

Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Hygienisierung von Rindergülle und Klärschlämmen mittels milchsaurer Fermentation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
durch die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Universität Potsdam

eingereicht von
Hendrik Alexander Scheinemann
aus Potsdam-Babelsberg

Leipzig, 2014

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Betreuerin: Frau Prof. Dr. Monika Krüger

Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Universität Leipzig
An den Tierkliniken 29 04103 Leipzig

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Elke Dittmann

Lehrstuhl für Mikrobiologie des Instituts für Biologie und Biochemie der
Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Str. 24-25 14476 Golm

Gutachter: Herr Prof. Dr. Konstantin Terytze

Physische Geographie des Instituts für Geographische Wissenschaften, der Freien
Universität Berlin
Malteserstr. 74 - 100 - Haus G 12249 Berlin

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77949](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77949)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77949>

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Widmung.....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	xiii
Abkürzungsverzeichnis.....	xv
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Bedeutung und Definition des Düngers.....	4
2.1.1. Düngerformen im juristischen Kontext.....	4
2.1.2. Historische Entwicklung von Fäkaldüngern.....	6
2.1.3. Heutige Bedeutung von Fäkalien in der Landwirtschaft.....	6
2.2. Krankheitserreger in Fäkalien.....	7
2.2.1. Zoonosen.....	8
2.3. Aktuelle Abfall-Hygienisierungsmethoden.....	12
2.3.1. Kompostierung.....	12
2.3.2. Biogasanlagen.....	13
2.4. Milchsäure Fermentation.....	13
2.4.1. Milchsäure Fermentation in der Lebensmittelkonservierung.....	14
2.4.2. Milchsäure Fermentation in der Silageherstellung.....	14
2.4.3. Milchsäure Fermentation in der Abfallverwertung.....	15
2.5. Bodenparameter.....	16
2.5.1. Bodenhorizonte.....	16
2.5.2. Humus.....	17
2.5.3. Schwarzerde.....	17
2.6. Zusammenfassung und Einordnung in ein nachhaltiges Ackerbodenkonzept.....	22

2.7.	Zielstellung	23
3.	Material und Methoden	24
3.1.	Matrixzusammensetzung	24
3.1.1.	Einzelkomponenten	25
3.2.	Mikrobiologische Methodik	26
3.2.1.	Kulturelle mikrobiologische Methoden	26
3.2.2.	Inter- und Intraassayvarianzen der Lebendkeimzahlbestimmung.....	27
3.2.3.	Gattungs-/ Artbestimmung mittels MALDI-TOF-MS	27
3.2.4.	Mikroorganismen-Populationsanalyse mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE).....	27
3.2.5.	Polymerase-Kettenreaktion PCR.....	28
3.2.6.	Untersuchungen zum Absterbeverhalten ausgesuchter pathogener Bakterien ..	30
3.2.7.	Untersuchung zur Tenazität von ECBO-Viren	31
3.2.8.	Untersuchung zur Tenazität von <i>Ascaris suum</i> -Eiern	31
3.2.9.	Untersuchung zur Ursache des Absterbeverhaltens bakterieller Erreger.....	32
3.3.	Untersuchungen zum Hygienisierungsprinzip für bakterielle Krankheitserreger	32
3.3.1.	Gärsäuren- und Laktatbestimmung	32
3.3.2.	pH-Wert-Messung (407)	32
3.3.3.	Eliminierungs- und Substitutionsexperimente der Matrixzusammensetzung....	33
3.3.4.	Bioassay zum Nachweis der bakteriziden Effekte der Milch- und flüchtigen Fettsäuren.....	33
3.4.	Messung der Gewichtsveränderungen während der Fermentation.....	33
3.5.	Statistische Analysen	34
3.6.	Fehlerfortpflanzung	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Inter- und Intraassay-Varianzen der Lebendkeimzahlbestimmung.....	35
4.2.	Populationsanalysen im Verlauf der Fermentation	35
4.2.1.	Quantitative Bakteriologische Untersuchungen.....	35

4.2.2.	Klärschlammtrizes S	37
4.2.3.	Qualitative bakteriologische Untersuchung	39
4.3.	Hygienisierung von pathogenen Bakterien in den verschiedenen Matrizes.....	41
4.3.1.	Hygienisierung von pathogenen Bakterien in den Rindergülle-Matrizes KEM und K(EM)_a	41
4.3.2.	Hygienisierung von pathogenen Bakterien in Klärschlammtrizes	45
4.4.	pH-Wert Messungen.....	46
4.5.	Gärsäuren- und Laktatbestimmungen.....	47
4.6.	Bioassay zum bakteriziden Effekt der Milch- und flüchtigen Fettsäuren (VFA).....	48
4.7.	Untersuchungen zum Masseverlust während der Fermentation.....	49
4.8.	Eliminierungs- und Substitutionsexperimente der Matrixzusammensetzung	49
4.8.1.	Quantitative bakterielle Untersuchungen	49
4.8.2.	Qualitative bakterielle Untersuchung.....	51
4.9.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	52
4.9.1.	Erstellung eines Standardbandenmuster für die TGGE	52
4.9.2.	TGGE-Bandenmuster der unterschiedlichen Klärschlämme	53
4.9.3.	Vergleich der Bandenmuster von Matrix S_{Pool}	54
4.9.4.	Sequenzierung ausgewählter Banden.....	55
5.	Diskussion.....	57
5.1.	Material- und Methodendiskussion	58
5.1.1.	Matrixzusammensetzung.....	58
5.1.2.	Lebendkeimzahlbestimmung (Plattenzählverfahren).....	59
5.1.3.	Inter- und Intraassay-Varianzen der Kulturverfahren	59
5.2.	Populationsanalysen im Verlauf der Fermentation	59
5.2.1.	Quantitative bakteriologische Untersuchungen	59
5.2.2.	Qualitative bakteriologische Untersuchungen	66
5.2.3.	Hygienisierung von pathogenen MO in Rindergülle Matrizes	80
5.2.4.	Hygienisierung von bakteriellen Erregern in der Klärschlamm-Matrix	85

5.3.	pH-Wert-Messungen	86
5.4.	Gärsäuren und Laktatbestimmungen	86
5.5.	Bioassay zum bakteriziden Effekt der Milchsäure und flüchtiger Fettsäuren (VFA)	88
5.6.	Untersuchungen zum Masseverlust während der Fermentation	89
5.7.	Zur Einordnung in ein nachhaltiges Ackerbodenkonzept	89
5.8.	Eliminierungs- und Substitutionsexperimente der Matrixzusammensetzung	90
5.8.1.	Quantitative bakterielle Untersuchung	90
5.8.2.	Qualitative bakterielle Untersuchung	92
5.9.	Molekularbiologische Untersuchungen	92
5.9.1.	Erstellung eines Standards für die TGGE	92
5.9.2.	TGGE-Bandenmuster (Fingerprints) der unterschiedlichen Klärschlämme	93
5.9.3.	Detailvergleich der Bandenmuster von Matrix S_{Pool}	95
5.9.4.	Sequenzierung ausgewählter Banden	97
5.9.5.	Alternative molekularbiologische Methoden	99
6.	Fazit	100
6.1.	Zukünftige Forschung und Verbesserungen des Verfahrens	100
7.	Danksagung	101
8.	Anhang	103
8.1.	Matrizes	103
8.1.	Molekularbiologie: Protokolle, Puffer, Lösungen - Anhang	105
8.2.	Konzentrationen pathogener Animpfkulturen – Anhang	108
8.3.	Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren (VFAs) – Anhang	109
8.4.	Nährböden - Anhang	110
8.5.	Quantitative Daten, Matrix S - Anhang	116
8.6.	Qualitative Daten	124
8.6.1.	Qualitative Daten Matrix K - Anhang	124
	Charakterisierung der Klärschlämme	126
8.6.2.	Qualitative Daten Matrix S - Anhang	127

Bewertung der einzelnen Spezies aus Matrix K.....	134
Bewertung der einzelnen Spezies aus Matrix S	136
8.6.3. Qualitative Daten Matrizes S_{Pool} ; $S_{Pool-Wk}$; $S_{Pool-Wk+Sp}$ - Anhang.....	142
TGGE-Dendrogramme – Anhang	147
8.7. TGGE-Bandenmuster Isolation von Einzelbanden	152
8.8. Sequenzen - Anhang.....	152
8.9. Fotografien – Anhang.....	155
Literaturverzeichnis.....	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: angestrebte Unterbrechung des Infektionskreislaufes bei gleichzeitigem Schluss des Stoffkreislaufes, * = milchsäure Fermentation Zeichnung: Scheinemann / Winter.....	12
Abbildung 2: traditionelle Sauerkrautherstellung Foto: William H. DuBay (242).....	14
Abbildung 3: Grassilage im Fahrsilo Foto: Werner Willmann (214)	15
Abbildung 4: Tropisches Oxisol Foto: Bruno Glaser.....	20
Abbildung 5: Terra preta Foto: Bruno Glaser (136)	20
Abbildung 6: Skizze des experimentellen Designs, Balken proportional zur Zusammensetzung (m/m).....	24
Abbildung 7: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologische Parameter der Matrix K von 21 Tagen (GKZ: Gesamtkeimzahl).....	36
Abbildung 8: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Matrix KEM, im Verlauf von 56 Tagen (GKZ: Gesamtkeimzahl).....	37
Abbildung 9: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Matrix $K(EM)_a$, im Verlauf von 56 Tagen (GKZ: Gesamtkeimzahl).....	37
Abbildung 10: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter aller 10 Klärschlämme (Matrix S), im Verlauf von 7 Tagen. ** = $p < 0,01$, $n_{0d} = 40$, $n_{3d} = 36$, $n_{7d} = 36$, (Wilcoxon-Test). SSR = sporenbildende Sulfitreduzierer; GKZ: Gesamtkeimzahl.....	39
Abbildung 11: Blutagarplatte, aerobe Gesamtkeimzahl, Matrix K vor Fermentation.....	40
Abbildung 12: Blutagarplatte, aerobe Gesamtkeimzahl, Matrix K nach 3 Wochen Fermentation.....	40
Abbildung 13: Tenazität von pathogenen Bakterien in den Matrizes $K(EM)_a$ im Verlauf von 3 Tagen.....	43
Abbildung 14: Tenazität von <i>Salmonella</i> Senftenberg in den Matrizes $K(EM)_a$ im Verlauf von 3 Tagen.....	43
Abbildung 15: Tenazität von <i>Mycobacterium fortuitum</i> in den Matrix K im Verlauf von 7 Tagen.....	43
Abbildung 16: Tenazität von pathogenen Bakterien in den Matrizes KEM und $(KEM)_a$ im Verlauf von 3 Tagen.....	44
Abbildung 17: Tenazität von ECBO-Viren in den Matrizes KEM und $K(EM)_a$ im Verlauf von 14 Tagen.....	45
Abbildung 18: Tenazität von <i>Ascaris suum</i> Eiern in den Matrizes KEM und $K(EM)_a$ und Wasser im Verlauf von 56 Tagen.....	45

Abbildung 19: Tenazität von pathogenen Bakterien in den Matrizes S_{Pool} und $(S_{Pool})_a$ im Verlauf von 3 Tagen.....	46
Abbildung 20: Änderung der pH-Werte der Matrizes KEM und $(KEM)_a$ an Tag 0, 21 und 56	47
Abbildung 21: Änderung der pH-Werte der Matrizes KEM , $K(EM)_a$, $(KEM)_a$ und $(K(EM)_a)_a$ an Tag 0 und 3	47
Abbildung 22: pH-Wert, Matrix S an Tag 0 und 7 $p < 0.01$, $n_{0d}=40$, $n_{7d}=36$, (Wilcoxon-Test).....	47
Abbildung 23: Mittlere Konzentration von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit der Supplemente zu Beginn (t_0) und nach 3-tägiger Inkubation (t_1)	49
Abbildung 24: Mittlere Konzentration von <i>S. aureus</i> in Abhängigkeit der Supplemente zu Beginn (t_0) und nach 3-tägiger Inkubation (t_1)	49
Abbildung 25: Quantitative Auswertung bakteriologischer Parameter im Substitutions-experiment zum Tag 0.....	51
Abbildung 26: Quantitative Auswertung bakteriologischer Parameter im Substitutionsexperiment zum Tag 3.....	51
Abbildung 27: Quantitative Auswertung bakteriologischer Parameter im Substitutionsexperiment zum Tag 7.....	51
Abbildung 28: Standard-Banden im Agarosegel, Überprüfung des PCR-Produktes der 16S-rDNS für verschiedene Markerstämme.....	53
Abbildung 29: Standard-Banden der 16S-rDNS im TGGE-Acrylamid-Gel,	53
Abbildung 30: Repräsentative TGGE-Bandenmuster vor der Fermentation der Matrix S auf Basis verschiedener Klärschlämme aus 10 verschiedenen Kleinkläranlagen (KS 1 – 10), Anordnung nach Ähnlichkeit der 16S-rDNS	54
Abbildung 31: Repräsentative TGGE-Bandenmuster nach der Fermentation der Matrix S auf Basis verschiedener Klärschlämme aus 10 verschiedenen Kleinkläranlagen (KS 1 – 10), Anordnung nach Ähnlichkeit der 16S-rDNS	54
Abbildung 32: TGGE-Bandenmuster der 16S-rDNS vor und nach Fermentation von Matrix S_{Pool}	55
Abbildung 33: Schematische Übersicht der Florentwicklung.....	70
Abbildung 34: Zusammensetzung des Gesteinsmehls.....	104
Abbildung 35: Datenblatt CATC-Agar.....	110
Abbildung 36: Datenblatt Columbia Agar	111
Abbildung 37: Datenblatt DRCM Bouillon	112

