Schimmelpilzen** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, Keimzahlangabe im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2.8. Betrachtung der sporenbildenden Sulfitreduzierern

Abb.3h. stellt die höchstwahrscheinliche Anzahl (MPN) der hitzeresistenten, sporenbildenden, sulfitreduzierenden Mikroorganismen (SFSRMs) dar. Zum Startzeitpunkt liegt die Konzentration der SFSRMs im Gemisch 1,2,3,4,5,6,7,8,9 und 10 bei 4,55 log MPN/g, 4,09 log MPN/g, 3,49 log MPN/g, 4,48 log MPN/g, 4,25 log MPN/g, 3,76 log MPN/g, 3,48 log MPN/g, 3,81 log MPN/g, 2,67 log MPN/g und 3,82 log MPN/g.

Drei Fermentationstage später sinkt die Konzentration der SFSRMs in allen ausgezählten Ansätzen. Auf 3,73 log MPN/g in Ansatz 2, 3,10 log MPN/g in Ansatz 3, 3,92 log MPN/g in Ansatz 4, 3,69 log MPN/g in Ansatz 5, 3,45 log MPN/g in Ansatz 6, 2,41 log MPN/g in Ansatz 7, 2,98 log MPN/g in Ansatz 8, 2,49 log MPN/g in Ansatz 9 und 2,66 log MPN/g in Ansatz 10.

Nach sieben Tagen Fermentation sinkt im Gemisch 1 die SFSRM Konzentration auf 3,31 log MPN/g. In Gemisch 2,3,4,5 und 8 bleibt die SFSRM Konzentration auf Ähnlichem Niveau zum 3. Tag bei 3,74 log MPN/g, 3,15 log MPN/g, 3,76 log MPN/g, 3,59 log MPN/g und 3,00 log MPN/g. In Gemisch 6 und 9 sinkt die Konzentration unter den Dritttageswert auf 2,48 log MPN/g und 1,78 log MPN/g. In Schlamm 7 und 10 kommt es zu einen Anstieg auf 2,95 log MPN/g und 3,03 log MPN/g.

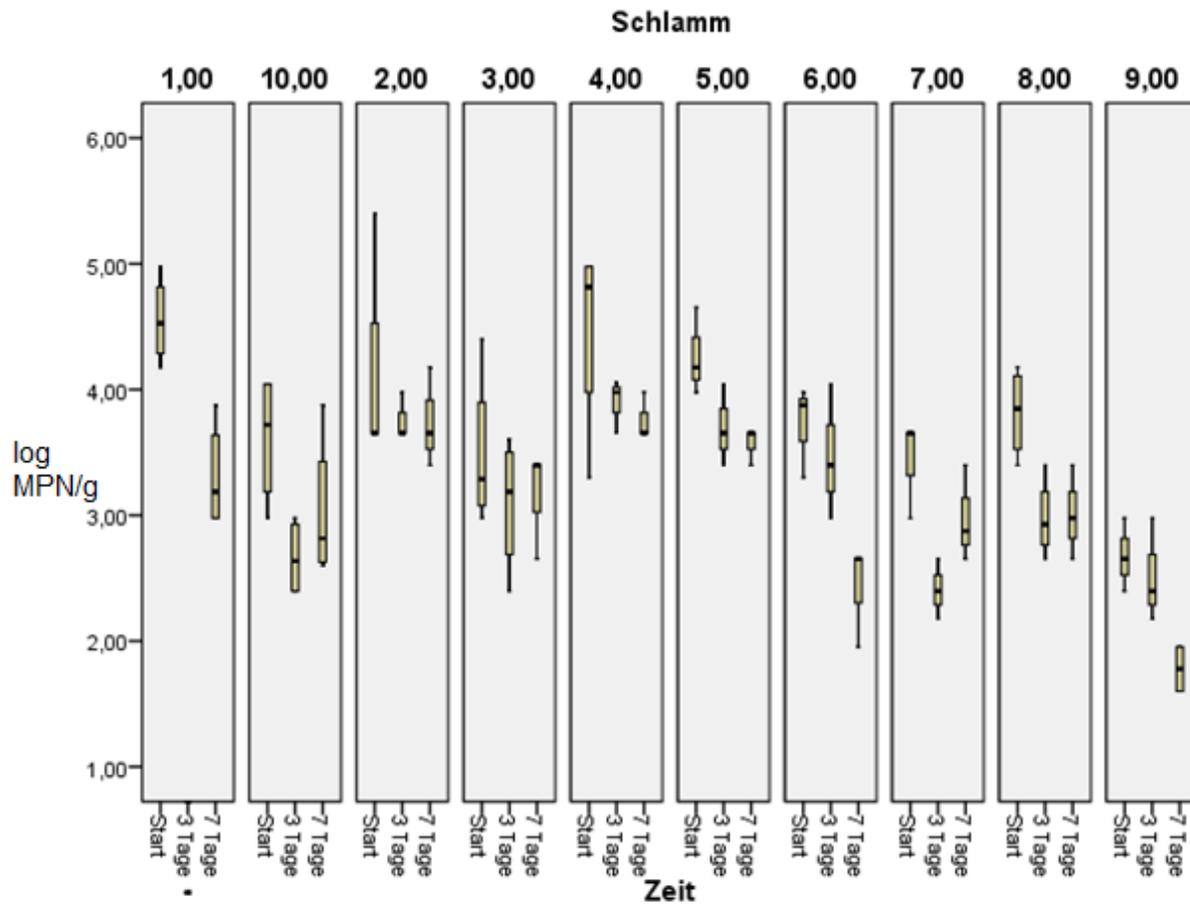


Abb. 3h.) Verlauf der **sporenbildenden Sulfitreduzierer** während der Fermentation der Klärschlammgemische 1-10 im Laborversuch, MPN im dekadischen Logarithmus

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.3. Qualitative Keimfloraveränderungen während der Fermentation der Klärschlämme

In Tabelle 5 sind ausgewählte Bakterienspezies und deren qualitativer Nachweis zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgelistet.

#### 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

Tabelle 5. Nachweis ausgewählter Bakterienspezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten

	<b>Vor der Fermentation</b>	<b>Nach 3 Tagen Fermentation</b>	<b>Nach 7 Tagen Fermentation</b>
<b>Bakterienart</b>	Gefunden in	Gefunden in	Gefunden in
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (++)	KS3/1,2 KS6/1 KS7/3,4		
<i>Acinetobacter junii</i> (++)	KS1/1,3		
<i>Acinetobacter parvus</i> (++)	KS5/3		
<i>Actinebacter tandoii</i> (+)	KS4/2,4		
<i>Actinebacter townneri</i> (+)	KS1/1,2 KS4/1,2,3,4		
<i>Aeromonas caviae</i> (+)	KS5/2		
<i>Aeromonas salmonicida</i> (++)	KS7/1,4		
<i>Bacillus arsenicus</i> (+)		KS4/1,2,3	
<i>Bacillus cereus</i> (++)	KS1/1,2,3,4 KS2/1,2,3,4 KS3/2,3,4 KS4/1,2,3,4	KS2/1,3,4 KS3/2,3,4 KS4/1,2,3,4 KS5/1,3,4	KS1/1,2,3,4 KS2/1,4 KS3/1,3,4 KS4/1,4

	KS5/1,2,3 KS7/3,4 KS8/1,2,3 KS9/1,2,3,4 KS10/1,3	KS6/1,2,3,4 KS7/2,3,4 KS8/1,3,4 KS9/1 KS10/3,4	KS5/1,2,3,4 KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3,4 KS9/1,2,4 KS10/1,2,3,4
<i>Bacillus flexus</i> (+++)		KS6/1,2,3,4 KS7/4	KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS9/4
<i>B. licheniformis</i> (+)	KS2/3 KS3/1,3 KS4/4 KS10/1,3	KS2/1 KS5/2 KS7/3,4 KS8/1,3,4 KS10/2	KS1/1,3 KS4/1 KS6/3 KS7/1,2 KS8/1,2,3,4 KS10/2,3,4
<i>Bacillus megaterium</i>	KS2/1,2,3,4	KS7/4	
<i>Bacillus muralis</i> (+)	KS3/3,4		KS2/2
<i>Bacillus mycoides</i> (++)	KS6/1 KS9/3		KS3/1 KS4/4 KS8/1,2,3,4 KS10/2
<i>Bacillus pseudomycooides</i> (++)	KS2/1,2,4 KS4/3	KS2/2,3,4 KS4/1,3	KS2/1,4
<i>Bacillus pumilus</i> (+)	KS2/1,3		
<i>Bacillus simplex</i> (+)		KS7/1,4	
<i>Bacillus subtilis</i> (++)	KS5/1,2,3,4 KS7/4 KS8/1,2,3,4 KS9/3,4	KS5/1,2,3,4 KS7/2,3,4 KS8/1,2, KS10/1,2,4	KS4/1,3,4 KS5/1,2,3,4 KS6/3
<i>Bacillus thuringiensis</i> (++)	KS2/3		KS10/3,4
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (++)	KS3/1,2,4		KS6/1,2,3,4
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (+)	KS3/1 KS4/1		

### 3. Ergebnisse

<i>Bifidobacterium thermophilum</i> (+++)			KS7/1,2,3,4 KS9/1,3,4
<i>Candida glabrata</i> (+++)	KS3/3 KS4/1 KS6/2,4		
<i>Candida parapsilosis</i> (++)	KS2/1		
<i>Comamonas testosteroni</i> (++)	KS1/1		
<i>Citrobacter braakii</i> (+++)	KS5/2 KS6/1,3		
<i>Citrobacter freundii</i> (++)	KS1/1,3,4 KS5/1,2,3,4 KS7/2,3,4 KS9/2,3,4		
<i>Citrobacter gillenii</i> (+++)	KS3/4		
<i>Clostridium baratii</i> (++)	KS7/2,3,4		
<i>Clostridium bifermentans</i> (+)	KS7/1	KS10/4	
<i>Clostridium bolteae</i> (+++)	KS10/3		
<i>Clostridium butyricum</i> (+++)	KS1/1,2 KS3/3	KS4/4	
<i>Clostridium celerecrescens</i> (+)	KS8/4		KS5/2,3,4
<i>Clostridium clostridioforme</i> (++)			KS6/1,4
<i>Clostridium cochlearium</i> (+++)	KS10/1		
<i>Clostridium colicanis</i> (++)	KS5/1,2,4	KS5/1,2,3,4	KS5/1,2,3,4
<i>Clostridium disporicum</i> (+)	KS2/2	KS3/3	
<i>Clostridium paraputrificum</i> (++)	KS10/2	KS2/3 KS3/3 KS4/1	KS5/2,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,4

		KS5/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS10/1,2	
<i>Clostridium perfringens</i> (+++)	KS1/1,2,3,4 KS2/1,2,3,4 KS3/1,2,3,4 KS4/1,2,3,4 KS5/1,2,3,4 KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3,4 KS9/1,2,3 KS10/1,2,3,4	KS2/1,2,3,4 KS3/1,2,4 KS4/1,2,3,4 KS5/1,2,3 KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3,4 KS10/1,4	KS1/1,2,3,4 KS2/1,3,4 KS4/1,3,4 KS5/1,2,3,4 KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3,4 KS10/3
<i>Clostridium sordellii</i> (+++)	KS9/2	KS5/1 KS10/4	KS6/3
<i>Clostridium sporogenes</i> (++)	KS10/2		
<i>Enterobacter cloacae</i> (++)	KS4/1,2,3,4		
<i>Enterobacter ludwigii</i> (+)	KS6/1,2,3,4		
<i>Enterococcus aquimarinus</i> (+)	KS4/2		
<i>Enterococcus avium</i> (++)	KS4/1,2,3,4	KS4/3	
<i>Enterococcus faecalis</i> (++)	KS1/1,2,3,4 KS2/4 KS4/1,2,3,4 KS6/1,2,3,4 KS7/3 KS9/1,2,3,4, KS10/1,2,3,4	KS6/1,4 KS7/1,2,3,4	
<i>Enterococcus faecium</i>	KS1/1,2,3,4 KS3/4 KS4/2,3,4 KS5/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3,4	KS2/1,3 KS3/1,2,3 KS4/2,3,4 KS5/1,4 KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4	KS2/1 KS3/4 KS4/1,3 KS6 KS8/1,3,4 KS9/1,2,3,4

### 3. Ergebnisse

	KS9/1,2,4 KS10/2,3,4	KS8/1,2,3,4 KS9/1,2,3,4 KS10/1,2,3,4	KS10/1,2,3
<i>Enterococcus faecium</i> (+)	KS8/2,4		
<i>Enterococcus haemolyticus</i> (+)	KS1/1,4		
<i>Enterococcus hirae</i> (+++)	KS2/1,2,4 KS3/1,2,3,4 KS4/1,2		
<i>Enterococcus thailandicus</i> (+)	KS1/1,2,3,4 KS2/3 KS3/1,2,3,4 KS4/3 KS6/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3,4	KS6/1	
<i>E.coli</i> (+++)	KS1/1,2,3,4 KS2/1,2,4 KS3/1,3,4 KS4/1,2,3,4 KS6/1,2,3,4 KS7/2,4	KS3/3	
<i>Klebsiella oxytoca</i> (++)	KS1/4 KS4/1,2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS10/1,2,3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (+++)	KS1/1,3		
<i>Lactobacillus amylovorus</i> (+)		KS2/1,2 KS3/1,2,3,4 KS4/2,3,4 KS7/1,2,3,4	KS2/1,3,4 KS7/2,3,4
<i>Lactobacillus brevis</i> (++)		KS8/1,2,3,4	KS5/2,3

		KS9/2	KS8/1,2,3,4
<i>Lactobacillus casei</i> (+)		KS4/2,4	
<i>Lactobacillus crispatus</i> (+++)		KS6/1,2,3,4	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (+++)			KS1/4
<i>Lactobacillus fermentum</i> (+)	KS4/1,3 KS7/3	KS10/1,2,4	KS10/1,2,4
<i>Lactobacillus gasseri</i> (++)	KS1/2,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1,2,3	KS7/1,2,3,4	KS1/3 KS2/3,4 KS3/1,3,4 KS4/1,3,4 KS7/1,2,3,4 KS8/1
<i>Lactobacillus kitasatonis</i> (++)		KS6/1,2,3,4	KS3/1,3,4 KS6/1,2,3,4
<i>Lactococcus lactis</i> (++)	KS9/1,2,3,4		
<i>Lactobacillus mucosae</i> (++)	KS3/1,2,3	KS2/2 KS3/1,4 KS4/1,4	
<i>Lactobacillus oris</i> (++)		KS6/4	
<i>Lactobacillus paracasei</i> (+++)	KS2/1,2,3 KS7/1,2,3,4 KS8/3,4 KS10/2,3	KS7/1,2,3,4 KS9/3	KS6/1,3,4 KS8/1,2,3,4 KS9/1,2,3 KS10/1,2,3,4
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> (+)			KS8/1
<i>Lactobacillus plantarum</i> (+++)	KS1/1,2,3,4 KS2/1,2,3,4 KS4/1,2,3,4		KS2/4