Abbildung 38: Datenblatt M.R.S. Agar	113
Abbildung 39: Datenblatt Sabouraud Agar	114
Abbildung 40: Datenblatt Gassner Agar	115
Abbildung 41: Mediane der aeroben Gesamtkeimzahl der verschiedenen Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	116
Abbildung 42: Mediane der anaeroben Gesamtkeimzahl der verschiedenen Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	117
Abbildung 43: Mediane der Gram-negativen Gesamtkeimzahl der verschiedenen Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	118
Abbildung 44: Mediane der Konzentration der Enterokokken verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	119
Abbildung 45: Mediane der Konzentration der <i>Lactobacillaceae</i> verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	120
Abbildung 46: Mediane der Konzentration der Clostridien verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	121
Abbildung 47: Mediane der Konzentration der Hefe- und Schimmelpilze verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation	122
Abbildung 48: Mediane der Konzentration der sporenbildenden Sulfitreduzierer verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation...	123
Abbildung 49: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter von einer Klärschlammatrix (ähnlich Matrix S, jedoch kam der Schlamm aus einer technisch sehr unterschiedlichen Kleinkläranlage) im Verlauf von 21 Tagen Fermentation	124
Abbildung 50: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 1	147
Abbildung 51: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 2	147
Abbildung 52: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 3	147
Abbildung 53: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 4	147
Abbildung 54: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 5	148
Abbildung 55: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 6	148

Abbildung 56: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 7	148
Abbildung 57: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 8	148
Abbildung 58: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 9	148
Abbildung 59: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 10	149
Abbildung 60: TGGE-Bandenmuster aller Klärschlammtrizes (S) vor der Fermentation	149
Abbildung 61: TGGE-Bandenmuster aller Klärschlammtrizes (S) nach der Fermentation	150
Abbildung 62: TGGE-Bandenmuster aller Klärschlammtrizes (S) zu beiden Zeitpunkten	151
Abbildung 63: TGGE-Bandenmuster einiger unbehandelter Klärschlämme	152
Abbildung 64: TGGE-Bandenmuster nach Isolation von Einzelbanden	152
Abbildung 65: Sequenzvergleich der Banden K 2 und K 7 (erstellt mit BLAST(507)).....	154
Abbildung 66: Springschwänze, Milben, Ameisen u.v.m. (1:25) auf der fermentierten Matrix K während des Vererdungsprozesses.....	155
Abbildung 67: Versuchsbeet ohne Holzkohle nach Ernte	156
Abbildung 68: Versuchsbeet mit Holzkohle nach Ernte.....	156

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen der genutzten Matrizes.....	xvii
Tabelle 2: aerobe Keimspektren von Matrix K vor und nach Fermentation.....	40
Tabelle 3: Mittlere Konzentrationen (Standardabweichungen) der Milch- und Gär- säureanalytik in Matrix SPool zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	48
Tabelle 4: Sequenzierungsergebnisse der TGGE-Banden, (BLAST325, 507).....	56
Tabelle 5: Datenbankeinträge mit gleichen oder sehr ähnlichen Sequenzen des Universalprimerpaares	98
Tabelle 6: Inhaltsangaben der genutzten Matrizes 1 bis 11.....	103
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die PCR.....	105
Tabelle 8: PCR-Protokoll (153, 342)	106
Tabelle 9: Zusammensetzung der Stopplösung.....	106
Tabelle 10: Zusammensetzung der 10-fach konzentrierten Stammlösung, TBE-Puffer.....	106
Tabelle 11: Silberfärbeprotokoll (54), <i>modifiziert</i> nach (407)	107
Tabelle 12: Gelzusammensetzung (54) <i>modifiziert</i> nach (407).....	108
Tabelle 13: Stämme und Animpfkonzentrationen für 3.2.6	108
Tabelle 14: Milchsäure- und Gärsäurenkonzentrationen.....	109
Tabelle 15: Umrechnung von Tabelle 3 in mmol, Mittelwerte der Milch- und Gärsäureanalytik in Matrix 7 im Verlauf der Zeit.....	109
Tabelle 16: Mykobakterien-Agar (pro I)	116
Tabelle 17: Mikroflora von Matrix K , vor und nach dreiwöchiger Fermentation	125
Tabelle 18: Charakterisierung der Klärschlämme nach Einleiten.....	126
Tabelle 19: Mikroflorenveränderung der verschiedenen Klärschlämme der Matrix S , zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten	127
Tabelle 20: Liste der Gram-negativen Mikroorganismen aus Matrix K , deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. grün: positiver Effekt blau: neutraler Effekt rot: negativer Effekt.....	134
Tabelle 21: Liste der Gram-positiven sporenbildenden Mikroorganismen aus Matrix K , deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.	134
Tabelle 22: Liste der Gram-positiven Mikroorganismen aus Matrix K , deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.....	135

Tabelle 23: Liste der Gram-negativen Mikroorganismen aus Matrix S , deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.	136
Tabelle 24: Liste der Gram-positiven Mikroorganismen aus Matrix S , deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.	138
Tabelle 25: Liste der Gram-positiven sporenbildenden Mikroorganismen aus Matrix S , deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.	140
Tabelle 26: Mikroflorenveränderung der Matrizes S_{Pool} , S_{Pool-Wk} und S_{Pool-Wk+Sp} zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten	142

Abkürzungsverzeichnis

aaGKZ	Anaerobe Gesamtkeimzahl
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aq _{dest}	destilliertes Wasser
BnF	Banden nach Fermentation
BoNT	Botulinumneurotoxin
BvF	Banden vor Fermentation
C	Kohlenstoff
CBA	Columbia-Blut-Agar
CPE	zytopathischer Effekt
[r]DNS	[ribosomale] Desoxyribonukleinsäure
DRCM	Differential Reinforced Clostridia Medium
EAHEC	Enteroadhärenter hämorrhagischer <i>E. coli</i>
EDTA	EthylenDinitriloTetraAcetat
EM	Effektive Mikroorganismen
GKZ	Gesamtkeimzahl
Gram-neg GKZ	Gram-negative Gesamtkeimzahl
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
K	Kalium
KbE/g	Koloniebildende Einheit(en)/pro Gramm
KS	Klärschlamm
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator
MPN	höchstwahrscheinliche Keimzahl
MO	Mikroorganismus bzw. Mikroorganismen
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Stickstoff
NB	Nährboden

NB1	Standard Nährbouillon 1
P	Phosphor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pot.	potentiell
RNS	Ribonukleinsäure
Tb	Tuberkulose
SSR	Sporenbildende Sulfitreduzierer
Stabw	Standardabweichung
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
TOM	Totes organisches Material
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
VFA(s)	Volatile Fettsäure(n)
v. Chr.	vor Christus

Tabelle 1: Abkürzungen der genutzten Matrizes

Nr.	Kürzel	Kurzbeschreibung
1	K	Ausgangsmatrix auf Rindergüllebasis
2	S	Ausgangsmatrix auf Klärschlammbasis
3	KEM	Rindergüllematrix mit zusätzlichen <i>Lactobacillaceae</i> (EM)
4	K(EM)_a	Kontrolle zu Matrix KEM , EM autoklaviert, um den Einfluss der zusätzlichen <i>Lactobacillaceae</i> zu testen.
5	(KEM)_a	Kontrolle zu Matrix KEM , komplett autoklaviert, um den Einfluss der Gesamtflorea zu testen.
6	(K(EM)_a)_a	Kontrolle zu Matrix K(EM)_a und (K(EM)_a)_a , um den Einfluss der Gesamtflorea und des Autoklavierens zu testen.
7	S_{Pool}	Gepoolte Probe aus Matrix S , um die Probenzahl zu reduzieren.
8	(S_{Pool})_a	Vergleichsmatrix zu Matrix S_{Pool} , um den Einfluss der Gesamtflorea zu testen.
9	S_{Pool}-Wk	Ausgangsmatrix S_{Pool} , auf Klärschlammbasis ohne Weizenkleie zum Test deren Einflusses.
10	S_{Pool}-Wk+Sp	Ausgangsmatrix S_{Pool} , Weizenkleie wurde mit Sägespänen substituiert (v/v), um eine vergleichbare Trockensubstanz zu erhalten.
11	Fä+Wk	Substitution aller Zusätze durch Weizenkleie

1. Zusammenfassung

Tierische und menschliche Fäkalien aus Landwirtschaft und Haushalten enthalten zahlreiche obligat und opportunistisch pathogene Mikroorganismen, deren Konzentration u. a. je nach Gesundheitszustand der betrachteten Gruppe schwankt. Neben den Krankheitserregern enthalten Fäkalien aber auch essentielle Pflanzennährstoffe (276) und dienen seit Jahrtausenden (63) als Dünger für Feldfrüchte. Mit der unbedarften Verwendung von pathogenbelastetem Fäkaldünger steigt jedoch auch das Risiko einer Infektion von Mensch und Tier. Diese Gefahr erhöht sich mit der globalen Vernetzung der Landwirtschaft, z. B. durch den Import von kontaminierten Futter- bzw. Lebensmitteln (29).

Die vorliegende Arbeit stellt die milchsäure Fermentation von Rindergülle und Klärschlamm als alternative Hygienisierungsmethode gegenüber der Pasteurisation in Biogasanlagen bzw. gebräuchlichen Kompostierung vor.

Dabei wird ein Abfall der Gram-negativen Bakterienflora sowie der Enterokokken, Schimmel- und Hefepilze unter die Nachweisgrenze von $3 \log_{10} \text{KbE/g}$ beobachtet, gleichzeitig steigt die Konzentration der *Lactobacillaceae* um das Tausendfache. Darüber hinaus wird gezeigt, dass pathogene Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, EHEC O:157 und vegetative *Clostridium perfringens*-Zellen innerhalb von 3 Tagen inaktiviert werden. Die Inaktivierung von ECBO-Viren und Spulwurmeiern erfolgt innerhalb von 7 bzw. 56 Tagen. Zur Aufklärung der Ursache der beobachteten Hygienisierung wurde das fermentierte Material auf flüchtige Fettsäuren sowie pH-Wertänderungen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die gemessenen Werte nicht die alleinige Ursache für das Absterben der Erreger sind, vielmehr wird eine zusätzliche bakterizide Wirkung durch eine mutmaßliche Bildung von Bakteriozinen in Betracht gezogen. Die parasitizide Wirkung wird auf die physikalischen Bedingungen der Fermentation zurückgeführt.

Die methodischen Grundlagen basieren auf Analysen mittels zahlreicher klassisch-kultureller Verfahren, wie z. B. der Lebendkeimzahlbestimmung. Darüber hinaus findet die MALDI-TOF-Massenspektrometrie und die klassische PCR in Kombination mit der Gradienten-Gelelektrophorese Anwendung, um kultivierbare Bakterienfloren zu beschreiben bzw. nicht kultivierbare Bakterienfloren stichprobenartig zu erfassen.

Neben den Aspekten der Hygienisierung wird zudem die Eignung der Methode für die landwirtschaftliche Nutzung berücksichtigt. Dies findet sich insbesondere in der Komposition

des zu fermentierenden Materials wieder, welches für die verstärkte Humusakkumulation im Ackerboden optimiert wurde. Darüber hinaus wird die Masseverlustbilanz während der milchsäuren Fermentation mit denen der Kompostierung sowie der Verarbeitung in der Biogasanlage verglichen und als positiv bewertet, da sie mit insgesamt 2,45 % sehr deutlich unter den bisherigen Alternativen liegt (73, 138, 458). Weniger Verluste an organischem Material während der Hygienisierung führen zu einer größeren verwendbaren Düngermenge, die auf Grund ihres organischen Ursprungs zu einer Verstärkung des Humusanteiles im Ackerboden beitragen kann (56, 132).

2. Einleitung

Neben der Einführung zur Thematik gilt es in diesem Kapitel den derzeitigen Stand der Wissenschaft und Technik darzustellen. Zwei Anliegen, wovon letzteres auf einem wissenschaftlichen Feld, was in dieser Form noch nicht beschrieben ist, sehr kurz ausfällt. So lässt sich trotz intensiver Recherche die Grundidee der Hygienisierung von Fäkalien mittels milchsaurer Fermentation in der verfügbaren deutsch- und englischsprachigen Literatur nicht finden. Eine fast 40 Jahre alte Arbeit von Hrubant (234) beschreibt die Fermentation von Futtermittelresten, welche auf den Stallboden gefallen und fäkal kontaminiert worden sind, mit der Intention, diese wiederzuverwenden. Eine aktuellere Arbeit von 2009 beschreibt allein die praktische Nichtexistenz alternativer Hygienisierungsmethoden nebst der Kompostierung und Verarbeitung in Biogasanlagen (308). Demzufolge bleiben lediglich der Vergleich mit ähnlichen Fermentationen, z. B. in der Lebensmittel- und Futtermittelkonservierung, sowie die Abgrenzung zu den gängigen Hygienisierungsmethoden. Darüber hinaus werden die Zusammenhänge von Landwirtschaft und anthropogen beeinflusster Boden- bzw. Humusbildung herausgestellt, damit eine Einordnung der hier vorgestellten Abfallbehandlung in ein nachhaltiges Ackerbodenkonzept erfolgen kann.

2.1. Bedeutung und Definition des Düngers

Pflanzen benötigen neben Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O) und Wasserstoff (H) auch Stickstoff (N), Phosphor (P), Kalium (K), Schwefel (S), Calcium (Ca) und Magnesium (Mg) zum Wachstum. Diese Elemente stellen deren Hauptnährelemente (157) bzw. Makroelemente (57) dar. Durch die Ernte von Feldfrüchten sowie Auswaschung durch Niederschläge, Erosion etc. kommt es zu einer Reduktion dieser Elemente in Ackerböden. N, P und K sind die Basis des nach ihnen bezeichneten mineralischen NPK-Düngers. Sie sind düngewirtschaftlich von besonderer Bedeutung, da diese Elemente im Gegensatz zu C, H und O (CO_2 und H_2O) nicht in verwendbarer Form (NH_4^+ NO_3^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , K^+) im Überschuss vorhanden sind, jedoch in relativ hohen Mengen von Pflanzen benötigt werden (414). N, P und K werden daher auch als Kernnährelemente bezeichnet (157). Das Fehlen eines einzelnen Hauptnähr- oder Spurenelementes kann bei Mangel einen limitierenden Einfluss auf das Wachstum der Feldfrüchte haben (Minimumgesetz) (3), jedoch würde ein Eingehen auf all diese Elemente den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Wichtig ist eine ausgewogene Verfügbarkeit. So betont Blume (57), dass auch für die Gesundheit des Konsumenten eine adäquate Versorgung der Pflanzen essentiell sei. Es erscheint naheliegend, dass eine verbesserte Kreislaufwirtschaft der Elemente N, P, K mittels Wirtschaftsdünger gleichzeitig ein verbessertes Recycling aller weiteren Nähr- und Spurenelemente mit sich bringen könnte, da auch diese in den Fäkalien enthalten sind. Die enorme Bedeutung der Düngung und des Humus für die Bodenfruchtbarkeit wird auch durch den Gesetzgeber im Düngegesetz vom 9.1.2009 hervorgehoben. Dort heißt es im §1 Abs. 2, Zweck des Gesetzes sei u. a.: „[...]die Ernährung von Nutzpflanzen sicherzustellen, die Fruchtbarkeit des Bodens, insbesondere den standort- und nutzungstypischen Humusgehalt, zu erhalten oder nachhaltig zu verbessern, [...]“ Gleichzeitig finden auch potentielle Gefahren in Abs. 3 Berücksichtigung, die mit der Verwendung von Dünger einhergehen können. „[...] Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sowie für den Naturhaushalt vorzubeugen oder abzuwenden, die durch das Herstellen, Inverkehrbringen oder die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Pflanzenhilfsmitteln sowie Kultursubstraten oder durch andere Maßnahmen des Düngens entstehen können, [...]“ (8)

2.1.1. Düngerformen im juristischen Kontext

Im organischen Dünger liegen die Pflanzen-Nährelemente in leicht verfügbarer Form, aber auch in erheblichen Mengen in schwer verfügbarer Form vor, im Gegensatz zum Mineraldünger, wo die Nährelemente in anorganischer Form zumeist mineralisch, gut

wasserlöslich und somit leicht verfügbar vorliegen (56). Die Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 definiert „organisches Düngemittel“ und „Bodenverbesserungsmittel“ in Art. 3 Abs. 22 wie folgt: „Materialien tierischen Ursprungs, die einzeln oder gemeinsam zur Erhaltung bzw. zur Verbesserung der Pflanzenernährung und der physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie der biologischen Aktivität des Bodens verwendet werden; [...]“ (9). Im Düngegesetz wird der Begriff „Wirtschaftsdünger“ definiert, der die Begriffe „organisches Düngemittel“ und „Bodenverbesserungsmittel“ einschließt und um „[...] pflanzliche Stoffe im Rahmen der pflanzlichen Erzeugung oder in der Landwirtschaft [...]“ erweitert wird. Ausnahme hierbei bildet im rechtlichen Sinne der Harnstoff, der auch zu den Mineraldüngern gezählt wird, wengleich er chemisch eine organische Substanz ist. Die Verordnung (EG) Nr. 2003/2003 definiert in Art. 2 Abs. e) „mineralisches Düngemittel“ als „[...] ein Düngemittel, in welchem die deklarierten Nährstoffe in Form von Mineralien enthalten sind, die durch Extraktion oder industrielle physikalische und/oder chemische Verfahren gewonnen werden. Kalkstickstoff, Harnstoff und seine Kondensate und Anlagerungsverbindungen sowie Düngemittel, die chelatisierte oder komplexierte Spurennährstoffe enthalten, können konventionellerweise als mineralische Düngemittel eingeordnet werden; [...]“ (6). Da das organische Material aus organischen Düngern mitunter erst durch chemisch-, biologische Zersetzungsprozesse aufgespalten werden muss, bevor Verbindungen entstehen, die für die Pflanze nutzbar sind, gilt diese Düngung im Vergleich zur mineralischen Düngung zumeist in Handhabung und Dosierung als schwieriger. Auf Grund der hohen Verfügbarkeit als Beiprodukt der Tierproduktion wird organischer Dünger häufig in Form von Wirtschaftsdünger verwendet (56). Neben den genannten Vor- und Nachteilen führt der erhöhte Eintrag von organischem Material in den Boden zu einem höheren Humusgehalt sowie einer erhöhten biologischen Aktivität (56). Als organischer Dünger wurden und werden vielfältigste Substanzen genutzt. Neben den mitunter seit Jahrtausenden verwendeten Düngemitteln wie Seetang, Mist (96), Guano (480), Pflanzenreste, Heide- und Waldstreu (43) werden heute auch weitere Düngemittel aus der Tierproduktion wie z. B. Knochen- (166), Horn-, Feder- und Haarmehl (21) eingesetzt. Potentieller organischer Dünger fällt naturgemäß in hohen Mengen als Fäkalien an, daher lag und liegt deren Nutzung am nächsten.

Die Verwendung von Klärschlamm als Dünger wird in der Richtlinie 86/278 EWG des Europäischen Rates geregelt und in der deutschen Klärschlammverordnung §3 konkretisiert. So ist nach vorheriger Prüfung des Klärschlammes sowie der für die Ausbringung gedachten Flächen eine Nutzung als Dünger unter Auflagen möglich (4).

Bodenhilfsstoffe sind nach §2 des Düngegesetzes „[...] Stoffe ohne wesentlichen Nährstoffgehalt sowie Mikroorganismen, die dazu bestimmt sind, die biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Bodens zu beeinflussen, um die Wachstumsbedingungen für Nutzpflanzen zu verbessern [...] (8).

2.1.2. Historische Entwicklung von Fäkaldüngern

Lange wurde davon ausgegangen, dass erst seit der Bronzezeit (2000 – 800 v. Chr.) auch in der gemäßigten Klimazone Europas eine aktive Viehdüngewirtschaft stattfand (96). Sie wurde ca. 700 v. Chr. im Mittelmeerraum erstmals schriftlich erwähnt (231). Lediglich in der mediterranen, minoischen Kultur soll die Düngewirtschaft bereits seit der Kupfersteinzeit (5500 – 2200 v. Chr.) angewendet worden sein. Seit Mitte 2013 jedoch geht man von einer deutlich älteren Geschichte des Düngers in Europa aus. Bogaard (63) konnte nachweisen, dass bereits 5500 – 5000 v. Chr. im heutigen Deutschland eine aktive Düngewirtschaft bestand. Die Ausbringung von Fäkalien zur Erhaltung einer dauerhaften Bodenfruchtbarkeit gilt als Schlüsseltechnologie im Übergang vom Wanderbauerntum zur permanenten Sesshaftigkeit (311). Die wachsende Bedeutung von Nutztieren in der Jungsteinzeit bezeichnet Sherratt (421) als „Revolution der Sekundärprodukte“. Dabei stand im Gegensatz zum Jäger und Sammler nicht allein die Fleisch-, Fell- und Knochengewinnung im Vordergrund, sondern vor allem die Nutzung tierischer Produkte ohne die Tiere zu töten. Dazu zählten Produkte wie Wolle und Milch sowie nicht zuletzt die Transport- und Zuggleistungen, die den Handel über weite Strecken sowie die Pflugwirtschaft ermöglichten. Wenn auch nicht ausdrücklich bei Sherratt erwähnt, scheint die Düngung der Felder mit dem Mist der frühen Viehherden für Denevan als wahrscheinlich (117).

2.1.3. Heutige Bedeutung von Fäkalien in der Landwirtschaft

Mit 60 % der erzielten Verkaufserlöse in der deutschen Landwirtschaft misst Schultheiß der Tierhaltung eine große volkswirtschaftliche Bedeutung zu (417). Derzeit werden in Deutschland über 150 Mio. t Wirtschaftsdünger pro Jahr produziert (417) und damit z. B. 63 % des deutschen Stickstoffverbrauchs abgedeckt (411). Im Gegensatz zum Stickstoff, der mit dem Haber-Bosch-Verfahren mit relativ hohem Energieaufwand produziert werden kann, ist Phosphatdünger nicht synthetisierbar und wird ähnlich wie Kalium mit Hilfe der montanen Industrie gefördert. Insbesondere bei der Phosphorgewinnung scheinen schwermetallarme Standorte weitestgehend erschöpft, sodass mitunter sogar uranhaltiger Phosphordünger verwendet wird, wodurch sowohl Böden als auch Äcker kontaminiert werden (416). In Tierfäkalien hingegen ist die Schwermetallbelastung geringer, da EU-weite Grenzwerte für

die Futtermittel bestehen (273). Neben der leichten Verfügbarkeit und der limitierten Schwermetallbelastung spricht gerade die hohe Konzentration von Pflanzennährstoffen für eine Verwendung von Fäkalien als Düngemittel. So enthält z. B. eine Tonne Rindermist mit 25 % Trockensubstanz neben 5 kg Stickstoff 4,3 kg P_2O_5 , 6,9 kg K_2O und 2,0 kg MgO (276). Auch Klärschlamm besitzt hohe Konzentrationen an Pflanzennährstoffen, so liegen Durchschnittswerte bei 4,5 kg Stickstoff, 6,5 kg P_2O_5 , 0,8 kg K_2O und 2,0 kg MgO pro Tonne (276). 2006 wurden jedoch lediglich ~ 30 % der häuslichen und kommunalen Klärschlämme in Landwirtschaft und Landschaftsbau eingesetzt. Der Großteil hingegen wird zumeist verbrannt bzw. auf Deponien gelagert (80). Maßgebliche Ursachen hierfür sind einerseits erhöhte Schwermetallkonzentrationen in städtischen Abwässern, die durch die Einleitung von Industrie- bzw. Gewerbeabwässern sowie Regenwasser mit Belastungen durch Straßenverkehr, Metalldächer und Regenrinnen zu denen der Haushalte hinzukommen (437). Andererseits belasten auch organische Substanzen, wie z. B. biologisch nicht abbaubare Medikamente (199), die Abwässer. Dietrich forderte bereits 2002 ein Umweltverträglichkeitsgutachten im Rahmen der Zulassung von Medikamenten (127). Mit zunehmendem Bewusstsein dieser Belastungen kann die Qualität von Klärschlämmen und damit ihre potentielle Einsetzbarkeit als Dünger erhöht werden, sodass nicht 70 % der nährstoffreichen Schlämme ungenutzt bleiben müssen. Eine positive Tendenz ist bereits in der Schwermetallvermeidung zu erkennen (81).

2.2. Krankheitserreger in Fäkalien

Neben negativen Effekten für Umwelt und Konsumenten durch Schwermetalle, Medikamente und weitere toxische Verbindungen besitzen Fäkalien sehr hohe Keimgehalte. Auch Ackerböden können damit nachhaltig in ihrer Mikroökologie beeinflusst werden (182). Neben medizinisch unbedeutenden Keimen enthalten Fäkalien fakultative bzw. obligate Krankheitserreger (Bakterien, Pilze, Protozoen, Viren, Würmer) in unterschiedlichen Konzentrationen, je nach epidemiologischer Situation bei den Ausscheidern. Mit der unkritischen Verwendung von Fäkalien als Dünger steigt die Gefahr der Anreicherung der pathogenen (Mikro-)Organismen in den Böden. Dort können sie mitunter Monate (181, 246) oder Jahre (454) verweilen und Futter- sowie Nahrungspflanzen kontaminieren. Enterobakterien wie *Salmonella* spp. und *Escherichia coli* (409, 468), Clostridien (320) sowie Mykobakterien (103) können Pflanzen epi- und endophytisch besiedeln. Mit der Aufnahme und anschließender Neu- bzw. Wiederinfektion von Mensch und Tier schließen sich Infektionszyklen. Als Fallbeispiel sei hier der Ausbruch eines Stammes von *E. coli* O104:H4 im Mai 2011 in Deutschland genannt. Der anfangs fälschlich als EHEC bezeichnete

shigatoxinbildende EAHEC (379) war Auslöser schwerer Durchfallerkrankungen, welche in kurzer Zeit über 3800 registrierte, mitunter sehr dramatische Krankheitsverläufe verursachte. In 22 % der Fälle kam es sogar zur Ausbildung eines Hämolytisch-Urämischen Syndroms (163). Der durch horizontalen Gentransfer mit zusätzlichen Virulenzfaktoren und Resistenzen ausgestattete Erreger (379) konnte bis zu einem Sprossenproduzenten zurückverfolgt werden (78). Appel (29) weist in diesem Zusammenhang explizit auf die Gefahr von Kontamination mit Zoonoseerregern durch den Einsatz von Fäkaldüngern in der Landwirtschaft hin.

Neben Bakteriensporen können auch Dauerstadien (Zysten, Eier) von pathogenen Einzellern (Kokzidien, Giardien) und Wurmparasiten mit dem Kot ausgeschieden werden und sind in der Umwelt mitunter sehr lange überlebensfähig. Sie können 10 Monate (Kokzidien) oder bis 10 Jahre (Spulwurmeier) infektiös bleiben (454). Ausgeschiedene Reo-, Picorna-, Adeno- und Parvoviren sind ebenfalls auffallend 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 (486).

2.2.1. Zoonosen

Zoonosen sind Krankheiten, die von Tieren auf den Menschen und umgekehrt übertragen werden können (389). Die Unterarten, Serovare oder Stämme weisen i. d. R. unterschiedliche, wirtsspezifische Virulenz auf, wie z. B. bei der Spanischen Grippe (452, 466) oder dem *E. coli* O157:H7 (334). Die Wahrscheinlichkeit der Übertragung steigt mit der räumlichen Nähe von Mensch und Tier und eben auch der Düngung der Nahrungs- und Futtermittel mit den jeweiligen Fäkalien.

2.2.1.1. Beschreibung ausgewählter Zoonoseerreger und Modellorganismen

2.2.1.1.1. *Ascaris suum*

Der parasitierende Schweinespulwurm *Ascaris suum*, erstbeschrieben 1782 von Goez (187), ist ein naher Verwandter des humanpathogenen *Ascaris lumbricoides*. Beide Nematoden-Infektionen werden durch die orale Aufnahme von mit Spulwurmeiern fäkal verunreinigten Futter- bzw. Lebensmitteln übertragen (60, 133). Mitunter können auch spezieübergreifende Infektionen stattfinden (336), sodass *A. suum* auch als Zoonoseerreger betrachtet wird. Im Hinblick auf die starke Durchseuchung der europäischen Hausschweinbestände, Nejsum gibt sie mit 21,5 % an, wird die Schweinemast in Industriestaaten als die Hauptinfektionsquelle für humane Askaridosen angesehen. *Ascaris* spp.-Infektionen verlaufen häufig frei von Symptomen und können am ehesten durch den Einachweis im Kot diagnostiziert werden (79).