### 3. Ergebnisse

<i>Lactobacillus reuteri</i> (++)	KS2/1,2,3,4 KS4/1,2,3,4 KS6/1,2,3,4	KS2/3,4 KS4/1,2,3 KS6/1,2,3,4 KS9/1,2,3,4	KS9/1,2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (++)	KS1/1,2,4		KS4/3,4 KS6/1,2,3,4
<i>Lactobacillus zeae</i> (+)			KS7/1,2,3,4
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (++)	KS3/1,2		KS3/4 KS4/3
<i>Micrococcus luteus</i> (++)	KS1/2		
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (++)	KS10/1,2,4		
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (+)		KS2/2	
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (++)		KS4/2	KS1/1,2,4
<i>Paenibacillus lactis</i> (++)	KS2/4 KS4/1		KS4/1,4
<i>Paenibacillus lautus</i> (+)	KS2/2		
<i>Pandoraea sputorum</i> (+)	KS9/1,2		
<i>Pediococcus acidilactici</i> (++)		KS2/1,2,3 KS3/1,2,3,4	KS3/1,3,4 KS8/3,4 KS9/3,4
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (+++)	KS5/2	KS2/1,2,3,4 KS3/2,3,4 KS4/1 KS5/1,2,3,4 KS7/1 KS8/1,2,3,4 KS10/1,2,3,4	KS2/1,3,4 KS3/1,3 KS5/1,2,3,4 KS8/2,4 KS10/1,2,3
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (+)	KS9/1,3,4		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (++)	KS3/1,2,3 KS4/1,2,3,4 KS5/1		

<i>Pseudomonas corrugata</i> (+)	KS1/1,2,3,4		
<i>Pseudomonas monteilii</i> (+++)	KS5/2,3		
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (++)	KS1/3		
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (+)	KS5/1,3,4 KS8/1		
<i>Pseudomonas veronii</i> (++)	KS6/1,2,3,4		
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (++)	KS3/1,3,4 KS10/2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (++)	KS4/4		
<i>Serratia fonticola</i> (++)	KS6/2,3 KS9/2,3,4		
<i>Serratia liquefaciens</i> (+)	KS4/2,4 KS5/1 KS7/1 KS8/1,2,3,4		
<i>Serratia marcescens</i> (+++)	KS1/1,2,4		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	KS7/1,3		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (++)		KS6/2	
<i>Staphylococcus hominis</i> (++)	KS1/2,3 KS2/1 KS4/1		
<i>Yersinia enterocolitica</i> (++)	KS7/1,2,3,4		

KS: Klärschlamm

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.4. Ergebnisse der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

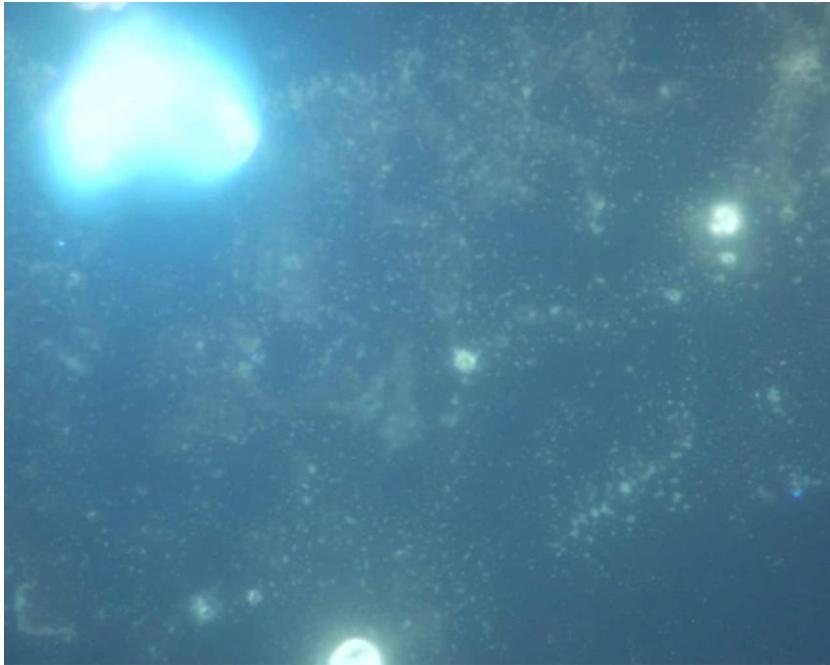


Abb. 4.) FISH - DAPI – Färbung des Klärschlammgemisches

Bei der Betrachtung der identischen Ausschnitte wird deutlich, daß die Autofluoreszenz des Klärschlammmatrix so stark ist, daß eine klare Abgrenzung der Bakterien zur Matrix nicht möglich war. Diese Störungen wie in Abb. FISH 1 und 2 dargestellt wurden in jedem Schlammgemisch beobachtet

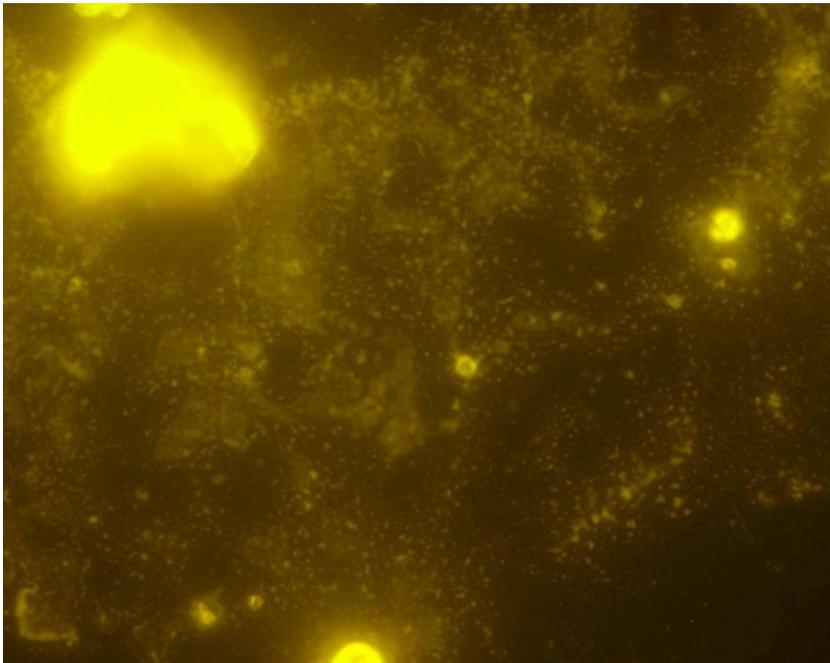


Abb. 5.) FISH Cy3 EUBmix – Färbung des Klärschlammgemisches

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.5. Ergebnisse der Fingerprint-Communityanalyse mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

In den folgenden Abbildungen 6 bis 15 sind die Bandenmuster der jeweiligen Klärschlammgemische vor und nach der Fermentation abgebildet. Dabei sind mitunter Banden nicht eindeutig in den hier abgebildeten Helligkeits- und Kontraststufen zu erkennen. Während der Definition der Banden war es jedoch möglich mit fließenden Kontrast und Helligkeitsstufen Banden vom Untergrund klarer zu erkennen.

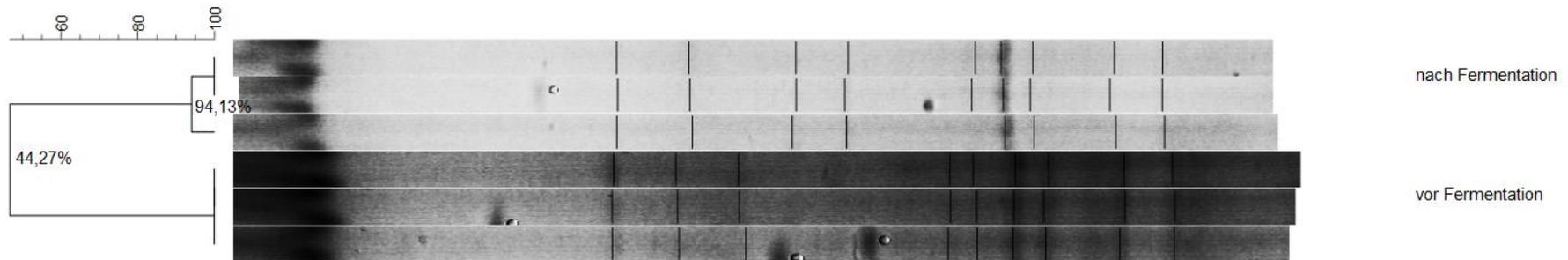


Abbildung 6.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 1 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

### 3. Ergebnisse



Abbildung 7.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 2 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

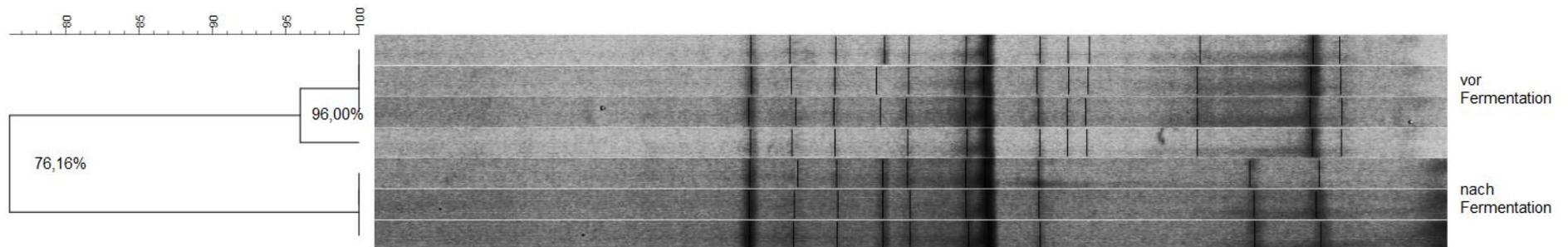


Abbildung 8.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 3 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

### 3. Ergebnisse



Abbildung 9.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 4 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.



Abbildung 10.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 5 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

### 3. Ergebnisse

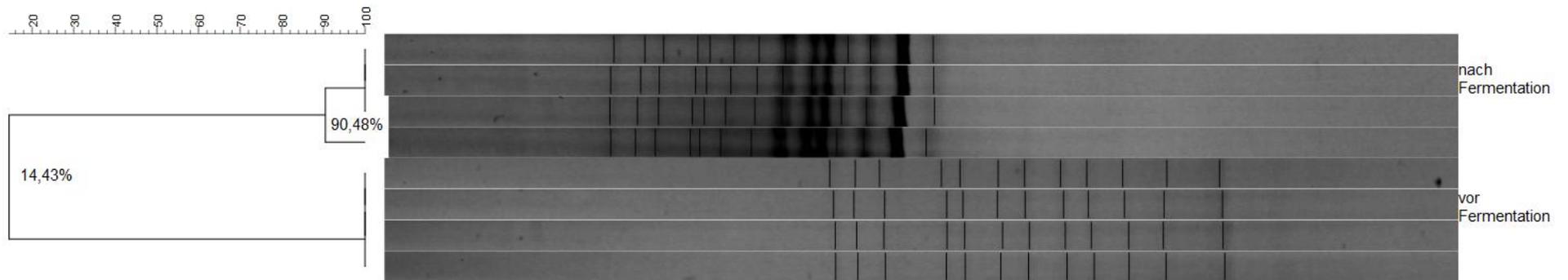


Abbildung 11.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 6 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

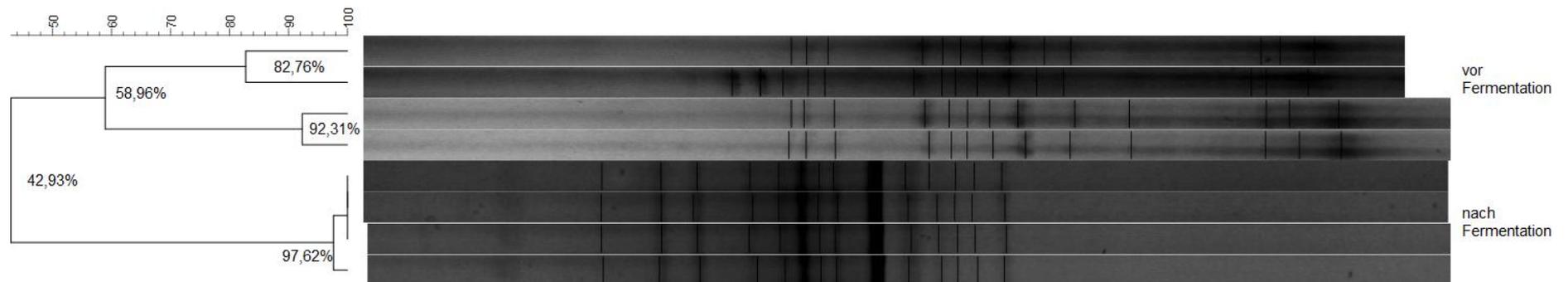


Abbildung 12.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 7 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

### 3. Ergebnisse

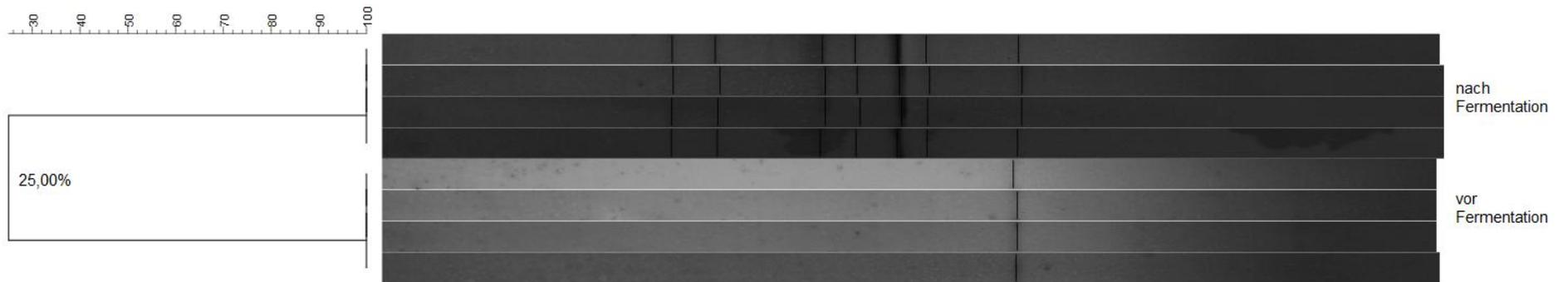


Abbildung 13.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 8 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.



Abbildung 14.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 9 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

### 3. Ergebnisse

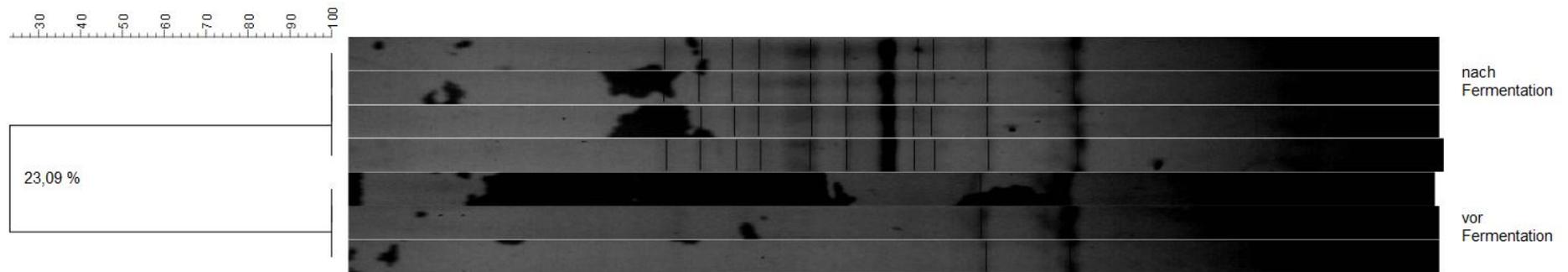


Abbildung 15.) stellt das Bandenmuster für Schlammgemisch 10 vor und nach 7 Tagen Fermentation dar. Die Prozentzahlen geben den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice an.

## 3.3. Degradierung von Pathogenen im Kuhdunggemisch und Klärschlammgemisch

In Abbildung 16 a.) ist die Keimzahl von *Clostridium perfringens* während der Fermentation dargestellt. In der nativen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,08 log KbE/g (EM) und 5,28 log KbE/g (OEM). In der sterilen Matrix konnten zum Zeitpunkt 1 kein *C. perfringens* wiedergefunden werden. Aus diesem Grunde wurde die Keimzahl anhand der Animpfdosis errechnet und mit 6,56 log KbE/g angegeben. Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration der Clostridien in der nativen Matrix auf unter die Nachweisgrenze von 2 log KbE/g (OEM). In der Behandlung mit zusätzlichen Laktobazillen konnte eine KbE in einer von 3 Proben gezählt werden, so dass die Konzentration rechnerisch mit ebenso unter 2 log KbE/g angegeben werden kann. In der sterilen Matrix sank die Konzentration auf 3,86 (EM) und 5,44 log KbE/g (OEM) innerhalb von 3 Tagen Fermentation.

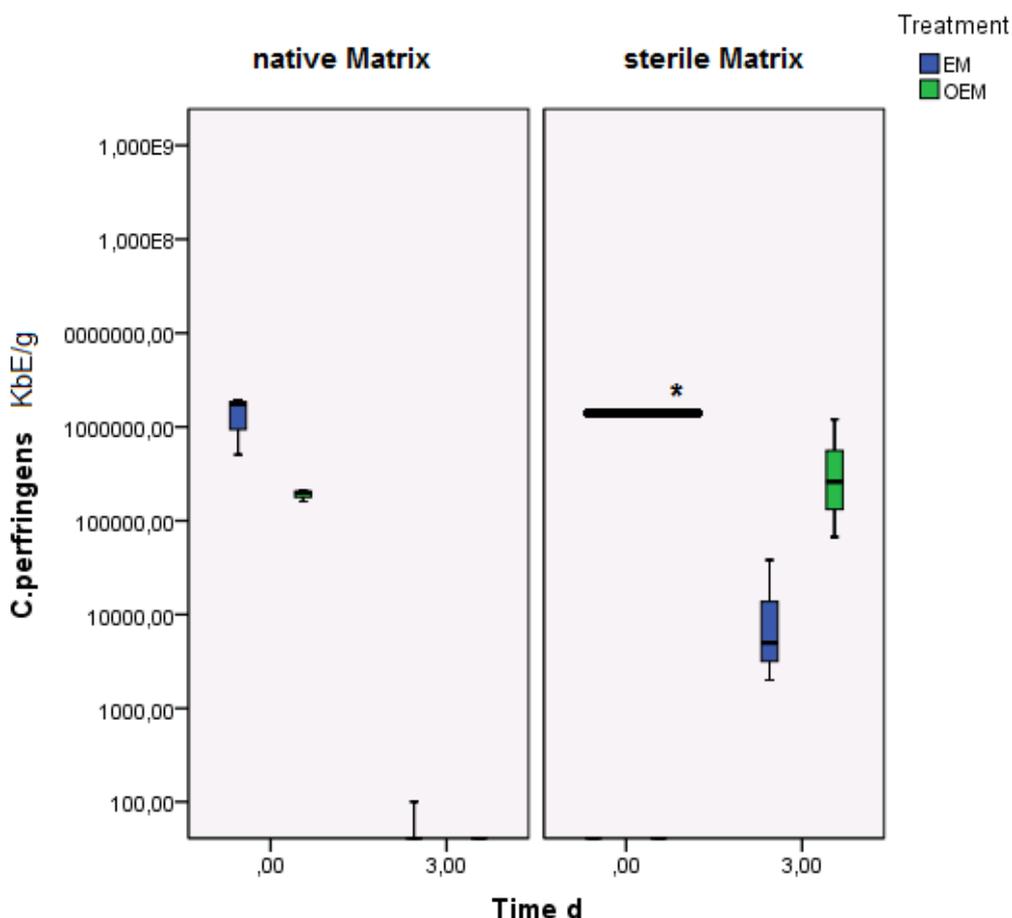


Abb. 16 a.) Verlauf der **Keimzahl von *Clostridium perfringens*** während der Fermentation in einem Kuhdunggemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

\* ist die errechnete Konzentration, der tatsächliche Wert konnte auf Grund der antagonisierenden Interaktion mit *C. sporogenes* nicht ermittelt werden.

In Abbildung 16 b.) ist die Keimzahl von *Staphylococcus aureus* während der Fermentation dargestellt. In der nativen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,99 log KbE/g (EM) und 6,98 log KbE/g (OEM). In der sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,85 log KbE/g (EM) und 6,78 log KbE/g (OEM). Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration der Staphylokokken in den nativen Matrices auf unter die Nachweisgrenze von 2 log KbE/g. In der sterilen Matrix sank die Konzentration auf 4,07 (EM) und 4,67 log KbE/g(OEM) innerhalb von 3 Tagen Fermentation.

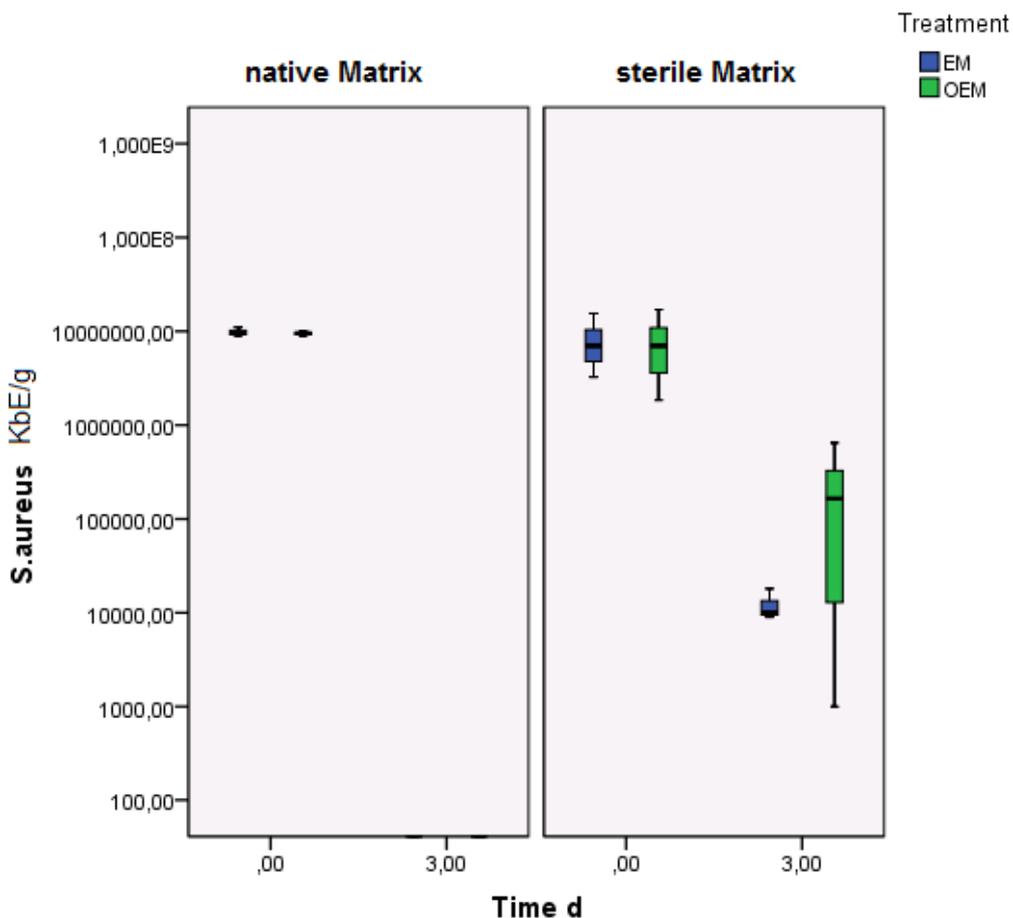


Abb. 16 b.) Verlauf der **Keimzahl von *Staphylococcus aureus*** während der Fermentation in einem Kuhdunggemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

In Abbildung 16 c.) ist die Keimzahl von *Escherichia coli* während der Fermentation dargestellt. In der nativen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 7,06 log KbE/g (EM) und 6,94 log KbE/g (OEM). In der sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,67 log KbE/g (EM) und 6,37 log KbE/g (OEM). Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration der Enterobakterien in den nativen Matrices auf unter die Nachweisgrenze von 2 log KbE/g. In der sterilen Matrix verharrte die Konzentration auf ähnlichem Niveau mit 6,57 (EM) und 6,80 log (OEM) KbE/g innerhalb von 3 Tagen Fermentation.

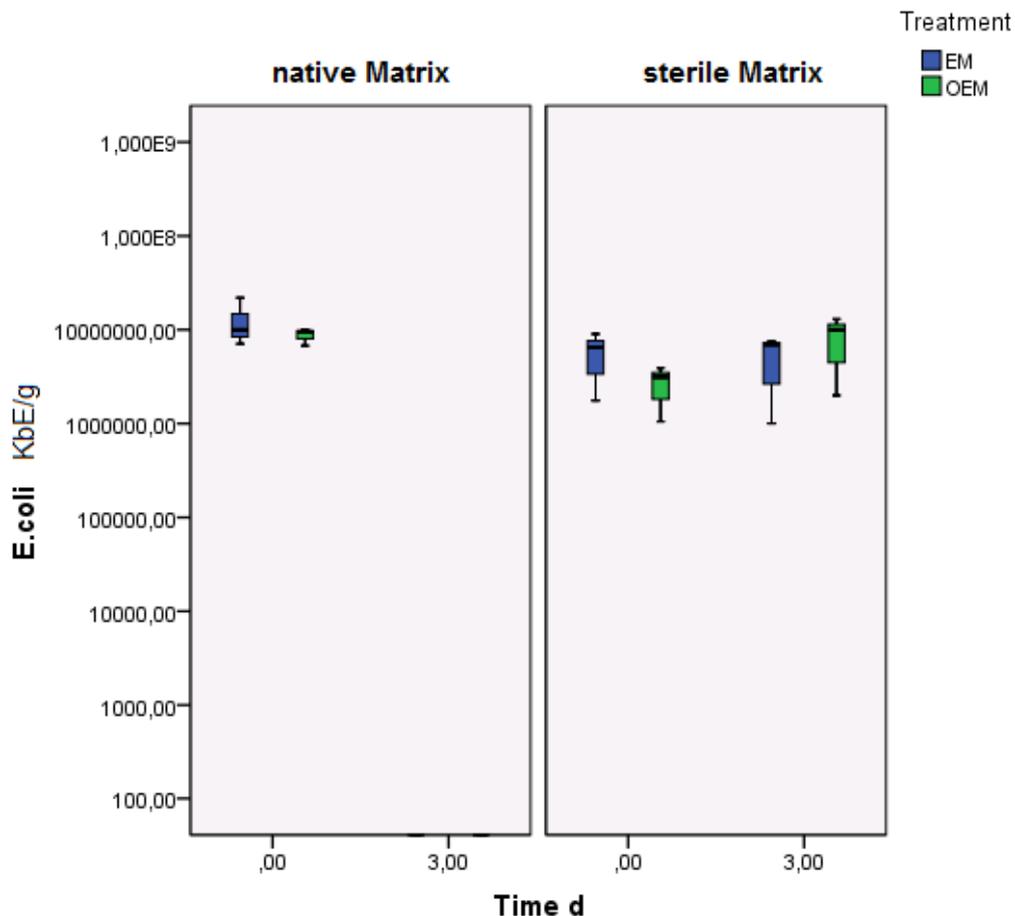


Abb. 16 c.) Verlauf der **Keimzahl von *Escherichia coli* O:157** während der Fermentation in einem Kuhdungemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 16 d.) ist die Keimzahl von *Salmonella* Senftenberg während der Fermentation dargestellt. In der nativen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 7,97 log KbE/g (EM) und 7,80 log KbE/g (OEM). In der sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 7,25 log KbE/g (EM) und 7,12 log KbE/g (OEM). Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration der Enterobakterien in den nativen Matrices auf unter die Nachweisgrenze von 2 log KbE/g. In der sterilen Matrix verharnte die Konzentration auf ähnlichem Niveau mit 7,13 log KbE/g (EM) und sank auf 6,80 log KbE/g im Ansatz OEM innerhalb von 3 Tagen Fermentation.