Auf Grund der sehr hohen Tenazität verschiedener Dauerstadien der Spulwürmer über Jahre hinweg (174, 248) wird *A. suum* häufig als Modellorganismus zur Desinfektionsmittelprüfung und auch in dieser Arbeit genutzt (7).

2.2.1.1.2. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens, erstbeschrieben 1898 von Veillon und Zuber (120), ist ein Gram-positives, sporenbildendes, anaerobes Stäbchenbakterium, welches in die Gruppen A bis E eingeteilt werden kann. Die Einteilung basiert dabei auf dem Vermögen, unterschiedliche Toxine (Virulenzfaktoren) zu produzieren. Während der Typ A auch im Boden vorkommt, findet man A bis E im Magen-Darmtrakt sowie in den Fäzes von Mensch und Tier (375). *C. perfringens* ist ein Gasbrand-, Enteritis- und Diarrhöerreger bei zahlreichen Tierarten und dem Menschen (431, 436). Der Erreger dient in dieser Arbeit als Modellorganismus für Gram-positive, (sporenbildende), anaerobe Stäbchenbakterien.

2.2.1.1.3. *Clostridium sporogenes*

C. sporogenes, erstbeschrieben 1908 von Metchinkoff (372), sporuliert im Gegensatz zu *C. perfringens* (55) deutlich besser in Standardmedien und unter optimalen Bedingungen bereits nach 2 h (28). Daher, und auf Grund der sehr nahen Verwandtschaft (101) bei gleichzeitiger deutlich geringerer Virulenz gegenüber dem zoonotischen *C. botulinum* (Toxovare A und F), wurde *C. sporogenes* in dieser Arbeit als Modellorganismus für Gram-positive, sporenbildende, anaerobe Stäbchenbakterien verwendet. *C. sporogenes* ist ein Bodenbewohner, kann in seltenen Fällen jedoch auch klinisch relevant sein (238).

2.2.1.1.4. ECBO-Virus

Das als Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan Virus oder auch als bovines Enterovirus (BEV) bekannte, unbehüllte Virus wurde 1960 von Boegel und Mussgay (61) beschrieben. Es verursacht Durchfall bei Kälbern und ist kein Zoonoseerreger. Auf Grund seiner sehr hohen Tenazität von mehreren Wochen bis Monaten außerhalb des Wirts (335), wird es häufig für Desinfektionsmittelprüfungen (7) sowie in dieser Arbeit als Modell für Viren genutzt.

2.2.1.1.5. EHEC O157

Die enterohämorrhagische *Escherichia coli* O157:H7 ist ein humanpathogenes Serovar des Darmbakteriums *E. coli* (Escherich, 1886). Im natürlichen Wirt, dem Rind, verursacht O157:H7 keine Klinik, im menschlichen Verdauungstrakt ist dieses Serovar jedoch für zahlreiche Infektionen mit zum Teil schweren Krankheitsverläufen aufgrund der Bildung von Shigatoxinen (334) verantwortlich. Andere *E. coli*-Pathovare können auch andere

Krankheitsbilder verursachen, um mit Septikämien, Toxikämien, Pneumonien, Mastitiden und Urogenitaltrakt-Infektionen nur einige zu nennen (375). Nichtpathogene Stämme wie z. B. der *E. coli* Nissle 1917 werden auch als Probiotikum eingesetzt (272). *E. coli* O157 dient in dieser Arbeit als Modellorganismus für Gram-negative und fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien (48), welche im Gegensatz zu Salmonellen Laktose verstoffwechseln können.

2.2.1.1.6. *Listeria monocytogenes*

Der Gram-positive, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe und intrazelluläre, bakterielle Erreger wurde das erste Mal 1926 von Murray in einem Tierheim gefunden und beschrieben (328). Als natürlicher Wirt des Krankheitserregers wurden Meerschweinchen und Kaninchen erkannt (283). *Listeria monocytogenes* ist ein Zoonoseerreger (244) und kann Septikämien, Enzephalitiden sowie Aborte verursachen, der Keim infiziert Wiederkäuer, Hunde, Katzen, Schweine, Vögel und Menschen (250, 375). Auf Grund der Eigenschaft, bereits ab 1°C und somit auch in gekühlten Lebensmitteln, besonders in Milchprodukten, zu wachsen, sind Listerien bedeutende Verursacher für Lebensmittelerkrankungen (172). *L. monocytogenes* dient in dieser Arbeit als Modellorganismus für Gram-positive, aerobe, nicht sporenbildende Stäbchen.

2.2.1.1.7. *Mycobacterium fortuitum*

Der MO wurde auf Grund seiner häufigen Isolation aus der Umwelt lange Zeit ausschließlich als Saprophyt betrachtet und zählt zu den schnell wachsenden Mykobakterien (464). Im Gegensatz zu den obligat pathogenen Mykobakterien ist *M. fortuitum* in der Lage, auch in der Umwelt zu wachsen und dieses zudem ohne Verlust seiner Pathogenität (203, 210). Erst 2009 gelang Ghosh der Nachweis von Dauerstadien in Form von Sporen dieser seit über 100 Jahren bekannten Gattung (175). Obligat pathogene Mykobakterien sind u. a. in Abwässern nachweisbar (210) und verursachen die häufigste, tödliche, bakterielle Infektionskrankheit in Form von Tuberkulose (210). Der Zoonoseerreger *Mycobacterium bovis* kann neben Tröpfcheninfektion auch durch Milch übertragen werden (401). *M. fortuitum* dient in dieser Arbeit als Modellorganismus für Mykobakterien, die als äußerst widerstandsfähige MO gelten.

2.2.1.1.8. *Salmonella Anatum* und *Salmonella Senftenberg*

Bei der Spezies *Salmonella enterica* handelt es sich um Gram-negative, aerobe sowie fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Sie beinhaltet sechs Subspezies. Dabei besitzt *S. enterica* subsp. *enterica* 2500 Serovare, welche nach dem Kauffmann-White-Schema (256) über verschiedene Antigene (Oberflächen-, Kapsel-, Flagellenantigene) bestimmt werden

können (375). Neben stark wirtsadaptierten Serovaren, wie z. B. an Mensch und Pferd *S. Typhi* bzw. *S. Arbotusequi*, existieren nicht adaptierte Serovare mit hohem zoonotischen Potential, wie z. B. *S. Thyphimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Anatum* u. v. m. (209, 375). Salmonellen verursachen typhoide Allgemeininfektionen und Enteritiden. *S. Senftenberg* ist ein außergewöhnlich hitzebeständiger Serotyp (41) bei gleichzeitiger klinischer Relevanz (385). Aus diesen Gründen wird dieser Erreger häufig als Testkeim für Hygienisierungsprozesse in der Abfallwirtschaft genutzt (15, 309), so auch in dieser Arbeit. *S. Anatum* sowie *S. Senftenberg* dienen darüber hinaus als Modellorganismen für Gram-negative und fakultativ anaerobe Stäbchen, welche im Gegensatz zu *E. coli* Laktose nicht verstoffwechseln können.

2.2.1.1.9. *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist ein Katalase- und Gram-positiver kokkenförmiger, bakterieller Erreger und dient daher als Prüforganismus für Gram-positive, kokkenförmige Krankheitserreger. Gram-negative Kokken hingegen spielen veterinärmedizinisch und damit als Zoonoseerreger keine wesentliche Rolle. Die hohe Säurebeständigkeit (290) macht *S. aureus* zudem zu einem idealen Testobjekt für Hygienisierungsversuche im sauren pH-Bereich. Staphylokokken sind kommensale Haut und Schleimhautbewohner von Säugern und Vögeln (262), wobei geschätzt wird, dass 20 % der Menschen den pathogenen *S. aureus* auf ihrer Nasenschleimhaut tragen (375). Als zoonotischer Erreger (490) ist er in der Lage, bei Mensch und Tier gewebsschädigend zu wirken, dabei sind u. a. Haut-, Wund- und Knocheninfektionen, Mastitiden, Endometritiden und Cystitiden als Krankheitsbilder beschrieben. Auch Exotoxine können von *S. aureus* gebildet werden, woraus Lebensmittelvergiftungen resultieren können (375). Populärwissenschaftlich als „Killerkeim“ (360) bezeichnet, ist der Erreger auf Grund seiner Resistenzbildung (MRSA) und der Häufigkeit bei nosokomialen Infektionen (190) in den wissenschaftlichen und öffentlichen Fokus gerückt.

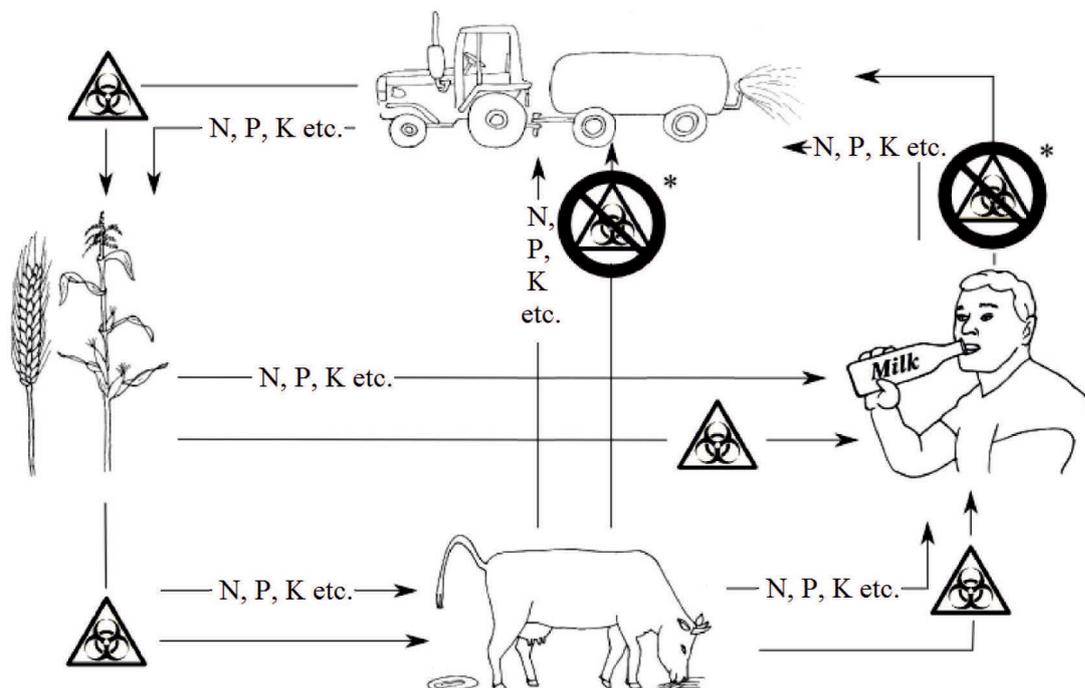


Abbildung 1: angestrebte Unterbrechung des Infektionskreislaufes bei gleichzeitigem Schluss des Stoffkreislaufes, * = milchsauer Fermentation Zeichnung: Scheinemann / Winter

2.3. Aktuelle Abfall-Hygenisierungsmethoden

2.3.1. Kompostierung

Die Kompostierung ist eine weltweit verwendete Fäkalien- und Abfallbehandlungsmethode. Dabei kommt es zu einer Hygenisierung durch Selbsterhitzung (251), verursacht über die Vermehrung von wärmeproduzierenden und thermophilen Destruenten. Nichtsporenbildende Bakterien werden dabei über Monate hinweg, mitunter aber unzuverlässig reduziert, sporenbildende Krankheitserreger wie *C. perfringens* überstehen diese Behandlung jedoch ohne nennenswerte Reduktion in den ersten zwei bis drei Monaten (363). Auch Eier von *Ascaris* sp. werden nur unzureichend abgebaut (260). Neben dieser begrenzten Hygenisierungsleistung führt die aerobe Kompostierung auch zu enormen Kohlen- und Pflanzennährstoffverlusten: C (30 – 63 %), N (37 – 60 %), P (23 – 39 %) und K (20 – 52 %) (458). Der absolute Masseverlust kann dabei zwischen 15 % (138) und 57 % (458) schwanken. Dementsprechend steht ein Teil der ursprünglich enthaltenen Nährstoffe des Kompostes nicht mehr für die Düngung zur Verfügung, sondern wird in Form von

klimaschädigenden Treibhausgasen während der Hygienisierung emittiert (434). Neben dem erheblichen Verlust auf der Massenebene führt die thermophile Kompostierung zugleich zu einem starken Abbau von Ligninen, welche jedoch einen wichtigen Ausgangsstoff für die Humusbildung darstellen (467).

2.3.2. Biogasanlagen

Im Zuge der Entwicklung der Energiepreise (72) und der Fördermittel nach dem Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (1) gewinnt die Energieproduktion als Einnahmequelle für den Land- und Forstwirt eine immer größere Bedeutung (496). Neben zahlreichen Vor- und Nachteilen (301) der Biogasproduktion spielt die Hygienisierung bei der Nutzung von Fäkalien eine wichtige Rolle. Fäkale Abfälle, wie z. B. Gülle, die frei von gefährlichen Krankheitserregern sind (5), werden nach EU-Verordnung 1069/2009 in die (Risiko-) Kategorie 2 eingeordnet, und können kompostiert oder ohne Vorbehandlung in Biogasanlagen eingebracht (9) werden. Dort erfolgt in der Regel *kein* Pasteurisationsschritt, welcher zwar zu einer deutlichen Reduktion der coliformen Keime führen könnte, jedoch mitunter weder Enterokokken noch sporenbildende Krankheitserreger nachhaltig degradiert bzw. beeinflusst (35). Bei fehlender Pasteurisation findet keine nennenswerte Reduktion von *Enterobacteriaceae* bzw. Enterokokken statt. Während der Biogasgewinnung kommt es bei Substraten wie Gülle zu einem Masseverlust von 10 bis 15 % (73), welcher nahezu ausschließlich aus Verlusten der Trockensubstanz (TS) herrührt (208). Breitschuh betont dabei die daraus resultierenden erhöhten, klimaschädigenden Lachgasemissionen bei der Verwendung von Substraten mit geringerem TS-Gehalt als Dünger (73). Auf Grund dieses Masseverlustes steigt jedoch der relative Anteil von Ligninen (492), da sie unter anaeroben Bedingungen weniger stark abgebaut werden. Unerwünscht ist die Einstellung einer milchsäuren oder methanogenen Fermentationsflora bei der Gewinnung von Wasserstoff aus (fäkalen) Abfällen, da die Gasausbeute durch diese Fehlfloren stark sinkt (346, 497). Auch in methanproduzierenden Biogasanlagen ist eine starke milchsäure Flora nicht erwünscht, da die Mehrzahl der methanogenen Bakterien einen pH-Wert über 7 bevorzugt (491).

2.4. Milchsäure Fermentation

Als milchsäure Fermentation bezeichnet man die Vergärung von Zucker zu Laktat. Dabei unterscheidet man in homofermentativ, die Glukoseverstoffwechslung (ein Molekül) zu zwei Laktatmolekülen unter Gewinn von zwei Molekülen Adenosintriphosphat (ATP), und heterofermentativ, die Glukoseverstoffwechslung zu einem Laktatmolekül und einem Ethanolmolekül bei dem Gewinn von einem Molekül ATP. Bei der heterofermentativen

Gärung können zudem auch volatile Fettsäuren (VFAs), wie z. B. Azetat und Formiat, entstehen (304). Laktat sowie VFAs wirken besonders in ihrer nichtdissoziierten Form bakteriostatisch bis bakterizid (265, 288, 290, 366) und sind folglich mit sinkendem pH-Wert wirksamer (185, 366). Milchsäurebakterien wachsen anaerob bzw. mikroaerophil und sind in der traditionellen Lebensmittelkonservierung häufig mit Hefen assoziiert (201).

2.4.1. Milchsäure Fermentation in der Lebensmittelkonservierung

Die milchsäure Fermentation in Form der Sauerteigherstellung ist seit der Jungsteinzeit vor 6000 bis 5000 Jahren bekannt und wird bis heute in ähnlicher Form angewendet (274). Aus der babylonischen Kultur um Hammurabi (1750 v. Chr.) sind Tafeln bekannt, die die Verwendung von Milch oder Joghurt für verschiedene Gerichte darstellen (40). Schriftlich erwähnt wurde fermentierte Milch als eine Art dünner Joghurt von Caelius Apicius in dem antiken Kochbuch (ca. 1. - 4. Jhd. n. Chr.) „De re coquinaria“ (22). Jedoch wird dieses Werk mehreren Autoren zugeschrieben und einige Teile scheinen bereits aus der griechischen Antike zu stammen (137). Im modernen westlichen Kulturkreis wurde die milchsäure Fermentation von Sauerkraut, Gurken und Oliven auf Grund ihrer hohen wirtschaftlichen Bedeutung besonders intensiv erforscht und eine sukzessive Veränderung der beteiligten Bakterienflora beobachtet. Auf Grund der pH-wertsenkenden und bakteriziden Wirkung der gebildeten VFAs werden lebensmittelverderbende Keime verdrängt und das fermentierte Lebensmittel konserviert. Zudem wird durch die



Abbildung 2: traditionelle Sauerkrautherstellung Foto: William H. DuBay (242)

Anaerobiose eine Oxidation des Produktes verhindert (201). In der Medizin werden milchsauer vergorene Produkte erfolgreich als Probiotika genutzt, um Dysbiosen zu behandeln (168). Bei der Bierherstellung und Fleischkonservierung können Laktobazillen jedoch unerwünschte Effekte wie Fehlgärungen und Einbußen in der sensorischen Qualität verursachen (201).

2.4.2. Milchsäure Fermentation in der Silageherstellung

Ähnlichkeiten zur Lebensmittelkonservierung werden in der Futtermittelfermentation deutlich. So verhindert bei der Silageproduktion eine vergleichbare Sukzession von unterschiedlichen hetero- und homofermentativen Arten eine Etablierung von Krankheitserregern wie Clostridien oder *Listeria monocytogenes* (201) sowie eine Oxidation

des Pflanzenmaterials. Ähnlich der Haltbarmachung von Lebensmitteln ist die Silierung ebenso ein altes Konzept, welches bereits seit über 3200 Jahren in den prähistorischen Hochkulturen des Mittelmeerraumes Anwendung fand. In Deutschland hielt die Silierung erst Mitte des 19. Jahrhunderts Einzug in die landwirtschaftliche Praxis, Jahrhunderte nach der Sauerkrautherstellung (494). Heute werden auch in der Silageproduktion heterofermentative Starterkulturen eingesetzt, die neben Laktat auch Azetat produzieren, welches die Stabilität der Silage bei späterer Nutzung unter Sauerstoffeinfluss erhöht. Das Azetat verhindert eine allzu schnelle Etablierung von thermophilen Hefen, die die Silage verderben könnten (491).



Abbildung 3: Grassilage im Fahrsilo Foto: Werner Willmann (214)

2.4.3. Milchsäure Fermentation in der Abfallverwertung

Ogleich die Betrachtung der Konservierungs- und Hygienisierungsmöglichkeiten der milchsäuren Fermentation den potentielle Nutzen in der Behandlung von Fäkalien, die als Dünger gebraucht werden sollen, nahe legt, ist in der verfügbaren deutschen bzw. englischen Literatur nur wenig Nutzbares hinterlegt. Eine fernöstliche Methode der anaeroben Fermentation ist der Bokashi (japanisch: „verblässen“), der häufig zur Verarbeitung von Küchenabfällen genutzt wird (297). Lediglich eine wissenschaftliche Arbeit (146) zu einem Hygienisierungsversuch von Fäkalmatrizes mit Hilfe von Wurmkompostierung nach einer milchsäuren Fermentation konnte im Literaturstudium gefunden werden. In der Arbeit von Factura wurden „Effektive Mikroorganismen“ (EM) bzw. Sauerkrautsaft als Starterkultur

eingesetzt. Ihr Ansatz ähnelt der Grundidee dieser Arbeit, Fäkalien mit Hilfe von milchsaurer Fermentation für eine anschließende Nutzung als Dünger zu behandeln. Die Fermentation wurde jedoch in der beschriebenen Versuchsanordnung als Prävention gegenüber Geruchsentwicklung vorgenommen. Über die Verminderung der Emission von Schadgasen und Fäulnis durch EM und Bokashi sind einige Arbeiten zu finden (205, 206). Mit der Entdeckung, Entwicklung und Vermarktung von EM von Teruo Higa (222) wird der Bokashi fast ausschließlich mit EM in Verbindung gebracht. EM ist ein Konglomerat aus Laktobazillen, Hefen, Photosynthesebakterien, Actinomyceten und anderen taxonomischen Gruppen (222). Neben zuweilen tatsächlichem, nachgewiesenem Nutzen in der Landwirtschaft, z. B. durch die Unterdrückung von phytopathogenen Mikroorganismen (162), werden den EM auch stark esoterisch anmutende, als “wissenschaftlich fundiert“ bezeichnete Eigenschaften zugeschrieben (313, 510). Einige Hersteller brennen diese Mikroorganismen in Ton, um ihn dann als EM-Keramik mit besonderen energetischen Eigenschaften zu vermarkten (142). Verquickt wird der EM-Nimbus nicht nur mit dem Bokashi oder Ton, sondern auch mit Terra Preta (141, 463), welche ja tatsächlich ein pediologisches Kuriosum darstellt (siehe 2.5.3.1 Seiten: 18 ff).

In der historischen landwirtschaftlichen Praxis Deutschlands sind Erfahrungen der urgroßelterlichen Generation von mutmaßlichen milchsauren Fermentationen von Kuhmist mündlich überliefert. Die Überlieferung lautet: “Schicht‘ ihn gut, halt‘ ihn feucht, tritt ihn fest, das ist für den Mist das Allerbest.“ Über die gezielte Nutzung einer milchsauren Fermentation zur Bekämpfung von Krankheitserregern in Fäkalien konnte in der verfügbaren Literatur nichts gefunden werden. Auch in dem von Martens und Böhm im Jahre 2009 veröffentlichten Überblick über die verschiedenen Behandlungsmethoden zur Erreger-Inaktivierung fand eine milchsaure Fermentation keine Erwähnung (308).

2.5. Bodenparameter

Die nun folgenden Definitionen und Ausarbeitungen stellen die Wichtigkeit der Erhaltung bzw. der Erhöhung des Humusanteils im Ackerboden dar. Sie erklären die Komposition der im Material- und Methoden-Teil vorgestellten Fermentationsmatrizes mit ihren Zuschlagstoffen, insbesondere der Holzkohle, und ermöglichen die spätere Beurteilung der Bedeutsamkeit des Masseerhalts des organischen Materials während der Hygienisierung.

2.5.1. Bodenhorizonte

In der Bodenkunde (Pedologie) teilt man verschiedene Erdschichten in Horizonte ein. Dabei unterscheidet man grob (von oben nach unten) in Auflagehorizonte (L und O) sowie in

Mineralbodenhorizonte (A bis C). Die Feindifferenzierung erfolgt dann durch die Kombination der Buchstaben bzw. durch zusätzliche kleingeschriebene Buchstaben, die zusätzliche Eigenschaften beschreiben (132). So wird z. B. der Ap-Horizont als der Teil des A-Horizonts von Ackerböden beschrieben, der eine regelmäßige Bearbeitung erfährt. Zudem schließt er den Ahk-Horizont mit ein, welcher durch wiederkehrende Düngung nachhaltig in Basen- und Nährstoffverhältnissen beeinflusst wurde. (132)

2.5.2. Humus

Mit Humus wird das gesamte tote organische Material (TOM) im Boden bezeichnet. Dieses besteht vorwiegend aus Ausscheidungen lebender und den Rückständen toter Organismen. Je nach Artenzusammensetzung der Bodenorganismen, dem Polymerisationsgrad der Humusstoffe sowie der organischen Auflage wird zwischen Mull, Moder und Rohhumus unterschieden (132). Auf Grund der umfangreichen Polymerstruktur besitzt Humus mannigfaltige, für das Pflanzenwachstum positive Eigenschaften. Bedingt durch seine Ionenaustausch- und Pufferkapazitäten ist der Düngerbedarf bei höherem Anteil deutlich geringer (57). Auch im Wasserhaushalt des Bodens spielt Humus eine entscheidende Rolle. Neben den direkten Vorteilen für die Ackerpflanze in der Wasserverfügbarkeit (nutzbare Feldkapazität) (132) wirkt sich eine hohe Wasserspeicherfähigkeit (Feldkapazität) auch auf eine verminderte Nährstoffauswaschung sowie Wassererosion bei Starkregenereignissen aus (57). Der Gehalt an Humus wird in Masseprozent ermittelt und mit Kurzzeichen ausgedrückt.

2.5.3. Schwarzerde

Schwarzerde ist ein Bodentyp, welcher in der Bodenkunde eine besondere Stellung besitzt und ausnahmslos als Hohertragsboden gilt (26, 173). Mit einem 40 bis 80 cm mächtigen humosen Oberboden, der auf Grund seiner dunkelbraunen bis schwarzen Farbe namensgebend ist (132), und einem hohen Anteil bioturbat eingearbeiteter organischer Substanz, stellt dieser Bodentyp mit 3 % Flächenanteil eine nationale aber auch weltweite Seltenheit dar (26). In der Ursprungsform existiert kein B-Horizont, sodass der A(Axh) - Horizont direkt an den C-Horizont anschließt. Der Axh-Horizont besitzt eine hohe Kationenaustauschkapazität mit einer Basensättigung von ≥ 50 % und ein stabiles Aggregatgefüge (132). Unter letzterem versteht man ursächlich die Besiedelung von anorganischen Bodenbestandteilen wie Tone, Oxide und Hydroxide durch Mikroorganismen. Essentiell für die Besiedelung und damit verbundene Aggregation sind organische Substanzen. Die Aggregation führt zur Stabilisierung, da die Verschlammungsneigung und somit die Erosion verringert wird (59). Mit zunehmender Degradierung der Böden kommt es zu einer

Ausbildung eines B- und einer Abnahme des A-Horizontes. Die Entstehung von Schwarzerden in Deutschland gilt heute als umstritten. Während Hohenstein 1919 (228) von einer bodenbildenden frühholozänen Steppenvegetation (Tschernosem) ausging, stellte Firbas 1949 (160) fest, dass die zum Neolithikum in Deutschland vorherrschende Vegetationsform der Eichenmischwald war, obgleich Wald nach Hohenstein eine Degradation von Schwarzerden durch die Steigerung der Bodenfeuchte bewirkt hätte. Hingegen würde in Steppengebieten das kontinentale und aride Klima den vollständigen mikrobiellen Abbau des TOM verhindern. Firbas erörterte zwar die theoretische Möglichkeit gehölzarter Vegetationen in trockeneren Bereichen Zentraleuropas, wie z. B. im Regenschatten des Harzes, der Magdeburger Börde, betont jedoch gleichzeitig, dass seine Pollenanalysen einen solchen Rückschluss nicht zuließen. Neben den Erkenntnissen Firbas geht Gerlach (173) auf die Arbeit von Scheffer & Meyer (404) ein, welche besagt, dass eine Schwarzerdenbildung auch unter Wäldern möglich sei, sofern eine rasche Entkalkung durch zu viel Niederschlag ausbliebe, denn ein hoher Kalkgehalt verbessere die Bildung von Ton-Humus-Komplexen. Folglich wäre wenig Niederschlag, egal ob in Steppe oder Wald, ein hinreichendes Kriterium für die natürliche Entstehung von Schwarzerden. Zudem wurde in der Vergangenheit davon ausgegangen, dass Schwarzerde sich bevorzugt auf kalkhaltigem Löss bzw. Lösssediment ausbildet. Jüngere Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass Lössstandorte nicht zwangsläufig für die Bildung notwendig sind, sondern vielmehr sowohl sandige als auch lehmige Böden in Frage kommen (173). Eher scheint nun der Einfluss von Pflanzenkohle als pedogenetischer Faktor immer mehr in das Blickfeld zu rücken (173, 179, 412, 427), denn in Steppen sind natürliche Brände noch durchaus denkbar und weitaus häufiger (173) als in zentral-europäischen Wäldern (457) Umso mehr stellt sich daher die Frage nach der anthropogenen Beeinflussung der Schwarzerden durch Brände.