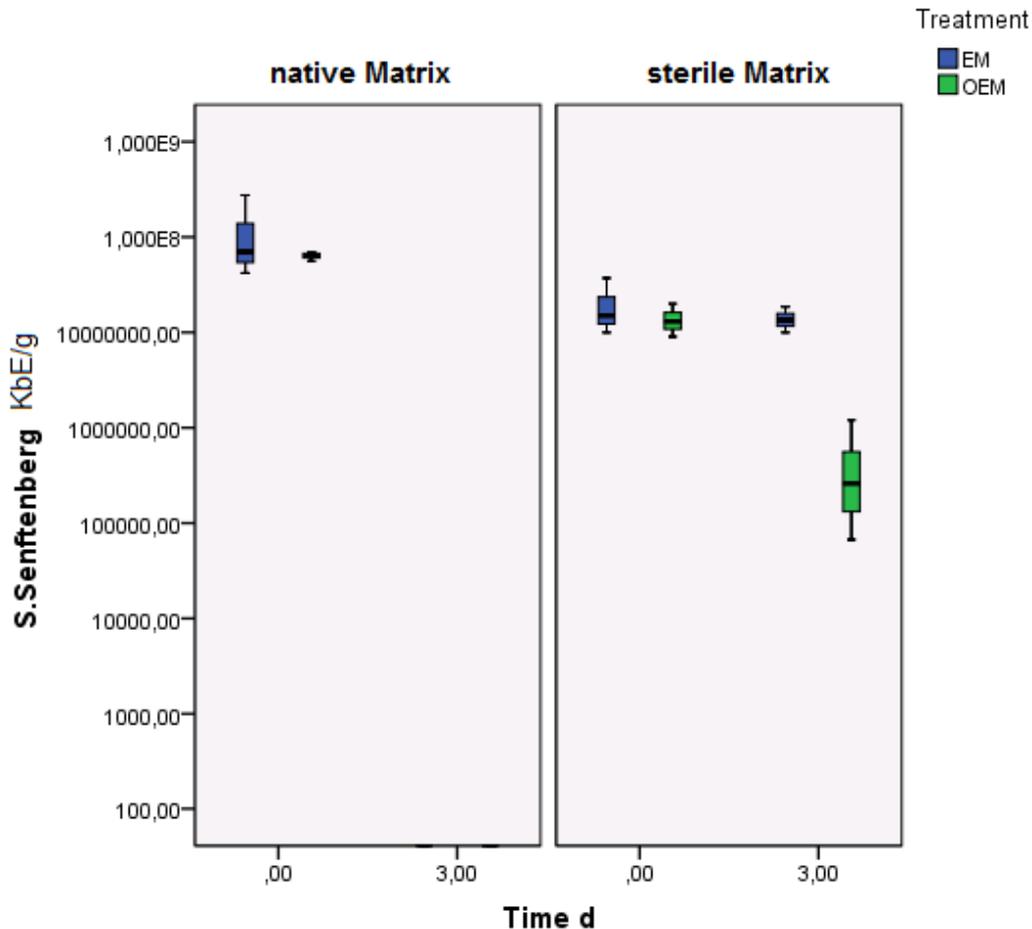


Abb. 16 d.) Verlauf der **Keimzahl von *Salmonella* Senftenberg** während der Fermentation in einem Kuhdunggemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

In Abbildung 16 e.) ist die Keimzahl von *Listeria monocytogenes* während der Fermentation dargestellt. In der nativen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 7,04 log KbE/g (EM) und 6,98 log KbE/g (OEM). In der sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,85 log KbE/g (EM) und 5,92 log KbE/g (OEM). Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration der Meningitiserreger in den nativen Matrices auf unter die Nachweisgrenze von 2 log KbE/g. In der sterilen Matrix stieg die Konzentration auf 7,76 log KbE/g (EM) und 7,69 log KbE/g (OEM) nach 3 Tagen Fermentation.

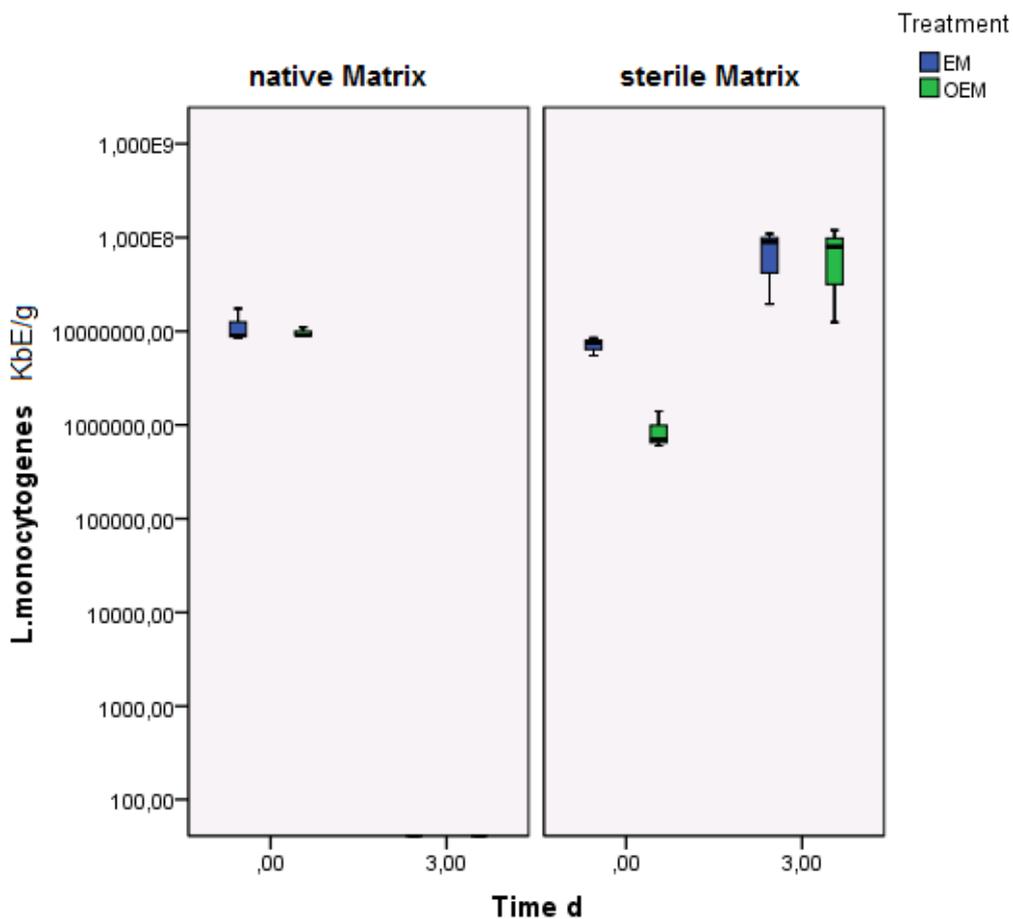


Abb. 16 e.) Verlauf der **Keimzahl von *Listeria monocytogenes*** während der Fermentation in einem Kuhdunggemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 16 f.) ist die Keimzahl von *Clostridium sporogenes* während der Fermentation dargestellt. In der nativen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,21 log KbE/g (EM) und 6,55 log KbE/g (OEM). In der sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 6,30 log KbE/g (EM) und 6,15 log KbE/g (OEM). Nach 3 Tagen Fermentation blieb die Konzentration des Sporenbildners in den nativen Matrices auf 6,49 log KbE/g(EM) und 6,56 log KbE/g(EM) auf konstantem Niveau. In der sterilen Matrix stieg die Konzentration auf 7,46 log KbE/g (EM) bzw. verblieb auf 6,32 log KbE/g (OEM) nach 3 Tagen Fermentation.

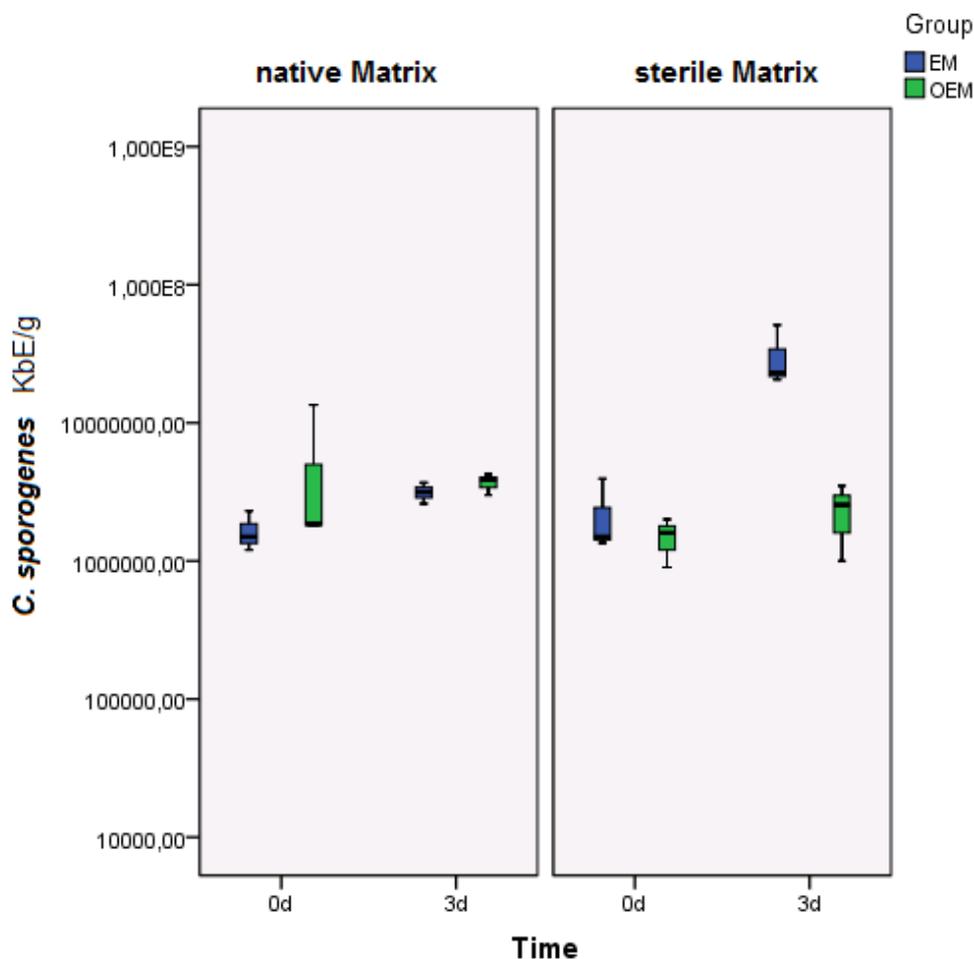


Abb. 16 f.) Verlauf der **Keimzahl von *Clostridium sporogenes*** während der Fermentation in einem Kuhdunggemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

In Abbildung 16 g.) ist die Keimzahl von *Staphylococcus aureus* während der Fermentation dargestellt. In der nativen und sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 8,28 log KbE/g. Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration des Erregers in den nativen Matrices unter die Nachweisgrenze von 3,0 log KbE/g. In der sterilen Matrix sank die Konzentration auf 5,00 log KbE/g.

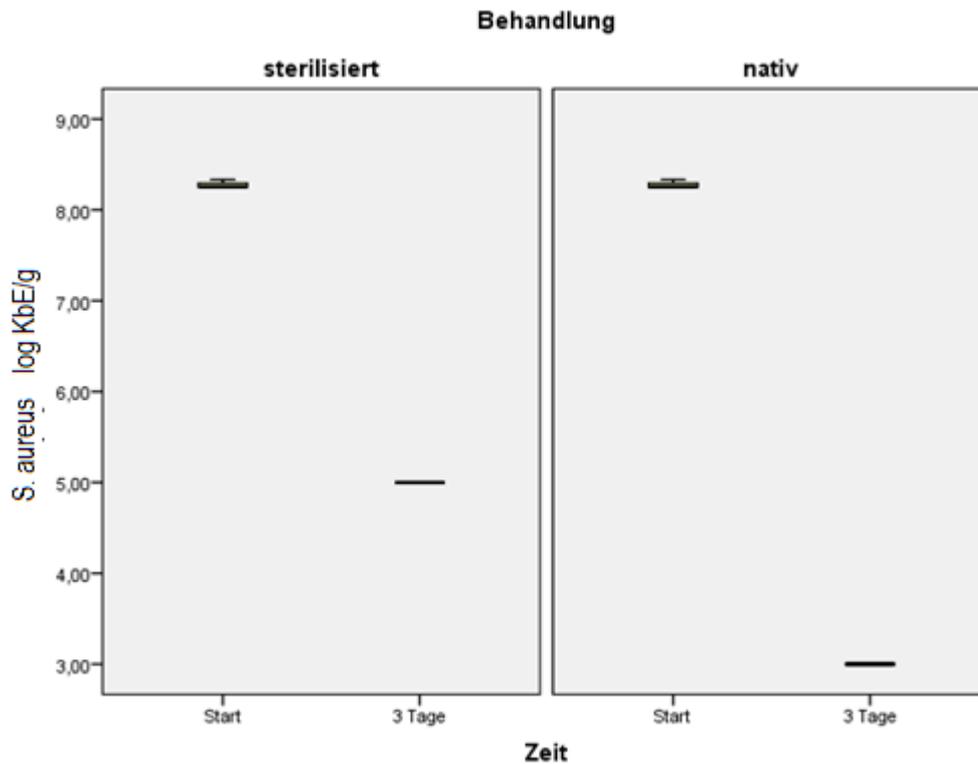


Abb. 16 g.) Verlauf der **Keimzahl von *Staphylococcus aureus*** während der Fermentation in einem Klärschlammgemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 16 h.) ist die Keimzahl von *E.coli* während der Fermentation dargestellt. In der nativen und sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 8,23 log KbE/g. Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration des Erregers in den nativen Matrices unter die Nachweisgrenze von 3,0 log KbE/g. In der sterilen Matrix sank die Konzentration auf 6,06 log KbE/g.