2.5.3.1. Anthropogen beeinflusste Entstehung von Schwarzerden

Bereits 1929 wurde von Childe (92) die Hypothese aufgestellt, dass die jungsteinzeitliche (Linien-)bandkeramische Kultur als älteste bäuerliche Gesellschaft Mitteldeutschlands ihre Umwelt aktiv durch (Brand-)Rodung, aber ohne Düngewirtschaft formte. Aufgrund des daher vermuteten Wanderfeldbaus und fälschlich angenommener Souterrainhöhlen schloss Childe auf eine nur temporäre Sesshaftigkeit der Bandkeramiker. Nach Gehrt (171) verwarf man jedoch diese Idee 1971 auf Grund der Arbeit von Modderman (322), welcher die Siedlungsstruktur und die enorme Fruchtbarkeit von Schwarzerdeböden als Argumente für eine permanente Sesshaftigkeit anführt. Gleichzeitig wurde allerdings mit dieser Erkenntnis auch die Annahme der Nutzung von Brandrodung abgelegt (171). Analysen von Pollen und

Holzkohle in Seesedimenten legen jedoch nahe, dass zum einen eine wiederkehrende Bewirtschaftung der Regionen und zum anderen bereits 3500 – 3000 v. Chr. eine massive menschliche Beeinflussung der Landschaft und somit auch der Bodenbildung durch Brandrodung stattfand (97). Skjemstad (427) beschrieb 1996 den protektiven Charakter von Pflanzenkohle für organische Kohlenstoffverbindungen in australischen Böden. So seien diese vor chemisch-physikalischen Zersetzungsprozessen besser geschützt und könnten auch unter Bedingungen existieren, die normalerweise zu einem Abbau des TOMs führen würden. Besonders deutlich scheint die Protektivität unter den vollhumiden tropischen Klimaverhältnissen des Amazonasbeckens zu werden. Während bei der klassischen Entstehungshypothese des Tschernosems stets eine notwendige Aridität betont wurde, führen die extremen Witterungsbedingungen im immergrünen Regenwald i. d. R. zur Bildung von sehr armen Böden, den dort vorherrschenden Oxisolen, mit fehlendem A-Horizont. Jedoch konnten punktuell im Amazonasbecken durchschnittlich 21,2 ha (118) große, humusreiche Schwarzerden mit mehreren Dezimetern mächtigen A-Horizonten entdeckt werden, die so genannte „Terra Preta“ (portugiesisch: schwarze Erde) (179). Terra Preta kann im Gegensatz zu den großen mitteleuropäischen Schwarzerdegebieten klar als anthropogen bezeichnet werden, da in dem A-Horizont zum einen sehr häufig Tonscherben zu finden sind und zum anderen viele Holzkohlestückchen aus unterschiedlichen Jahrtausenden für eine lange bzw. häufige Besiedlung sprechen (119). Im tropischen Oxisol hingegen verwittern Tongefäße relativ rasch und entziehen sich zumeist der archäologischen Befundung. Eden (135) gibt 1984 das Alter der ältesten Terra Preta mit 450 v. Chr. an, jedoch betont er die Einzigartigkeit dieses Fundortes bei Manaus (Brasilien). Deutlich häufiger wurden Terra Preta-Gebiete gefunden, deren Entstehungen mit 200 v. Chr. bis 100 n. Chr. datiert wurden. Eden vermutet zudem, dass die Terra Preta anfangs eher zufällig in den Siedlungen entstand, mit der Entdeckung der Fruchtbarkeit dieser Böden jedoch dann zum Anbau von Nahrungsmitteln auf Grund ihrer Fruchtbarkeit (286) bevorzugt genutzt wurde. Heute wird davon ausgegangen (178), dass die Kombination von Holzkohle zusammen mit nährstoffreichen, organischem Abfall zur Entstehung der Terra Preta führte. Obgleich Glaser (178) von einem zunächst zufälligen und dann selbstorganisierenden Prozess der Hausgärten mit Komposthaufen ausgeht, legt die Arbeit von Steiner (441) durchaus eine gezielte Landwirtschaft der indigenen Bevölkerung nahe. Auf den Böden mit einem „Terra Preta-Horizont“ konnte erfolgreicher Ackerbau betrieben werden, sodass die Entstehung größerer prähistorischer Amazonaskulturen ermöglicht wurde. Denevan (118) stellte 1996 ein Bewirtschaftungsmodell der indigenen Bevölkerung der vergangenen Jahrtausende dar, das neben den gedüngten Terra

Preta-Flächen auch Fischfang sowie extensiv genutzte Flächen und ein Handelsnetz zur Lebensmittelversorgung mit einbezogen. Die von Smith (432) untersuchten 0,3 – 5 ha großen Terra Preta-Flächen beherbergten nach seinen Schätzungen Siedlungen von 100 – 2000 Einwohnern. Größere Flächen wie die bei Manacapuru (Brasilien) sollen sogar Einwohnerzahlen von 18.000 ermöglicht haben. Selbst heute gelten diese Gebiete noch als besonders fruchtbar (179). Steiner (440) konnte 2007 experimentell nachweisen, dass eine regelmäßige organische Düngung bei Vorhandensein von Holzkohle die Bodenfruchtbarkeit auch unter vollhumiden Bedingungen langfristig verbessert.



Abbildung 4: Tropisches Oxisol Foto: Bruno Glaser



Abbildung 5: Terra Preta Foto: Bruno Glaser (136)

Schwarzerden konnten ebenso punktuell im Rheinland gefunden werden. Nach Gerlach (173) sind sie anthropogener Natur und hatten neben mesolithischen Funden ihren Ursprung im Jung- bis Endneolithikum. Demnach sei die Besiedlung nicht auf Grund von Schwarzerden erfolgt, sondern vielmehr seien (ähnlich der Terra Preta im Amazonas) die Schwarzerden Resultat der Besiedlung durch neolithische Kulturen mit einer noch nicht erforschten „brandwirtschaftlichen Praxis“ (173). Ursache und Wirkung stehen hier im klaren Widerspruch zu der ursprünglichen Annahme der Bildung von Schwarzerden. Zwar lässt auch Gerlach eine intentionale Bodenbildung offen, jedoch ist dies Forschungsfeld der Archäologie/Pedologie. Bedeutend für die anwendungsorientierte Forschung scheint vielmehr, dass eine Schwarzerde überhaupt anthropogenen Ursprungs sein kann.

2.5.3.2. Bedeutung von Schwarzerden

Schwarzerden gelten als Referenzackerböden. So ist ihre Bodenzahl (auch Ackerzahl) 100 die höchste und bezieht sich auf die Böden der Magdeburger Börde. Eine Fläche mit der Bodenzahl 35 könnte nur einen 35%igen Reinertrag im direkten Vergleich zur Magdeburger Börde erbringen (58). Wäre es also möglich, Ackerflächen mit niedriger Bodenzahl durch Applikationen von Holzkohle und organischem Dünger zu restaurieren, um ihre Fruchtbarkeit dauerhaft zu erhöhen oder gar schwarzerdenähnliche Böden klimazonenunabhängig zu erzeugen, könnte die Lebensmittelproduktion weltweit erhöht werden.

2.5.3.3. Degradierung von Ackerböden

Die Degradierung von so komplexen Systemen wie Ackerböden kann von verschiedensten Faktoren, wie z. B. einer strukturellen Schädigung der Bodenbeschaffenheit, sowie daraus resultierenden Änderungen in den physikalischen Eigenschaften und der Biosphäre herrühren. Häufig wird damit jedoch der Austrag von Nährstoffen beschrieben. Dieser erfolgt zum einen durch die Ernte von Feldfrüchten, zum anderen aber auch durch Erosion und Verstoffwechselung durch Mikroorganismen (57). Die Probleme werden bereits seit Jahrzehnten erforscht (367). So wurde auch ein EU-einheitliches „Monitoring-Konzept“ erarbeitet, um Risiken für die Böden in der EU zu kartographieren (131). An erster Stelle der Risiken steht dabei der Verlust von organischer Substanz (Humus) in den Böden. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auch auf den Humusgehalt des Ap-Horizonts gelegt.

2.5.3.4. Degradierung von Humus und CO₂-Bilanzen

Eine Abnahme der Humuskonzentration führt neben dem Wegfall der positiven Effekte des Humus auch zu einer bedeutenden positiven Nettobilanz in der CO₂ Freisetzung, wie Sleutel (429) in einer Langzeitstudie mit Blick auf die CO₂-Reduktionsverpflichtungen der Kyoto-Protokolle darstellen konnte. Sleutel schätzt die Emission allein der belgischen Äcker auf 2.203.000 Tonnen CO₂ pro Jahr, was gerundet 1,64 % des Gesamt CO₂-Ausstoßes Belgiens ausmacht. Im Umkehrschluss würde dies jedoch auch bedeuten, dass bei einer erfolgreichen Humusrestauration Ackerböden als CO₂-Senke betrachtet werden können – bei gleichzeitiger Bodenverbesserung. Eine Restauration mit Hilfe von pyrolysierten biogenen Reststoffen wirkt folglich in zweierlei Hinsicht als CO₂-Senke, zum einen durch die Biostabilität der verkockten Materialien (180) und zum anderen durch den Schutz der Humuspartikel im Boden. Generell ist jedoch die Bio-/Holzkohleapplikation noch unzureichend erforscht und benötigt vor allem Langzeitstudien (478).

2.6. Zusammenfassung und Einordnung in ein nachhaltiges Ackerbodenkonzept

Das angedachte Gesamtkonzept, in dem die Hygienisierung einen Teilbereich abdeckt, besitzt eine potentielle Relevanz in der zukünftigen Ackerbodenbearbeitung. Die Attraktivität des Konzeptes wird deutlich bei der Betrachtung der wichtigsten Vorteile:

- Der generelle Vorteil bei der Verwendung von Wirtschaftsdünger: Die Reduktion der CO₂-Produktion aufgrund der Verwendung von anfallenden organischen Abfällen anstelle von z. B. großtechnisch produzierten NO₃⁻ oder die Vermeidung der potentiellen Gefahr ausgehend von schwermetallhaltigem, montan gefördertem PO₄³⁻ etc. (416).
- Die Reduktion der CO₂-Freisetzung durch eine Verringerung des Humusabbaus und eine Absenkung des CO₂-Gehaltes der Atmosphäre durch die Verwendung von verkoktem, biogenen Kohlenstoff und einer Erhöhung des Humusanteils (180, 427, 429).
- Die Verbesserung der Bodenqualität für die Feldfrucht durch die Erhöhung des Humusanteils (26, 57, 132, 173).
- Die Hygienisierung der fäkalen Abfälle zur Unterbrechung von Infektionskreisläufen soll die Sicherheit des Düngers im Vergleich zu bisherigem Wirtschaftsdünger erhöhen (diese Arbeit).
- Die Reduktion der Masseverluste in Form von Treibhausgasen (434) während der Hygienisierung, und damit einhergehend die Erhöhung des vorhandenen organischen Materials zur Düngung (diese Arbeit).

2.7. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, durch die milchsaure Fermentation fäkaler Abfälle darin enthaltene Krankheitserreger zu inaktivieren. Um die Wirksamkeit der Hygienisierung des für die Düngung bestimmten Substrates zu testen, werden die unter 2.2.1.1 (Seite 8 ff.) beschriebenen Modellorganismen (bzw. das Modellvirus) während der Fermentation verwendet und darüber hinaus die fäkalinhärenten pathogenen MO beobachtet. Mit dem Schwerpunkt, der auf die bakteriologischen Untersuchungen gelegt wird, soll nicht allein der Hygienisierungseffekt beschrieben, sondern auch nach Hinweisen für dessen Ursachen gesucht werden. Dafür wird die Fäkalflora auf Veränderungen geprüft, um zum einen zeigen zu können, dass eine milchsaure Fermentation stattfindet und zum anderen, um potentielle Indikatorkeime benennen zu können. Der Einfluss verschiedener Komponenten des zu fermentierenden Materials sowie einer *Lactobacillaceae*-Starterkultur werden darüber hinaus untersucht. Parallel zum bakteriologischen Nachweis der milchsauren Fermentation werden die Konzentrationen der volatilen Fettsäuren sowie der pH-Wert bestimmt. Mit den gemessenen Parametern werden Bioassayexperimente durchgeführt, um deren Wirksamkeit als mögliche Ursache für die Hygienisierung zu zeigen.

Um die Bakterienfloraänderungen während der Fermentation der kultivierbaren sowie nicht kultivierbaren Spezies zu detektieren, wird die Gradientengelelektrophorese zur Analyse der amplifizierten 16S-rDNS genutzt.

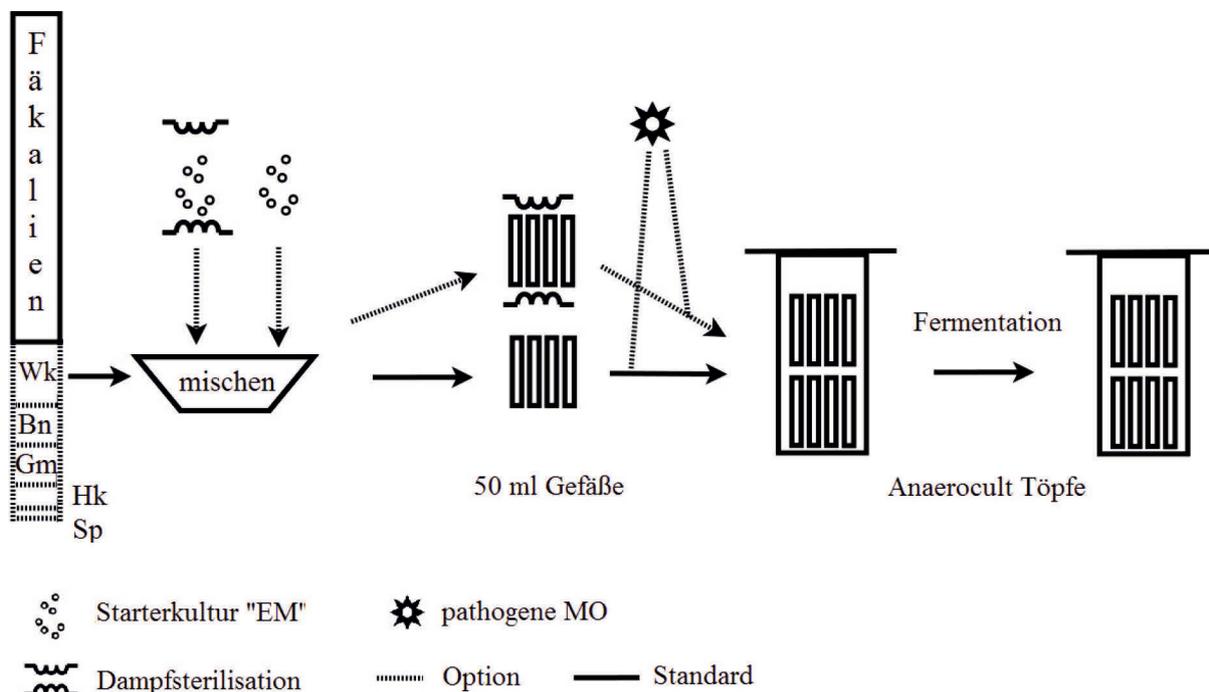
Zudem soll die Messung der Masseverluste während der milchsauren Fermentation mit den in der Literatur hinterlegten Verlusten während der Kompostierung bzw. Biogasgewinnung verglichen werden, um dann die nachfolgend zum Düngen bzw. zum Humusaufbau verfügbare Menge bewerten zu können.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien aufgezählt sowie das experimentelle Design dargestellt. Details zu den Rezepturen sowie zu den Arbeitsprotokollen sind im Anhang zu finden.

Grundsätzlich lässt sich die Analytik in zwei große Bereiche einteilen: die Ermittlung und Quantifizierung der kultivierbaren und die Bestimmung der nicht-kultivierbaren Bakterienspezies. Erstere erfolgen durch verschiedene klassische Kulturverfahren, beispielsweise die Lebendkeimzahlbestimmung und Stoffwechselltests sowie die anschließende Spezifizierung mittels MALDI-TOF. Die Ermittlung der nicht-kultivierbaren Spezies erfolgt mit Hilfe der 16S-rDNS-Amplifikation in Anwesenheit eines Universal-Primerpaars, der Auftrennung mittels der Gradientengelelektrophorese und daran anschließender stichprobenhafter Sequenzierung. Über die Analyse der bakteriellen Parameter hinaus wurden die Konzentrationen von Viren, Spulwürmern, Gärsäuren, Hydroniumionen sowie Masseänderungen betrachtet.

3.1. Matrixzusammensetzung



Wk: Weizenkleie, Bn: Bentonit, Gm: Gesteinsmehl, Hk: Holzkohle, Sp: Sägespäne

Abbildung 6: Skizze des experimentellen Designs, Balken proportional zur Zusammensetzung (m/m)

Die Fäkalmatrices setzen sich, wie in **Abbildung 6** skizzenhaft und auf Seite 103 im Detail dargestellt, aus wenigen Komponenten zusammen. Es sollte ein üblicher Tierklinik-Abfall simuliert werden, unter gleichzeitiger Berücksichtigung der späteren Dünge- und

Bodenverbesserungswirkung. Die Matrices enthielten Rindergülle (Lehr- und Versuchsgut Oberholz, Großpösna, Deutschland) sowie Weizenkleie (LHG, Schmölln, Deutschland), Holzkohle (Köhlerei, Tornau, Deutschland) Sägespäne (HVT, Dittersdorf, Deutschland), Bentonit (Beckmann und Brehm, Beckeln, Deutschland) und Basaltgesteinsmehl (Allgemeine Baustoff-Handels-Contor, Erfurt, Deutschland). Optional wurden “Effektive Mikroorganismen” (EMa, Multikraft, Pichl/Wels, Österreich) den Matrices hinzugefügt. In weiteren Untersuchungen wurde anstelle von Rindergülle Klärschlamm-Filterkuchen (AZV Leisnig, Leisnig, Deutschland) von Kleinkläranlagen verwendet, um ein weiteres Anwendungsgebiet der milchsäuren Fermentation zu testen. Folglich sind die in dieser Arbeit verwendeten Substrate auf Rindergüllebasis Wirtschaftsdünger mit Bodenhilfsstoffen sowie Substrate auf Klärschlamm-basis, Klärschlämme mit Wirtschaftsdünger sowie Bodenhilfsstoffe (vgl. 2.1.) Während die Verwendung von Wirtschaftsdüngern rechtlich relativ unbedenklich ist, ist die Verwendung von Klärschlämmen als Düngemittel problematischer. So sind z. B. grundsätzlich eine behördliche Genehmigung sowie Bodenuntersuchungen vorgeschrieben (4).

Nach der Vermischung der verschiedenen Zuschlagstoffe wurden 27 g der Matrices in 50 ml Reaktionsgefäße (TPP, Trasadingen, Schweiz) portioniert, bei -18°C tiefgefroren und mit Versuchsbeginn bei 37°C anaerob bebrütet (Anaerocult Kits und Töpfe, Merck, Darmstadt, Deutschland). Der Deckel der Reaktionsgefäße wurde während der Bebrütung nur locker angeschraubt, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Der Bebrütungszeitraum wurde den jeweiligen Fragestellungen angepasst und variierte von 1 bis 56 Tagen. Nach der Bebrütung wurden die Proben erneut tiefgefroren und daraufhin analysiert.

3.1.1. Einzelkomponenten

Der simulierte Klinikabfall enthielt Rindergülle als fäkale Komponente. Die Sägespäne entsprachen gängiger Tiefstreu und stellen gleichzeitig eine mikrobiologisch schwerer verfügbare Kohlenstoffquelle dar. Zudem wurde Weizenkleie als Modell für Futterreste bzw. Futterabfälle hinzugegeben, welches vorrangig als leicht verfügbare Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen (MO) dienen soll. Bentonit und Basaltgesteinsmehl dienen als mineralische Komponenten, die die Düngewirkung und Bildung von Ton-Humuskomplexen verbessern sollten (217, 404). Ebenso sollte die Holzkohle, die bereits im Literaturteil als Humusprotektor und Katalysator diskutiert wurde (179, 412, 427), einen bodenverbessernden Effekt haben. Die Verwendung von Klärschlämmen anstelle der Rindergülle als fäkale

Komponente sollte das Anwendungsspektrum der Hygienisierungsmethode über die landwirtschaftliche Verwendung hinaus erweitern.

3.2. Mikrobiologische Methodik

3.2.1. Kulturelle mikrobiologische Methoden

Zur Bestimmung der quantitativen und qualitativen bakteriologischen Parameter wurden 0,5 g der Probe eingewogen und in 4,5 ml PBS aufgenommen. Für die quantitativen Bestimmungen wurden Verdünnungsreihen um den Faktor 10 bis zur Verdünnung 10^{-6} angelegt und auf folgenden Nährböden ausplattiert und ausgezählt. Die Nachweisgrenze lag bei ca. 3,00 \log_{10} KbE/g bzw. 2,00 \log_{10} KbE/g, je nach Menge der ausplattierten Suspension (10 oder 100 μ l).

- Columbia-Blutagar (Schafblutagar, Oxoid, Wesel, Deutschland) zur Bestimmung der aeroben bzw. anaeroben Gesamtkeimzahl, Inkubationszeit 24 bzw. 48 h
- Gassner Agar (Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner, mod., Sifin, Berlin, Deutschland) zur Bestimmung der Gram-negativen Bakterienzahl, Inkubationszeit 24 h
- MRS-Agar (Laktobazillen-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe, Oxoid) zur Bestimmung der Lactobacillaceae, Inkubationszeit 48h
- Sabouraud-Agar (Oxoid) zur Bestimmung von Hefen, Schimmel- und Schwärzepilzen, Inkubationszeit 72 h
- CATC-Agar (Citrat-Azid-Tween-Carbonat Agar, Oxoid) zur Bestimmung der Enterokokkenzahl, Inkubationszeit 72 h
- Neomycin (200 mg/l, Roth, Karlsruhe, Deutschland)/Polymyxin B (100mg/l, Fluka, Basel, Schweiz)–Blut (Rind 10 %ig)–Glukose (5 g/l)-Nähragar 1 (Sifin) zur Bestimmung 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 Nachweisgrenze liegt deutlich unter 2,00 \log_{10} KbE/g. Die Differenzierung fand mittels biochemischer Methoden statt (Harnstoff-Indol-Beweglichkeitsmedium, Sifin; Eisen-Zweifachzucker-Agar nach Kligler, Sifin) sowie mittels MALDI-TOF-MS (siehe 3.2.3).

Die Bestimmung der sporenbildenden Sulfitreduzierer erfolgte mittels des semiquantitativen MPN-Verfahrens (102, 315, 493). Dafür wurden die Proben in einer 1:9 Verdünnung bei

80°C 10 min lang zur Inaktivierung der vegetativen Bakterienformen im Wasserbad erhitzt (428), 20 µl davon in 96er-Kavitäten Mikrotiterplatten (TPP) à drei Wiederholungen um 10er Faktoren ausverdünnt (bis 10^{-8}) und fünf Tage lang anaerob in den vorgelegten 180 µl (je Kavität) DRCM (Clostridien-Differential-Bouillon, Sifin) bebrütet. Die Nachweisgrenze lag bei ca. $2,00 \log_{10}$ Sporen/g.

3.2.2. Inter- und Intraassayvarianzen der Lebendkeimzahlbestimmung

Um die Varianzen der Methode zu bestimmen, wurden *S. aureus* in NB1 kultiviert, zu 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -18°C eingefroren, um an unterschiedlichen Tagen die Lebendkeimzahl in einem 12-fach-Ansatz zu bestimmen. Aus den Mittelwerten und Standardabweichungen wurden die Variationskoeffizienten berechnet:

(Intraassayv.: $\text{Stabw.} \times 100 / \text{Mittelwert}$; Interassayv.: Mittelwert der Intraassayv.)

3.2.3. Gattungs-/ Artbestimmung mittels MALDI-TOF-MS

Mittels MALDI-TOF-MS (Bruker, USA, Billerica) können Mikroorganismen bis zur Spezies differenziert werden. Dafür wird die Bakterienmasse in einer definierten Matrix (α -Cyan-4-hydroxymethylsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit einem Laser beschossen und die frei werdenden (überwiegend ribosomalen) Proteine in einem Massenspektrometer flugzeitabhängig gemessen. Anhand des gemessenen Spektrums ist eine gattungsspezifische Zuordnung möglich, sofern das gemessene Spektrum in einer Datenbank existiert. Potentielle Leitkeime und qualitative Unterschiede in der Bakterienflora in den Fermentationsansätzen wurden mittels MALDI-TOF-MS ermittelt. Das Hersteller-Protokoll wurde dahingehend abgeändert, dass sämtliche Reagenzien halbiert wurden, um eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erzielen. Für die Messung wurden ein oder mehrere Kolonien derselben Morphologie in 150 µl $\text{Aq}_{\text{dest.}}$ aufgenommen und mit 450 µl reinem Ethanol (Roth) versetzt. Nach dem Vermischen und Zentrifugieren (2 min 10.000 g) der Probe wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 25 µl Ameisensäure (Roth) und 25 µl Acetonitril (Roth) versetzt, erneut gemischt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde 1 µl des Überstandes auf eine Kavität der polierten Stahlplatte (MALDI-Target) pipettiert und gemessen.

3.2.4. Mikroorganismen-Populationsanalyse mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE)

Mit Hilfe der Gradientengelelektrophorese ist es möglich, komplexe MO-Populationen zu charakterisieren (330). Der Vorteil bei diesem 1993 von Muyzer vorgestellten Verfahren liegt

in der Detektion von nicht durch klassische Methoden kultivierbaren Spezies. Die aus dem zu untersuchenden Material isolierten und in der PCR amplifizierten DNS-Fragmente unterscheiden sich dabei nicht in der Länge, sondern lediglich in der Sequenz, je nachdem von welcher Spezies aus dem Speziesgemisch der Probe sie gewonnen wurden (329). 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, führt ein hoher GC-Anteil zu einem höheren Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNS als bei einem niedrigeren GC-Anteil. Je nach Sequenz kann es nun entlang des Gradienten früher zur Blasenbildung durch lokales Schmelzen in einem GC-ärmeren Teil des DNS-Fragmentes 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 (330) 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 ggf. einem spezifischen Fragment bestehend, migriert nicht mehr weiter.

3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion PCR

3.2.5.1. Primersequenzen

Das hier verwendete universale Primerpaar 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') ist ein in der Literatur sehr häufig (51, 342, 343, 488, 509) verwendetes Werkzeug, um mikrobiologische Populationen zu untersuchen. Es handelt sich bei diesen Primersequenzen um zwei hochkonservierte Regionen, die in der gesamten Domäne der Bacteria nahezu identisch sind. Als Teilstücke eines Operons kodiert die insgesamt 433 bp lange Sequenz (Nukleotid 968 bis 1401) nur einen Teil der 16 S-RNS, welche wiederum nur ein Teil der kleinen Untereinheit des bakteriellen Ribosomens ist. Zwischen diesen hochkonservierten Regionen der Primer befinden sich die variablen und häufig gattungs- bzw. speziesspezifischen Regionen V6 bis V8 (Nummerierung nach *E.coli* (76)), die das Schmelzverhalten und somit die Bandenauftrennung maßgeblich beeinflussen.

3.2.5.2. Isolierung der DNS

Aus der zur Analyse vorgesehenen Probe wurde die Template-rDNS mit Hilfe des PowerSoil-Kits (MoBio, Carlsbad, USA (CA)) gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert. Zur

Untersuchung wurden jeweils Proben aus der unfermentierten und der fermentierten Matrix gewonnen und bei -18°C gelagert.

3.2.5.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Mastermix für die Reaktionsansätze ist in **Tabelle 7** (Anhang) auf Seite 105 dargestellt. Die Reaktionsgefäße wurden nach Zugabe der Template-rDNS direkt in den Thermocycler (Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland) gegeben und gemäß dem Protokoll der **Tabelle 8** (S. 106) amplifiziert. Der Erfolg der PCR wurde anschließend im horizontalen Agarosegel überprüft. Das Gel wurde aus 2,7 g Agarose (Peqlab, Deutschland, Erlangen) und 150 ml TBE-Puffer (**Tabelle 10**, S. 106) hergestellt und während der Herstellung mit 6 µl Ethidiumbromidlösung (1 %ig, Roth) versehen. 10µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Stopplösung **Tabelle 9** (S. 106) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese fand in einer TBE-Puffer-Wanne (BioRad, München, Deutschland) bei 80 V für 50 min statt. Parallel zu den Proben wurden ein Standard (GenRuler 100 – 3000 bp, Fermentas, ThermoScientific, Waltham, USA (MA)) und eine Negativkontrolle als Mastermix mit Aq_{dest} anstelle des Templates mitgeführt. Lagen die Proben in dem Bereich von 430 bp und war die Negativkontrolle negativ, wurde die PCR als erfolgreich gewertet und das Produkt im Acrylamidgel der TGGE aufgetrennt.