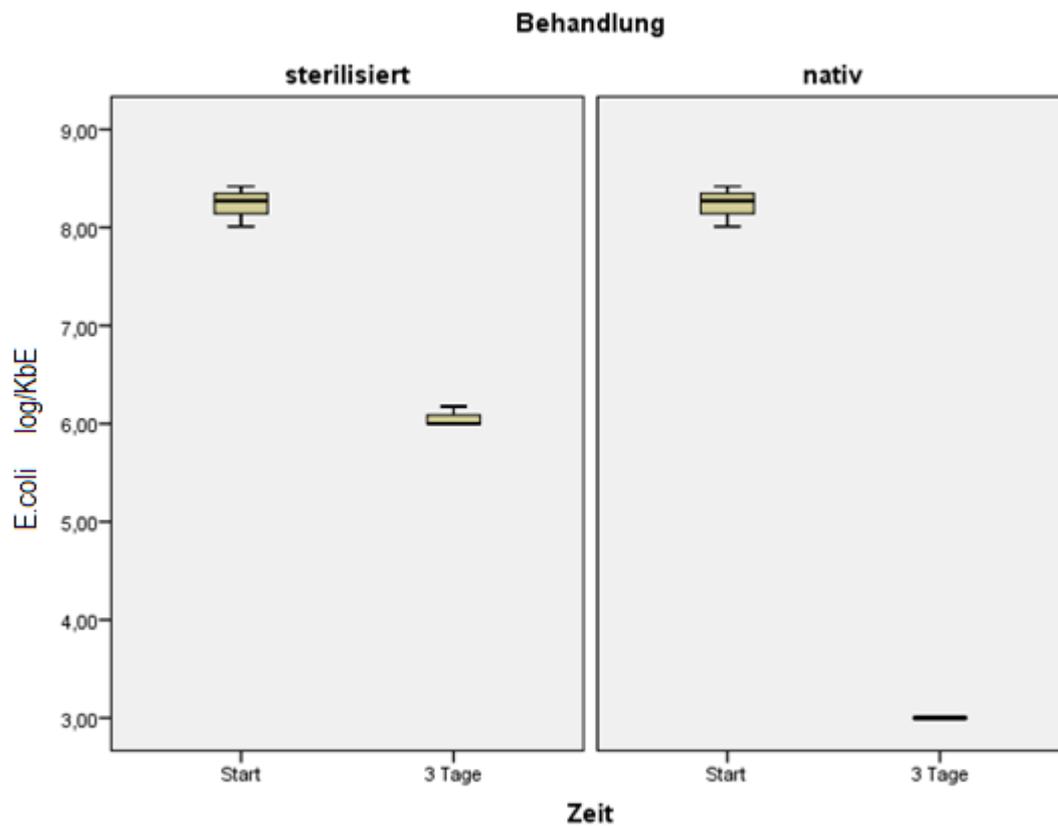


Abb. 16 h.) Verlauf der **Keimzahl von *E. coli*** während der Fermentation in einem Klärschlammgemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

In Abbildung 16 i.) ist die Keimzahl von *Salmonella* Senftenberg während der Fermentation dargestellt. In der nativen und sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 7,89 log KbE/g. Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration des Erregers in den nativen Matrices unter die Nachweisgrenze von 3,0 log KbE/g. In der sterilen Matrix sank die Konzentration auf 6,73 log KbE/g.

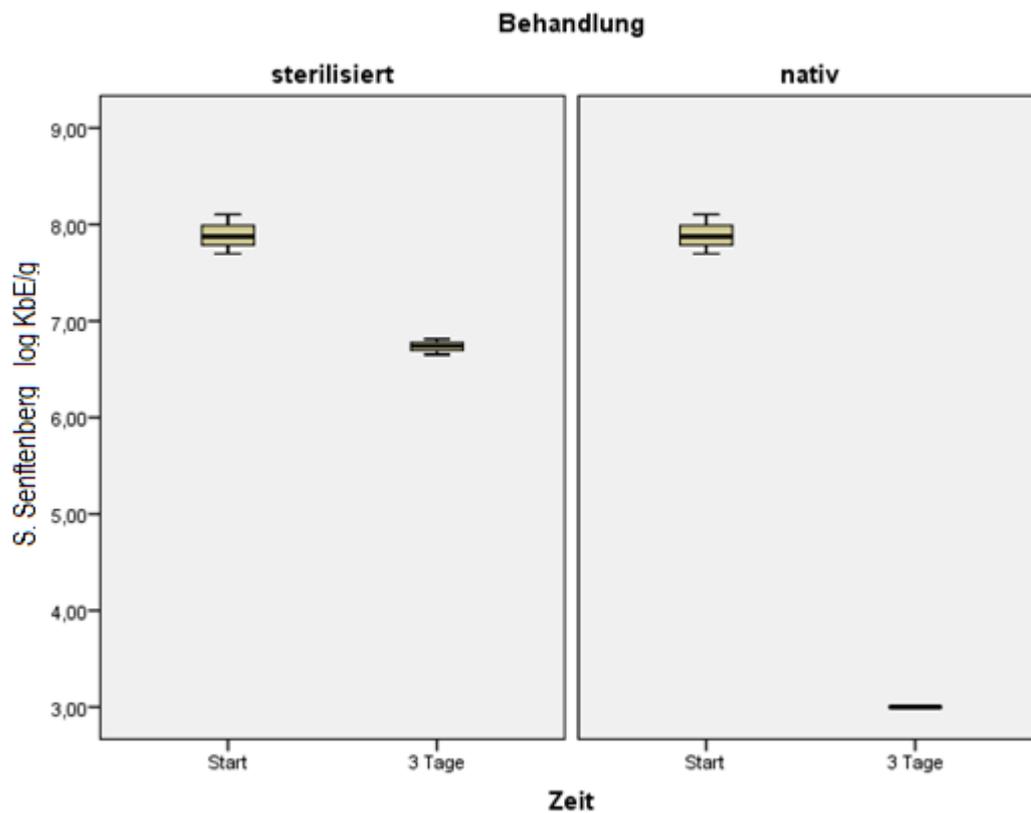


Abb. 16 i.) Verlauf der **Keimzahl von *Salmonella* Senftenberg** während der Fermentation in einem Klärschlammgemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 16 j.) ist die Keimzahl von *Listeria monocytogenes* während der Fermentation dargestellt. In der nativen und sterilen Matrix betrug die Keimzahl vor der Fermentation 8,42 log KbE/g. Nach 3 Tagen Fermentation sank die Konzentration des Erregers in den nativen Matrices unter die Nachweisgrenze von 3,0 log KbE/g. In der sterilen Matrix sank die Konzentration auf 6,34 log KbE/g.

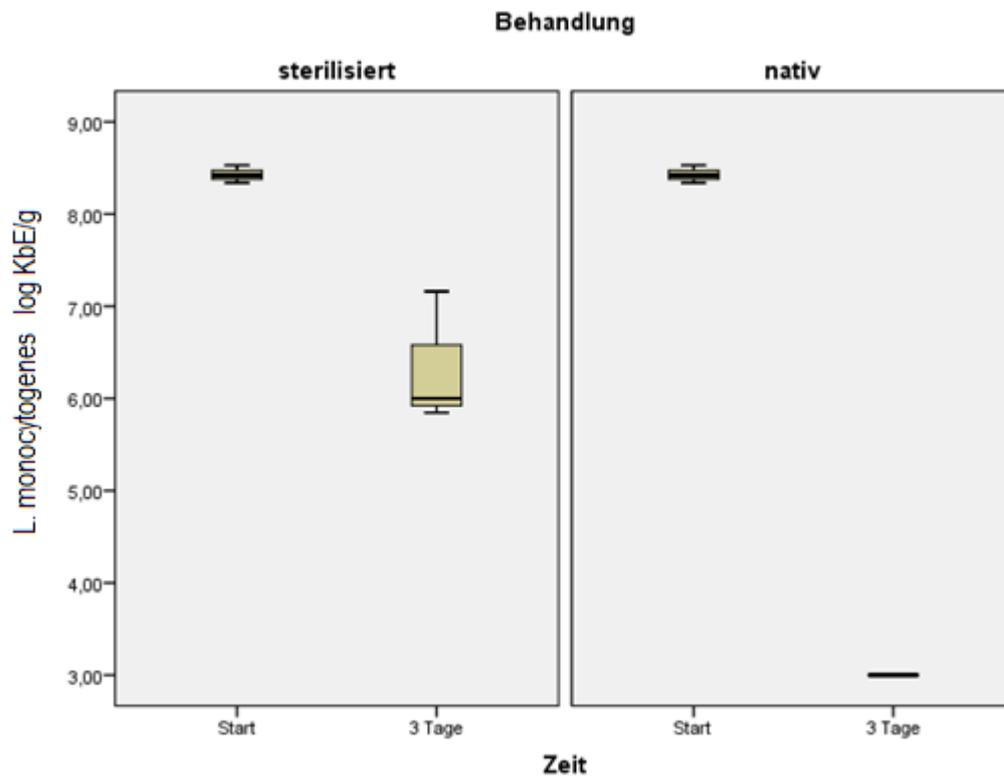


Abb. 16 j.) Verlauf der **Keimzahl von *Listeria monocytogenes*** während der Fermentation in einem Klärschlammgemisch im Laborversuch

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

Angabe Abszisse: Fermentationszeit in Tagen

## 3.4. Ergebnisse der Untersuchung zum Abbau von Arzneimittelrückständen

Tabelle 6. stellt die unterschiedlichen Konzentrationen von Clindamycin, Ciprofloxacin, Diclofenac und Estradiol in den verschiedenen Klärschlammgemischen zum Zeitpunkt vor der Fermentation dar.

Tabelle 6. Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelrückstände der Klärschlammgemische vor der Fermentation

Kurzbezeichnung	Einheit	KS1	KS2	KS3	KS4	KS5	KS6	KS7	KS8	KS9	KS10
<b>Clindamycin (TS)</b>	mg/kg TS	<b>0,236</b>	< 0,020	< 0,020	<b>0,1</b>	< 0,020	<b>0,131</b>	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020
<b>Ciprofloxacin (TS)</b>	mg/kg TS	<b>0,238</b>	<b>0,045</b>	<b>0,059</b>	<b>0,183</b>	< 0,020	<b>0,024</b>	< 0,020	< 0,020	< 0,020	<b>0,167</b>
<b>Diclofenac (TS)</b>	mg/kg TS	<b>0,097</b>	<b>0,04</b>	< 0,020	<b>0,098</b>	<b>0,034</b>	<b>0,053</b>	< 0,020	< 0,020	<b>0,354</b>	< 0,020
<b>Estradiol (TS)</b>	mg/kg TS	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020

### 3. Ergebnisse

Tabelle 7. stellt die unterschiedlichen Konzentrationen von Clindamycin, Ciprofloxacin, Diclofenac und Estradiol von ausgewählten Klärschlammgemischen nach 7 Tagen Fermentation dar. Grün markiert einen Abfall, rot einen Anstieg und gelb gleichbleibende Werte.

Tabelle 7. Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelrückstände der Klärschlammgemische nach der Fermentation

Kurzbezeichnung	Einheit	KS1	KS4	KS6	KS9	KS10
<b>Clindamycin (TS)</b>	mg/kg TS	< 0,020	<b>0,249</b>	<b>0,222</b>	< 0,020	< 0,020
<b>Ciprofloxacin (TS)</b>	mg/kg TS	< 0,020	< 0,020	<b>0,34</b>	< 0,020	< 0,020
<b>Diclofenac (TS)</b>	mg/kg TS	<b>0,035</b>	<b>0,087</b>	<b>0,175</b>	<b>0,308</b>	< 0,020
<b>Estradiol (TS)</b>	mg/kg TS	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020	< 0,020

## 3.5 Ergebnisse der Gärsäuren-, Laktat und Alkoholbestimmung

In Tabelle 8. sind die Ergebnisse der Gärsäuren-, Laktat- und Alkoholbestimmungen dargestellt. Auf die Darstellung der Capronsäure, Milchsäure, Butanol, Butandiol und Propandiol wurde verzichtet, da dort alle Werte unter der Nachweisgrenze lagen.

Tabelle 8. Gärsäuren- und Alkoholanalyseergebnisse, Ergebnisse in g/kg Originalsubstanz

	Essigsäure	Propionsäure	i- Buttersäure	n- Buttersäure	Ethanol	Propanol	i- Valeriansäure
OEM (steril) (t0)	1,22	0,29	0,06	0,08	< 0,05	< 0,05	< 0,05
EM (steril) (t0)	1,35	0,28	0,05	0,09	< 0,05	< 0,05	< 0,05
OEM (steril) (t1)	1,13	0,26	0,05	0,07	< 0,05	< 0,05	< 0,05
EM (steril) (t1)	1,33	0,27	0,05	0,09	< 0,05	< 0,05	< 0,05
OEM (steril) Mix3 (t1)	2,17	0,24	0,09	0,55	0,80	0,11	0,11
EM (steril) Mix3 (t1)	2,06	0,23	0,09	0,47	0,76	0,11	0,11
OEM (t0)	2,20	0,20	0,06	0,07	1,85	< 0,05	< 0,05
EM (t0)	2,79	0,26	0,06	0,09	1,99	< 0,05	< 0,05
OEM (t1)	1,68	0,26	0,05	<b>4,42</b>	1,28	0,04	< 0,05
EM (t1)	2,85	0,25	0,05	0,46	1,33	0,14	< 0,05
OEM Mix1 (t1)	2,63	0,25	0,05	<b>4,30</b>	1,55	0,14	< 0,05
EM Mix1 (t1)	1,67	0,27	0,05	<b>8,23</b>	1,45	0,13	< 0,05
OEM Mix2 (t1)	1,92	0,28	0,10	<b>4,21</b>	1,29	< 0,05	0,12
EM Mix2 (t1)	3,14	0,29	0,10	<b>2,13</b>	1,34	< 0,05	0,12

### 3. Ergebnisse

#### 3.6. Ergebnisse der pH-Wertbestimmung

Abbildung 17 a.) stellt die pH-Wertänderung innerhalb der siebentägigen Fermentation der Klärschlammgemische dar. Der pH-Wert sinkt in jedem Gemisch im Laufe der Fermentation ab. In Gemisch 10 von 6,76 auf 5,18; in Gemisch 9 von 6,44 auf 5,22; in Gemisch 8 von 7,13 auf 5,67; in Gemisch 7 von 6,33 auf 4,88; in Gemisch 6 von 6,42 auf 5,05; in Gemisch 5 von 7,09 auf 5,3; in Gemisch 4 von 6,81 auf 5,18; in Gemisch 3 von 7,01 auf 5,97; in Gemisch 2 von 6,31 auf 5,21 und in Gemisch 1 von 5,94 auf 5,55.

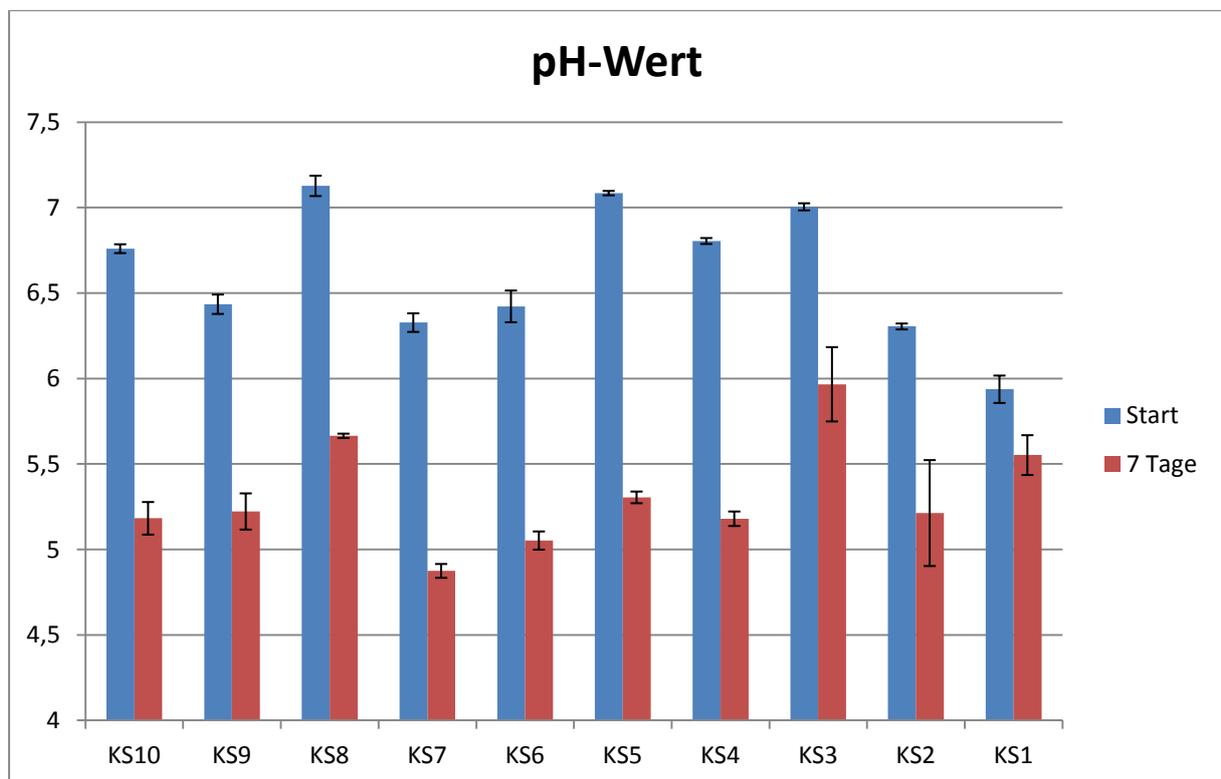


Abb. 17 a.) stellt die pH-Werte der Klärschlammgemische im Verlauf von 7 Tagen Fermentation dar.

Abbildung 17 b.) stellt die pH-Wertänderung innerhalb der dreitägigen Fermentation der mit verschiedenen Pathogenen versehenen Matrices dar. Während die pH-Werte der autoklavierten Matrices ohne Zusätze von Pathogenen, startend mit Werten von 6,72 (OEM) und 6,70, (EM) nach 3 Tagen Fermentation auf nahezu gleichem Niveau bleiben 6,70 (OEM) und 6,63 (EM), sinken die pH-Wert der Proben mit den lebenden Matrices auf 5,37 (OEM) bzw. 4,94 (EM).

Die Proben mit der autoklavierten Matrix sowie dem Pathogenmix 3 sinken auf 6,10(OEM) bzw. 6,08 (EM) nach 3 Tagen Fermentation.

Die Proben mit dem Pathogenmix 2 sinken auf 5,55 (OEM) bzw. 5,10 (EM) und die Proben mit dem Mix 1 sinken auf 5,64 (OEM) bzw. 5,50 (EM) nach 3 Tagen Fermentation.

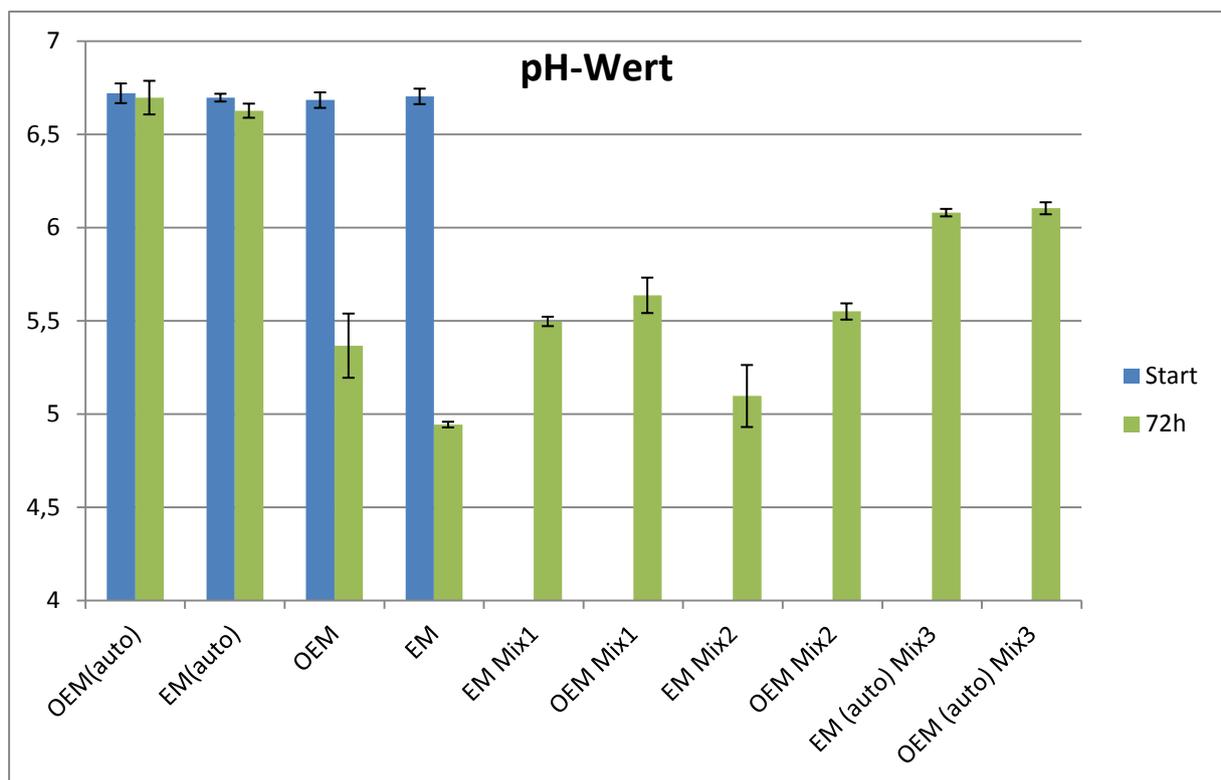


Abb. 17 b.) Entwicklung der pH-Werte während des Pathogenabbauversuches im Verlauf der 3-tägigen Fermentation des Kuhdunggemisches.

### 3. Ergebnisse

Abbildung 17 c.) stellt die pH-Wertänderung innerhalb der dreitägigen Fermentation der mit Pathogenen versehenen Klärschlamm-matrices dar. Während die pH-Werte der autoklavierten Matrices ohne Zusätze von Pathogenen, startend mit einem Wert von 6,73, nach 3 Tagen Fermentation auf 5,87 sinken, sinken die pH-Werte der Proben mit den lebenden Matrices auf 5,07.

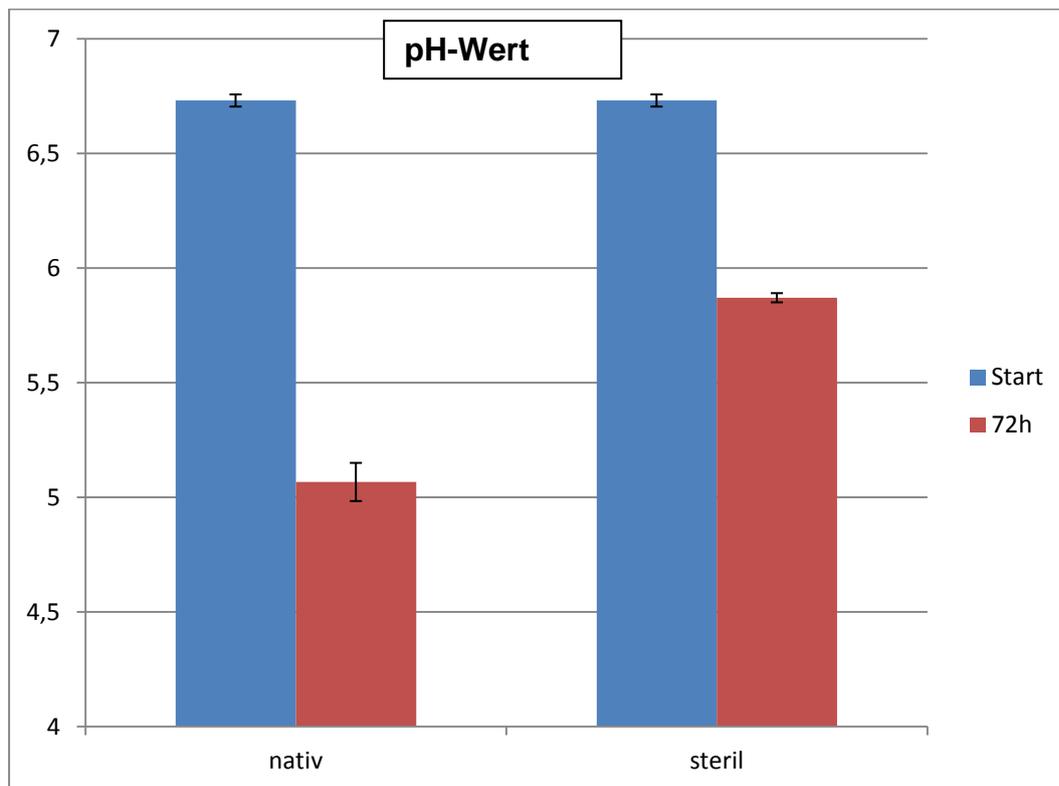


Abb. 17 c.) Entwicklung der pH-Werte während des Pathogenabbauversuches im Verlauf der 3-tägigen Fermentation des Klärschlammgemisches.

## 3.7 Ergebnisse der Felduntersuchungen zum Haferertrag

Abbildung 18.) stellt das mittlere Ährgewicht der verschiedenen Versuchsgruppen sowie signifikante Unterschiede dar. Das mittlere Gewicht der Ähren beträgt bei EM 382,10mg; bei K/EM 406,23 mg; bei K/Kanne 384,21mg; bei K/OEM 392,48mg; bei Kanne 409,55 mg; bei OEM 234,69 mg; bei OHK/OEM 399,02 mg und am höchsten liegt das mittlere Gewicht in den Kontrollfeldern mit 463,57 mg.

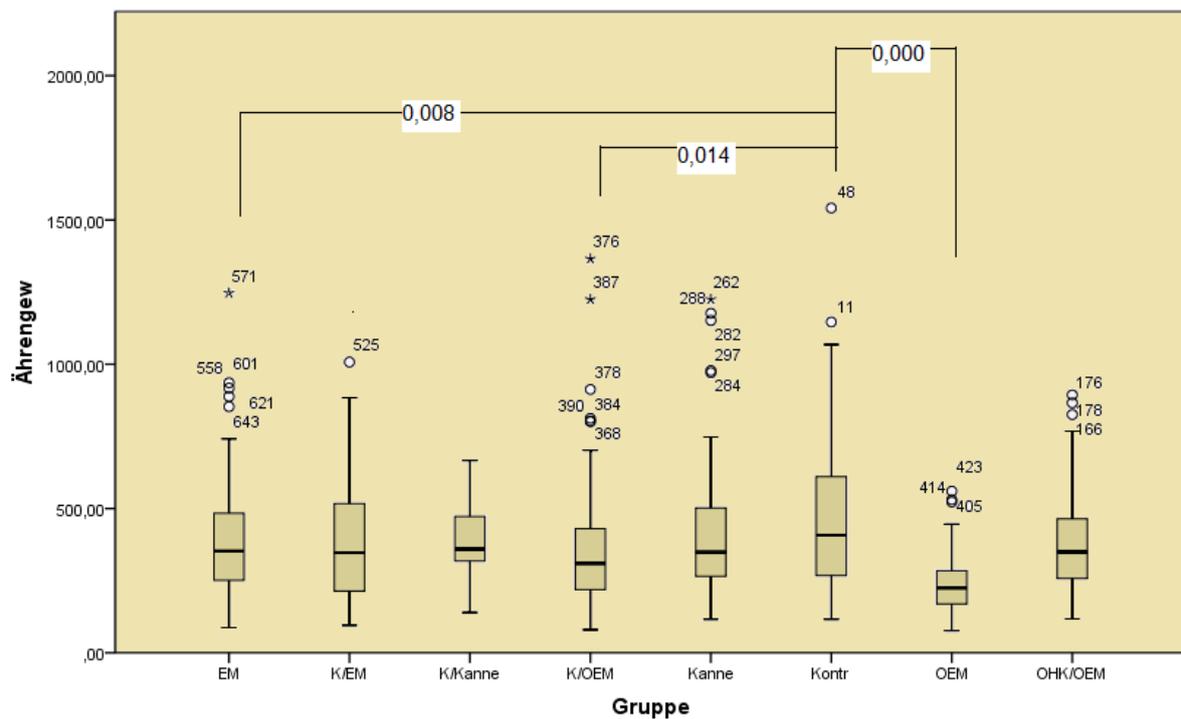


Abb. 18.) Darstellung des mittleren Ährgewichts auf den unterschiedlichen Versuchsbeeten.

## 4. Interpretation und Diskussion

### 4. Interpretation und Diskussion

#### 4.2.2. Interpretation der quantitativen Keimfloraveränderungen

Durch den Fermentationsprozess werden unabhängig von der Herkunft des Schlammes die für Fäkalabfälle typischen Enterobakterien und Hefen bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Die neue Flora wird am dritten Tag insbesondere dominiert von Spezies der Familie der *Lactobacillaceae* mit einem mittleren Anstieg von 4,24 auf 6,90 log KbE/g. Ein Anstieg der Enterokokken von einem mittleren Wert von 4,23 auf 4,47 log KbE/g zum Tag 3 war ebenfalls festzustellen. Während am siebenten Tag der Fermentation die Konzentration dieser beiden Taxa wieder auf 5,58 log KbE/g bzw. 3,32 log KbE/g abnimmt, liegt in vielen Schlammgemischen die Konzentration der Enterokokken bereits unter der Nachweisgrenze, während die der *Lactobacillaceae* weiterhin den Löwenanteil der mesophilen Gesamtkeimzahl ausmacht. Zudem scheinen aerobe sowie anaerobe Sporenbildner die Behandlung verhältnismäßig besser zu überstehen, als Nichtsporenbildner. So ist z.B. *Bacillus cereus* in allen Proben auch nach der Fermentation zu finden. Ähnlich verhält es sich mit den Clostridien, die jedoch auch einer geringen Degradierung unterliegen. So konnte mittels dem MPN-Verfahren das Absinken der Anzahl der sporenbildenden Sulfidreduzierer innerhalb von 7 Tagen von 3,82 auf 3,04 log MPN/g beobachtet werden. Dies konnte auch mit dem Plattenzählverfahren beobachtet werden, in dem die mittlere Clostridienzahl von 4,75 log KbE/g auf 3,91 log KbE/g abfiel. Der gewählte Beobachtungszeitraum von 3 und 7 Tagen scheint von einer starken Wachstums- und Absterbedynamik gekennzeichnet zu sein. Neben den massiven Keimzahlschwankungen zwischen den unterschiedlichen Gemischen, zeigten sich starke Schwankungen auch in den hohen Streuungen der Einzelwerte der jeweiligen Schlammgemische. Dies legt die Vermutung nahe, dass in dieser Phase das System einer exponentiellen Wachstumsphase unterliegt. Ein stärker aufgelöstes Beobachtungszeitfenster könnte die Dynamik wahrscheinlich umfassender beschreiben. Betrachtet man parallel zu den erhobenen mikrobiologischen Daten die Gär säure-, Alkohol- und Laktatwerte sowie die pH-Wertverschiebungen muss die aufgestellte Hypothese, die Hygienisierung erfolge auf Grund der milchsauren Fermentation und der damit einhergehenden Laktatbildung teilweise verworfen bzw. modifiziert werden. Denn die Daten betrachtend, scheinen durchaus *Lactobacillaceae* ursächlich für den Abfall der kottypischen Flora verantwortlich zu sein, da sie parallel zum Abfall ansteigen, jedoch wird entweder das Laktat direkt nach der Wirkung von anderen Keimen verstoffwechselt oder es wird eben nicht in einer relevanten Menge gebildet. (Presser, et al., 1998)

#### 4.2.3. Interpretation der qualitativen Keimfloraveränderungen

##### Gram-positive Bakterien

In Tabelle 5.) wird aus qualitativer Sicht deutlich, dass während der Fermentation eine Verschiebung innerhalb der Bakterienpopulation stattfindet. Während im Ausgangsmaterial Gram-positive Kokken wie *Staphylococcus spp.* oder pathogene Hefen wie *Candida glabrata* noch in einigen Proben zu finden sind, können sie weder nach 3 Tagen noch nach 7 Tagen Fermentation gefunden werden. Dass diese Staphylokokken sowie der Rifampicin und Streptomycin resistente *Staphylococcus aureus* – Stamm im Pathogenabbauversuch (vgl. 3.3.) durch die Fermentation eliminiert werden, lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch die multi-resistenten MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*) diesen Prozess nicht überstehen dürften.

*Bacillus cereus* konnte in rund 72,5% der Proben vor der Fermentation nachgewiesen werden, jedoch in 92% aller Proben nach der Fermentation. Mit großer Wahrscheinlichkeit waren die *B. cereus*-Konzentrationen vor der Fermentation zu gering, um sich zwischen den anderen Erregern mit ähnlichen Ansprüchen an den Nährboden durchzusetzen und waren damit für den Experimentator nicht auszählbar. Mit der Fermentation jedoch konnte die kompetitive Flora stärker geschädigt werden als die der sporenbildenden Bazillen, so dass diese leichter auf dem Nährboden nachweisbar wurden. Ähnlich verhielt es sich bei der Fermentation mit *B. licheniformis*. *B. licheniformis* übersteht vermutlich die Fermentation in Sporenform oder kann unter den Bedingungen eine gewisse Wachstumsrate aufrecht erhalten, denn Bernlohr beobachtete (Bernlohr, et al., 1960) auch Wachstum von *B. licheniformis* unter pH 5. Die ermittelten *B. licheniformis*-Konzentrationen lag z.B. in KS10 konstant bei 4 log KBE/g vor, während und nach der Fermentation.

In nur einer Versuchsvariante tritt vor der Fermentation *Pediococcus pentosaceus* in Erscheinung, nach 3 Tagen Fermentation jedoch in 52,5% aller Gefäße. Dabei sind im Besonderen die Schlammgemische 2,3,5,8 und 10 hervorzuheben. Anstelle von *Pediococcus pentosaceus* scheint *Lactobacillus reuteri* in den Gemischen 4,6 und 9 eine hervorgehobene Rolle in der Gruppe der *Lactobacillaceae* zu spielen. In Schlamm 7 hingegen scheint die ökologische Nische unter drei *Lactobacillaceae*-Vertretern aufgeteilt zu sein, *Lactobacillus amylovorus*,

#### 4. Interpretation und Diskussion

*Lactobacillus gasseri* sowie *Lactobacillus paracasei*. All diese Spezies sind in der Lage Bakteriozine zu bilden. (Dillon, et al., 1994) (Callewaer, et al., 1999) (Lozo, et al., 2004)

Ebenso wurde in nahezu allen untersuchten Schlämmen nach 3 Tagen Fermentation *Enterococcus faecium* gefunden, dessen Bacteriozin homolog zu der Gruppe der Pediocine ist. (Aymerich, et al., 1996)

*Clostridium perfringens*, ein sporenbildender, anaerober, toxinbildender potentieller Krankheitserreger, kommt im Magendarmtrakt (MDT), im Klärschlamm sowie Boden vor und verursacht eine Vielzahl von Erkrankungen. Während der Fermentation konnte keine Vermehrung des Erregers festgestellt werden vielmehr ein leichter Abfall der Population. Als Sporenbildner kann er im Vergleich zu Nichtsporenbildner 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. Das von *Pediococcus pentosaceus* gebildete Bacteriozin Pediocin A wirkt auch gegen von *Pediococcus pentosaceus* gebildete Bacteriozin Pediocin A wirkt auch gegen *Clostridium (C.) perfringens*, *C. sporogenes* und *C. botulinum*. Zudem ist das Pediocin A auch gegen Sporen von *C. botulinum* Typ A und B ab einer 10 fach höheren Zellkonzentration der Pediocinbildner zu *C. botulinum* wirksam. (Dillon, et al., 1994)

*Lactobacillus gasseri* als Bacteriozinbildner gegen Gram-positive und Gram-negative Erreger (Delgado, et al., 2007) (Kawai, et al., 1998) konnte nach 7 Tage Fermentation in den Gefäßen der Schlammgemische 3,4,7 besonders häufig gefunden werden, in den Proben 6 dominierte *Lactobacillus kitasatonis* sowie *Lactobacillus paracasei*. Letzter war auch besonders häufig in den Gemischen 6,8,9 und 10 aufzufinden. *Pediococcus pentosaceus* dominierte auch nach 7 Tagen im Gemisch 5. In Gemisch 2 wurde weiter häufig *Lactobacillus amylovorus* gefunden. Ob hinter dieser uneinheitlichen Flora ein Sukzessionssystem, von „Pionier- *Lactobacillaceae*“, vergleichbar mit R-Strategen und darauffolgenden stressresistenteren K-Strategen, verborgen ist oder das System eher chaotischer Natur und abhängig von der Ausgangsflora ist, ist mit dem gegebenen Zeitfenster nicht nachzuvollziehen.

## Gram-negative Bakterien

*E. coli* trat in 50% aller Proben auf, Klebsiellen und Pseudomonaden mit 35%, *Acinetobacter* sp. mit 27,5% sowie Yersinien mit 10% waren von der Gram-negativen Kotflora vertreten. Vertreter dieser Gattungen gehören zu den potentiell pathogenen Bakterien. Besonders Enterobakterien mit ihrem derzeit prominenten Vertreter *K. pneumoniae* haben als ESBL (Extended-Spektrum Beta-Laktamase)-Bildner Eigenschaften erworben, die antibiotische Therapien infizierter Patienten infrage stellen. Nach 7 Tagen Fermentation war kein Gram-negatives Bakterium mehr nachweisbar, lediglich ein einzelner Fund von *E. coli* war noch nach 3 Tagen nachweisbar. Mutmaßlich spielen auch hier Bakteriozine eine wichtige Rolle. Von *Lactobacillus reuteri* ist beispielsweise bekannt, dass dieser auch gegen Gram-negative Bakterien wirksame Bakteriozine bilden kann. (Vandenbergh, 1993)

### 4.2.4. Interpretation der FISH - Untersuchungen

Zur Untersuchung der Klärschlämme war die angegebene Kombination vom Cyt3 und DAPI Farbstoff ungeeignet. Die Matrix hatte eine sehr starke Autofluoreszenz, was das Erkennen der Bakterien vor dem Hintergrund unmöglich machte. In der Literatur wird mitunter vorgeschlagen eine Kombination von Cyt5 und Sytox bei dem Vorhandensein von Tonmineralien anzuwenden (Klauth, 2001) Diese Methode birgt jedoch den Nachteil, dass Cyt5-markierte Bakterien nur mit einer Kamera sichtbar gemacht werden kann, was eine direkte Auszählung mit einem im Okular angebrachten Zählfenster nicht ermöglicht. Zudem führt die Abgrenzung der Bakterien von Matrixpartikeln mittels Kamera und dem damit verbundenen Informationsverlust durch Zwischenschaltung einer Kamera als unzuverlässigen Ergebnissen. Typisch stäbchenförmige Bakterien waren nur in minimalen Konzentrationen (maximal 1-2 Bakterien im Sichtfeld, häufig gar keine) um die Nachweisgrenze der Methode von  $10^5$  Keime/ml zu finden und somit nicht bewertbar, Enterokokken und Pediokokken hingegen unterschieden sich auf Grund ihrer Form nur sehr schlecht von der Schlammmatrix.

### 4.2.5. Interpretation der Floraanalysen mittels TGGE

In den Abbildungen TGGE 1 bis 10 fällt auf, dass die Ähnlichkeitskoeffizienten zwischen den Einzelproben deutlich größer ausfallen als die zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach 7 Tagen Fermentation. Daraus und auch aus den Bandenbildern selbst lässt sich

## 4. Interpretation und Diskussion

erkennen, dass eine deutliche Veränderung der Bandenmuster stattgefunden hat, einige Banden erschienen an neuen Positionen, andere verschwanden während der Fermentation. Da die unterschiedlichen Banden unterschiedliche Gensequenzen repräsentieren liegt die Vermutung nahe, dass es eine Veränderung in der Abundanz der verschiedenen Gensequenzen gab. Die Veränderung der Abundanz wiederum legt nahe, dass es zu einem deutlichen Florawechsel kam. Alle Fermentationsgemische der unterschiedlichen Ausgangsschlämme hatten vor und nach der Fermentation untereinander eine recht geringe Ähnlichkeit. Eine Vereinheitlichung des Bandensystems mittels Fermentation durch Ausbildung einer Einheitsflora konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung der aufgetrennten Banden muss dem zukünftig nachgegangen werden. In unseren Untersuchungen wurden Bandenmuster auf Ähnlichkeiten mit anderen Bandenmustern hin verglichen. Die Möglichkeit, dass bereits eine Bande, die einen potentiellen Leitkeim repräsentiert, auf Grund der mannigfaltigen Begleitbanden der Begleitflora nicht ins Gewicht fällt, besteht durchaus. Auch ist es möglich, dass die gleichen mikroökologischen Nischen von unterschiedlichen Keimen, die in den unterschiedlichen Ausgangsschlämmen enthalten sind, besetzt werden. So könnte eine Hygienisierung durch die unterschiedlichsten Floren realisiert werden. Mit einer Sequenzierung der Banden könnte zudem noch geklärt werden können, ob es sich bei den amplifizierten Sequenzen um Arten handelt, die ggf. bisher noch nicht mit den kulturellen Verfahren nachgewiesen werden konnten. Die Fingerprints belegen deutlich, dass mit Hilfe dieser molekularbiologischen Methode die Ergebnisse der kulturellen Verfahren untermauert werden konnten.

### 4.3. Interpretation der Degradierung von Pathogenen im Kuhdung- und Klärschlammgemisch

In den Degradierungsexperimenten konnte, ähnlich wie in den Experimenten des ersten Teils des Projektes, ein Abbau von Krankheitserreger durch die Matrix beschrieben werden. Unabhängig von der Ausgangsmatrix, ob Dung oder Klärschlamm, die Krankheitserreger, *Salmonella* Anatum, *Listeria monocytogenes*, EHEC *E.coli* O:157, *Salmonella* Senftenberg, und *Staphylococcus aureus*, konnten ausnahmslos unter die Nachweisgrenze von  $10^3$  KbE/g degradiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass die fermentierende Flora essentiell für den Hygienisierungsvorgang ist. Im sterilen Medium wurde kein Erreger unter die Nachweisgrenze degradiert. *Clostridium perfringens* und *Clostridium sporogenes* interagierten entweder in der Matrix oder auf der auszählenden Agarplatte, so konnte in Mix 3 zu Beginn weder die eine noch die andere Clostridienspezies nachgewiesen werden. Nach der Fermentation in der sterilen Matrix konnte lediglich *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden. Aus diesem

Grunde wurde der Versuch noch einmal mit *Clostridium sporogenes* als Einzelkeim wiederholt. Dabei bestätigte sich der Verdacht, dass Sporenbildner schwerer zu degradieren sind. Ein Abfall wie bei der Clostridienzahl während der 7-tägigen Fermentation der 10 Klärschlämme konnte nicht beobachtet werden. In den Matrices mit Klärschlämmen als Ausgangssubstanz kommt es zu einem deutlichen Keimabfall auch in den sterilen Matrices. Zwar konnte in keiner sterilen Matrix der Keimgehalt unter die Nachweisgrenze degradiert werden, dennoch scheint der autoklavierte Klärschlamm für diese Keime ein nicht so gutes Substrat zu sein. Möglich ist eine protektive Wirkung der Melasse in der (autoklavierten) EM Suspension der Kuhdungansätze oder eine negative Wirkung von Detergenzien wie Waschmittel- und Seifenrückstände in den Klärschlämmen. An Hand der erfolgreichen Degradierung der Pathogene in den nativen Klärschlamm-matrices kann man erkennen, dass das zu hygienisierende fäkale Ausgangssubstrat, unabhängig von der Herkunft der Fäkalien, während der milchsauernden Fermentation dekontaminiert wird.

#### 4.4 Interpretation der Untersuchung auf pharmazeutische Wirkstoffe.

Die Belastung der Klärschlamm-matrices mit Wirkstoffen war je nach Herkunft der Schlämme sehr unterschiedlich. (Tab. 6.) Auffällig war der negative Estradiolbefund in allen untersuchten Schlämmen. Die Ergebnisse lassen sich in zwei Richtungen diskutieren: Es könnte wie im ersten Projektteil für Sulfadimidin zu einer schnellen Adsorption an die Holzkohle gekommen sein, sodass eine Detektion unmöglich war. Als zweite Möglichkeit ist an Abbau des Hormons zu denken, wie von Ke (Ke, et al., 2007). für *Acinetobacter* Spezies in Kleinkläranlagen beschrieben wurde. *Acinetobacter* Spezies wurden in den Matrices gefunden.

Nach der Fermentation konnte in einigen Ansätzen eine Erhöhung, in anderen Ansätzen eine Verringerung der drei ausgewählten Pharmaka festgestellt werden. Die in 5 Fermentationsansätzen ermittelten Konzentrationen (Tab. 7) wurden reduziert, die Werte aus 4 anderen Ansätzen waren erhöht. Da es sich um Feldproben handelte, liegt die Vermutung nahe, dass in den Proben die Wirkstoffe inhomogen verteilt waren. Die hohen Untersuchungskosten ließen leider nur begrenzte Untersuchungen der Proben je Schlamm vor und nach der Fermentation zu. Die Ergebnisse sollten in weiter führenden Untersuchungen erhärtet werden.

## 4. Interpretation und Diskussion

### 4.5./4.6. Interpretation der Gärsäuren- und Alkoholanalyseergebnisse unter Einbeziehung der pH-Wert Messungen

Diese Ergebnisse waren tatsächlich überraschend. Während im Projektteil 1 nach einigen Wochen Fermentation noch Laktatmengen im Laborversuch im einstelligen Grammbereich nachgewiesen werden konnten, lagen sie bei allen untersuchten Proben unter der Nachweisgrenze von 0,2g/kg. Auch die Acetat-, Butyrat-, Ethanol- und Propionatkonzentrationen lagen im einstelligen Promillebereich bzw. darunter. Eine Hygienisierung auf Grund dieser Konzentrationen erscheint unwahrscheinlich. So wären nach Presser (Presser, et al., 1998) mindestens 4,5 g/l Laktat notwendig um ein Wachstum von *E.coli* bei pH 4,5 zu unterbinden. Bei steigendem pH-Wert ist sogar eine noch höhere Laktatkonzentration notwendig. In keiner der Matrices fiel der pH-Wert unter 4,75. Demnach müsste die durchgeführte erfolgreiche Hygienisierung durch andere Mechanismen erfolgt sein und damit wird unsere Eingangshypothese, die Hygienisierung erfolge durch pH-Wertsenkung, Gärsäuren und Milchsäurebildung im Zuge der Fermentation, zu weiten Teilen widerlegt. Es findet zwar eine pH-Wertsenkung sowie eine Säurebildung statt, jedoch ist sie zu gering, um als wesentliche Ursache für die Hygienisierung in Betracht zu kommen. So sinkt z.B. der pH-Wert in der sterilisierten und mit dem Pathogenmix versehenen Klärschlammatrix auf einen Wert von 5,87 (Abb. 17c.)), der einhergeht mit einem starken Keimabfall. Die resultierende Keimkonzentration liegt jedoch noch weit über der Nachweisgrenze, wohingegen in der lebendigen Matrix (OEM Mix 1) der pH-Wert auf 5,6 fällt und das ausreichend scheint, um alle nicht sporenbildenden Pathogene zu degradieren. Auch reicht in Klärschlammatrix 3 (Abb. 17a.)) bereits ein pH-Wert von rund 6, um innerhalb von 7 Tagen Gram-negative sowie Hefen unter die Nachweisgrenze zu degradieren. Betrachtet man nunmehr die sich einstellende Flora, dominiert von *Lactobacillaceae* und in weit geringerem Maße von Enterokokkenspezies, die allesamt in der Literatur als potenzielle Bakteriozinbildner beschrieben sind, dann liegt der Schluss nahe, dass die Hygienisierung über Bakteriozine erfolgen könnte.

#### 4.7. Interpretation der Felduntersuchungen auf Wachstum und Ertrag von Hafer

Denen in Abbildung 4 dargestellten signifikanten Unterschiede deuten darauf hin, dass die 8 Interpretationen der Felduntersuchungen auf Wachstum und Ertrag von Hafer

Die in Abbildung 4 dargestellten signifikanten Unterschiede in den Ährgewichten deuten darauf hin, dass die Versuchsflächen, deren Terra Preta mit EM, OEM sowie K/OEM hergestellt wurde, einen schlechteren Ertrag verursachten, als die unbehandelten Kontrollflächen. Die Ursachen sind in methodischen Fehlern begründet. Zum einen mussten die Versuchsfelder auf Grund der weiteren landwirtschaftlichen Nutzung durch den Eigentümer verlagert werden (von der ursprünglichen Nord-Süd-achsenförmigen Anordnung umgesetzt zu einer Ost-West-achsenförmigen Anordnung). Das hatte zur Folge, dass nur die Randfelder die tief stehende Morgen- und Abendsonnenstrahlung abbekamen, während die mittleren Felder von den Randfeldern beschattet wurden. Das wird deutlich, wenn man die Standardabweichung der Kontrollfelder betrachtet. So lag diese mit 249,86 deutlich höher als die von OEM mit 91. Die Kontrollfelder waren zum einen randständig jedoch auch mittelständig, die randständigen Felder hatten ein deutlich höheres Ährgewicht als die mittelständigen. Zudem wurde per Hand eingesät anstelle von der Verwendung eines Saatbandes, was eine unregelmäßige Aussaat verursachte und zu einer ungleichen Konkurrenzsituation der Einzelpflanzen führte. Zu allem Überfluss wurden auch 2 Felder (ein Kontrollfeld und einmal OEM) durch Unbekannte entweder aus Versehen oder mutwillig verätzt (siehe Abb. 19.) und 20.)). Weiterhin war die Auswahl der versetzten Kontrollfelder unglücklich gewählt, da der Landwirt dieses landwirtschaftliche Areal einige Jahre zuvor mit Mutterboden restauriert hatte, so dass es sich hier um einen gut gepflegten, leistungsstarken Acker gehandelt hat und somit eine vergleichsweise Verbesserung durch den Zusatz von Terra Preta sich als schwierig erwies. Alle übrigen Versuchsfelder (außer EM, OEM sowie K/OEM) wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollfeldern auf. Bei der Bewirtschaftung der Versuchsfelder fiel auf, dass die Terra Preta – Felder im Vergleich zu den Kontrollen Wasser wesentlich besser aufnahmen als die Kontrollfelder.

#### 4. Interpretation und Diskussion



Abb. 19.) Versuchsfelder mit offensichtlichen Ätزشäden sowie H. Scheinemann beim mechanischen Beseitigen von Wildkräutern um Lichtkonkurrenz zu vermeiden.



Abb. 20.) Versuchsfeld 3 mit Ätزشaden

## 5. Fazit

Die erfolgreichen Degradierungsversuche machen deutlich, dass mit Hilfe des beschriebenen Fermentationsverfahren eine zuverlässige Hygienisierung von Klärschlämmen und Dung (Scheinemann, et al., 2010)) möglich ist. Wie die Untersuchungen mit der sterilen Matrix zeigten, ist die lebende Fäkalflora dafür essentiell. Die Ursachen der Hygienisierung konnten weiter eingegrenzt werden. Entgegen der ursprünglichen Annahme sind Gärsäuren, Laktat und eine Absenkung des pH-Wertes maximal begünstigende Faktoren jedoch nicht allein ursächlich für die Hygienisierung. Um die tatsächliche Ursache zu erfassen, sind Untersuchungen der Matrices auf Bakteriozine notwendig, da die Fermentationsflora von Bakteriozinbildner dominiert war. Das TGGE eignet sich zur Darstellung des Florenwechsels durch die Fermentation in derart komplexen Fäkal-Substrat-Holzkohle-Gemischen. Weiterführende Untersuchungen sind mittels Sequenzierung zur Darstellung der hygienisierenden Leitkeime notwendig.

## 6. 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.
- Aymerich, Teresa, Holo, Helge und Nes, Inolf F. 1996.** Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied an environmental Microbiology*. 1996, 62(5):1676.
- 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.
- Biasucci, Giacomo, Benenati, Belinda und Boehm, Günther. 2008.** Cesarean Delivery May Affect the Early Biodiversity of Intestinal Bacteria. *The Journal of Nutrition*. 2008, J. Nutr. 138: 1796S–1800S,.
- Biometra. 2010.** *Handbuch TGGE Maxi System*. Göttingen : biometra, 2010.
- Brosius, J., et al. 1981.** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 1981, Bd. 148, 107-127.
- 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.
- Callewaer, Raf, et al. 1999.** Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method . *Microbiology*. 1999, 145, 2559–2568.
- 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.

- Delgado, s., et al. 2007.** Subtractive Screening for Probiotic Properties of Lactobacillus Species from the Human Gastrointestinal Tract in the Search for New Probiotics. *Journal of Food Science*. 2007, 72, Issue 8, pages M310–M315, .
- Dillon, V.M. und Board, R.G. 1994.** *Natural antimicrobial systems and foord preservation*. Wallingford UK : Biddles Ltd, Guildford, 1994. ISBN 0851988784.
- Feng, Liua, et al. 2009.** Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*. 2009, Bde. 157,1636–1642.
- Forde, Brian M, Neville, B A und O'Toole, Paul W. 2011.** Genome sequences and comparative genomics of two Lactobacillus ruminis strains from the bovine and human intestinal tracts. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10(Suppl 1):S13.
- 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.
- . **2006.** 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, 2006, doi:10.1098/rstb.2006.1978.
- Glaser, Bruno, et al. 2001.** The 'Terra Prega' phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften*. 88:37-41, 2001, DOI 10.1007/s001140000193.
- 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.
- Golet, E. M., et al. 2003.** Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ. Sci. Technol.* . 2003, Bde. 37, 3243–3249.
- 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.
- Jjemba, P. K. 2002a.** The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere*. 2002a, Bde. 46, 1019–1025.
- Jjemba, P. K. 2002b.** The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Ecosystems and Environment*. 2002b, Bde. 93, 267–278.
- 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.
- Kawai, Yasushi, et al. 1998.** Gassericin A; an Uncommon Cyclic Bacteriocin Produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 Linked at N- and C-Terminal Ends. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998, Vol. 62 No. 12 P 2438-2440 .
- Ke, Jinxia, et al. 2007.** Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated, from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007, 75:1163–1171.
- Klauth, Peter. 2001.** *Quantitative Erfassung von Bakterien und deren spezifische Aktivität in komplexen Habitaten mittels Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildverarbeitung - Dissertation*. Aachen : Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, 2001.
- 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.

- Lozo, Jelena, et al. 2004.** Characterization and Antimicrobial Activity of Bacteriocin 217 Produced by Natural Isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16 . *Journal of food protection*. 2004, 67,2727-2734.
- 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.
- Martínez-Carballo, E., et al. 2007.** Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. *Environ. Pollut.* 2007, Bde. 148, 570–579.
- McClellan, Kristin und Halden, Rolf U. 2010.** Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. 2010., Bde. 2 658–668, 44.
- 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 .
- Muyzer, G., de Waal, E. C. und Uitterlinden, A. G. 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 1993, Bd. 59, 695-700.
- Nölkes, Dagmar. 2008.** *Untersuchungen zu den Ursachen der Graskrankheit unter Anwendung molekularbiologischer Methoden (DGGE)*. Leipzig : Institut für Bakteriologie und Mykologie, 2008.
- Nübel, Ullrich, et al. 1996.** Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1996, Bde. 5636–5643, Vol. 178, No. 19.
- 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 .
- Pourcher, A. -M., et al. 2005.** Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology.* 99, 2005, Bde. 528-539, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02642.x.
- 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.
- Reinard, Thomas. 2010.** *Molekularbiologische Methoden.* Stuttgart : Eugen Ulmer KG, 2010. ISBN 978-3-8252-8449-7 (UTB) ISBN 978-3-8001-2930-0 (Ulmer).
- Rosenfeld, William D. und ZoBell, Claude E. 1947.** Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of bacteriology.* 1947, Bd. 54, 393-398.
- Scheinemann, Hendrik Alexander und Krüger, Monika. 2010.** *Labor- und Felduntersuchung zur Abfall-/Klärschlammverwertung aus dezentralen Abwasserbehandlungen für die Herstellung hochwertiger Schwarzerdeböden (Terra Preta).* Leipzig : Institut für Bakteriologie und Mykologie, 2010.
- 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/ijs.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.
- Tenenbaum, David J. 2009.** Biochar: Carbon Mitigation from the Ground Up. *Environmental Health Perspectives.* 117 A70-A73, 2009, Bd. 2.

- 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.
- Tiquia, S. M., Richard, T. L. und Honeyman, M. S. 2002.** Carbon, nutrient, and mass loss during composting. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 62, 2002, Bde. 15-24.
- 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.
- Van Hofwegen, G., et al. 2009.** Opening the Black Box: Deciphering Carbon and Nutrient Flow in Terra Preta. [Buchverf.] William I. Woods, et al. *Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision*. s.l. : Springer Science, 2009.
- Vandenbergh, Peter A. 1993.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12, Issue 1-3, pages 221–237.
- Walter, R. 2000.** *Umweltvirologie, Viren in Wasser und Boden*. Wien : Springer Verlag, 2000. S. 33-35. ISBN 3-211-83345-5.
- Watanabe, Kazuya, Kodama, Yumiko und Harayama, Shigeaki. 2001.** Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, Bd. 44, 253–262.
- Zhao, L., Dong, Y. H. und Wang, H. 2010.** Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Sci. Total Environ*. 2010, Bde. 408, 1069–1075.
- Zoetendal, Erwin g., Akkermans, Antoon D. L. und De Vos, Willem M. 1998.** Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64(10):3854.