3.2.5.4. Temperaturgradientengel

Das Gel wurde wie in **Tabelle 12** (S. 108) dargestellt, gemischt und im Wasserbad (54°C) erwärmt und regelmäßig geschüttelt. Nach der Abkühlung des Gemisches wurden 40 µl einer 20 %igen APS-Lösung (Roth) sowie 45 µl TEMED (Roth) hinzugegeben, um die Polymerisation zu starten. Sofort nach der Zugabe der Katalysatoren wurde das Gel über einem Sterilfilter (Porengröße 0,44 µm, TPP) in die Gelkassette hineingespritzt, um dort innerhalb von 3 h 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 mit dem TGGE „Maxi“ (Biometra) durchgeführt. Der Temperaturgradient ging dabei von 31 bis 49°C. Die Silberfärbung (**Tabelle 11**) entsprach der Anweisung aus dem Handbuch des TGGEs, wurde jedoch an einigen Punkten modifiziert, wie z. B. in der Dauer der Waschschritte bzw. der Temperatur der Entwickler- und Stopplösung (*schräggedruckt* dargestellt).

3.2.5.5. Standarderstellung

Um Bandenmuster über unterschiedliche Gelelektrophoresen hinweg vergleichen zu können, bedurfte es eines Standardbandenmusters, welches für die spezifischen

Gelelektrophoreseparameter entwickelt werden musste. Dafür wurden aus *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *C. perfringens* und *N. asteroides* der laborinternen Stammsammlung die DNS isoliert, mit dem o. g. Primer amplifiziert und mit Hilfe der TGGE aufgetrennt. Je nach Bandenzahl, Wiedererkennung und Praktikabilität wurde dann ein Standardmuster ausgewählt.

3.2.5.6. Gelauswertung, Clusteranalyse

Nach der Entwicklung wurde das Gel mit einem Flachbettscanner (Canon Lide 110, Japan, Tokio) eingescannt, mit Gelcompare II (Applied Maths, Belgien, Sint-Martens-Latem) korrigiert und ausgewertet. Als Clusteranalyse wurde die UPGMA-Methode (237) gewählt. Die Bandenmustervergleichsanalyse erfolgte mit Hilfe des Koeffizienten nach Dice (125) mit einer Toleranz von 0,9 %.

3.2.5.7. Sequenzanalyse

Nach dem Ausschneiden der Banden mittels Skalpell wurden diese Sequenzen der 16S-rDNS erneut in der PCR amplifiziert. Die DNS-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop 1000, ThermoScientific) bestimmt und im Anschluss daran die Amplifikate durch IZKF der Universität Leipzig sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme Chromas (Technelysium, Australien, South Brisbane) ausgewertet sowie mit BLAST (NCBI, Bethesda, USA (MD)) mit den Sequenzdatenbanken abgeglichen.

3.2.6. Untersuchungen zum Absterbeverhalten ausgesuchter pathogener Bakterien

Um die Hygienisierungsleistung der milchsäuren Fermentation genauer zu untersuchen, wurden Rindergülle und Klärschlamm-Gemische mit Krankheitserregern beimpft. Wie in 3.1. beschrieben, wurden verschiedene Matrizes (**KEM**, **K(EM)_a**, **(KEM)_a**, **(K(EM)_a)_a** und **S_{Pool}**) hergestellt, zu 27 g in 50 ml-Gefäße eingewogen, mit 3 ml Erregersuspension versetzt und bei 37°C 3 Tage fermentiert. Jeder Ansatz hatte mindestens 3 parallele Wiederholungen. Dabei wurden die Matrizes mit Einzel-Erregern und mit verschiedenen Erregerkombinationen gleichzeitig beimpft. Die Erregerkonzentrationen, Stammmummern etc. sind im Ergebnisteil bzw. im Anhang in **Tabelle 13** (S. 108) dargestellt. Um die für die Tenazitätsuntersuchungen vorgesehenen Modellkeime besser von der Begleitflora abgrenzen zu können, wurden gegen Rifampicin und Streptomycin resistente Mutanten selektiert (291, 292). Dazu wurde Standard-Glukose-Nähragar 1 (Sifin) mit Schafblut (5 % ig v/v Oxoid), Rifampicin (300 mg/l Eremfat, Fatol, Deutschland, Schiffweiler) und Streptomycinsulfat (400 wtfmg/l Roth) zur selektiven Anzucht bzw. späteren Differenzierung dieser Erreger kombiniert. Der

Nachweis der selektierten Salmonellen sowie *E. coli* erfolgte mittels Gassner-Agar, der zusätzlich zum enthaltenen Metachromgelb mit Rifampicin und Streptomycin versehen wurde, die Anreicherung erfolgte mittels Preuss-Medium. Die Anzucht von *Mycobacterium fortuitum* erfolgte auf festem CBA-Nährboden, die Kolonien wurden mit 5 ml PBS abgeschwemmt, in 15 ml PBS gegeben und kräftig geschüttelt. Die Suspension wurde bei 3000 g zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen und das Sediment in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, um Agarreste zu entfernen. Für den Nachweis von *Mycobacterium fortuitum* gegenüber der Begleitflora wurde ein antibiotikahaltiger Nährboden zusammengestellt (siehe **Tabelle 16** (S. 116) im Anhang). Die Probenentnahme erfolgte 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 in 10er Schritten die Keimzahl bestimmt.

3.2.7. Untersuchung zur Tenazität von ECBO-Viren

Die Tenazität von ECBO-Viren wurde in den Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** getestet. Dafür wurden 1 cm² große Lindenholzkeimträger mit je 100 µl Virensuspension beimpft, über Nacht inkubiert und in die Matrizes (3 pro 50 ml Reaktionsgefäß) plus 3 ml PBS gegeben, gemischt und anaerob bei 37°C fermentiert. Am 1., 3., 7., 14., und 21. Tag wurden zwei 50 ml-Reaktionsgefäße je Matrix entnommen und die drei Keimträgerplättchen daraus entfernt. Die Keimträger wurden dann bei -80°C eingefroren. Mit Hilfe von Ultraschallwellen wurden die Viruspartikel vom Träger getrennt, steril filtriert und der Virustiter bestimmt. Dafür wurden Faktor-10-Verdünnungsreihen in mit FKL-Zellen (fetale Kälberlungenzellen) beschichteten 96er-Kavitäten-Mikroplatten angelegt. Anhand des zytopathischen Effekts konnte der Virustiter mit Hilfe des 2-reihigen MPN-Verfahrens (vgl. 3.2.1 Seite 26) semiquantitativ ermittelt werden.

3.2.8. Untersuchung zur Tenazität von *Ascaris suum*-Eiern

Die Tenazität von *Ascaris suum* – Eiern wurde in den Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** getestet. Dafür wurden 3 ml einer Eiesuspension mit einer Konzentration von 27.000 Eiern pro ml Leitungswasser in die jeweilige Matrix eingebracht und gerührt. Am 1., 7., 21., und 56. Tag wurden jeweils 3 Proben pro Matrix und Zeitschritt mittels Flotationstechnik untersucht (7). Zu diesem Zwecke wurden die Eier in Leitungswasser resuspendiert, in 6er-Kavitäten-Zellkulturplatten übertragen und bei 25°C für 20 Tage bebrütet. Alle 2 Tage wurden die Platten belüftet und am 20. Tag wurde die Embryonierungsrate mikroskopisch ermittelt. Dafür wurden 300 Eier pro Probe analysiert.

3.2.9. Untersuchung zur Ursache des Absterbeverhaltens bakterieller Erreger

Um den Effekt der mikrobiellen Flora der Matrices zu prüfen, wurde die Keimsuspension (Mix 1 und 2) zum einen in die nativen Matrices **KEM**, **K(EM)_a** und **S_{Pool}** gegeben und zum anderen (Mix 3) in dieselben, jedoch zuvor autoklavierten Matrices **(KEM)_a**, **(K(EM)_a)_a** und **(S_{Pool})_a**. Zeitgleich konnte mit dem Versuchsdesign getestet werden, ob für die Inaktivierung der Erreger die Startkonzentration der Laktobazillen ausschlaggebend ist. Dafür wurden zum in 3.1 beschriebenen Ansatz je 95 ml „Effektive Mikroorganismen“ nativ **KEM** und autoklaviert **K(EM)_a** hinzugegeben. Die Laktobazillenkonzentration vom eingesetzten EM betrug $7 \log_{10} \text{KbE/g}$ und somit verdünnt im Substrat $6 \log_{10} \text{KbE/g}$.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse aus den Rindergülleexperimenten (406) und der Ergebnisse der Experimente der 10 verschiedenen Klärschlämme (407) wurden die Folgeexperimente für die Untersuchung des Erregerabbaus in Klärschlämmen angepasst. Dabei wurde eine Klärschlammatrix **S_{Pool}** mit einer Erregerkonzentration von $7,93 \log_{10} \text{KbE/g}$ *Salmonella* Senftenberg, $8,44 \log_{10} \text{KbE/g}$ *Listeria monocytogenes*, $8,28 \log_{10} \text{KbE/g}$ *Staphylococcus aureus* und $8,17 \log_{10} \text{KbE/g}$ *E. coli* O:157 wie in 3.1 beschrieben hergestellt und für 3 Tage fermentiert. Als Kontrolle fungierte die autoklavierte Matrix **(S_{Pool})_a**.

3.3. Untersuchungen zum Hygienisierungsprinzip für bakterielle Krankheitserreger

3.3.1. Gär säuren- und Laktatbestimmung

Um die Ursachen der Hygienisierung der Matrices bewerten zu können, wurden folgende Parameter im Labor für Veterinär diagnostik und Umwelthygiene GmbH Leipzig-Holzhausen, BioCheck, untersucht: Milchsäure, Essigsäure, Propionsäure, i/n-Buttersäure, i/n-Valeriansäure, n-Caprinsäure, Ethanol, Propanol, Butanol, 2,3 Butandiol, 1,2 Propandiol nach (2) sowie Milchsäure nach (197). Die Probenmenge umfasste 25 g pro Probe, die Beprobung der Matrix **S_{Pool}** fand nach 0 h, 20 h, 47 h 15' sowie 88 h statt.

3.3.2. pH-Wert-Messung (407)

Zur Einschätzung des Fermentationsfortschrittes wurde eine pH-Wert-Bestimmung nach der DIN ISO 10390 durchgeführt. Zur Herstellung der Suspension wurden 20 ml 1M KCl-Lösung verwendet, in die 5 ml des Fermentationsproduktes gegeben wurden. Die Mischung wurde eine Stunde geschüttelt und dann mit dem pH-Meter (Geisinger electronic GPH14) gemessen. Zur Eichung wurden Eichlösungen mit den pH-Werten 4 und 7 verwendet (HI 7004, HI 7007, Hanna Instruments, Kehl, Deutschland).

3.3.3. Eliminierungs- und Substitutionsexperimente der Matrixzusammensetzung

Um die Ursache für den Wechsel der Bakterienflora zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, in denen Komponenten der unter 3.1 beschriebenen Matrix S_{Pool} weggelassen bzw. substituiert wurden. Im ersten Schritt wurde die Weizenkleie geprüft. Dabei gab es eine Kontrollgruppe (Matrix S_{Pool}), die Matrix S_{Pool} ohne Weizenkleie (Matrix $S_{\text{Pool}}\text{-Wk}$) sowie anstelle der Weizenkleie im selben Volumen Sägespäne (Matrix $S_{\text{Pool}}\text{-Wk+Sp}$). Dabei wurden zu Beginn, nach 3 und nach 7 Tagen die Bakterienpopulationen qualitativ und quantitativ untersucht. Jede Gruppe besaß 4 Ansätze. Nach diesem Experiment wurde ein Umkehrexperiment erstellt, bei dem anstelle aller anderen Zuschlagstoffe (Sägespäne, Gesteinsmehl, Bentonit, Holzkohle) lediglich Weizenkleie in dem gesamten Volumen aller Zuschlagstoffe zu den Fäkalien gegeben (Fä+Wk) wurde. Nach 7 Tagen Fermentation wurden die Enterokokkenzahl, die Gram-negative Keimzahl und die Hefen- und Schimmelpilzzahlen bestimmt.

3.3.4. Bioassay zum Nachweis der bakteriziden Effekte der Milch- und flüchtigen Fettsäuren.

Nach den Ergebnissen der Gär- und Milchsäureanalytik (3.3.1) wurden im ersten Versuch die ermittelten Säurekonzentrationen separat und als Gemisch in einer Standard-Nährbouillon 1 (NB1) hinsichtlich Wachstumshemmung von *S. aureus* getestet. Der pH-Wert wurde auf 5,3 eingestellt und die jeweilige NB1 + Additiv zu 5 ml in Reagenzgläser gefüllt (4fach-Ansatz). Die Ausgangskonzentration von *S. aureus* wurde im Doppelansatz bestimmt. Die Säurekonzentrationen sind in **Tabelle 14** (S. 109) im Anhang dargestellt.

In einer weiteren Untersuchung wurde der Einfluss von einer zusätzlichen Ethanolkonzentration von 0,15 % getestet. Die 4990 μl wurden dann mit 10 μl einer *S. aureus*-Suspension ($5,79 \log_{10}\text{KbE/g}$) beimpft. Pro Versuchsgruppe wurden 6 parallele Wiederholungen durchgeführt, die Ausgangskonzentration wurde mit einer vierfachen Bestimmung ermittelt.

3.4. Messung der Gewichtsveränderungen während der Fermentation

Um eventuelle Gewichtsveränderungen während der Fermentationen zu verfolgen, wurden die 50-ml-Reaktionsgefäße mit 27 g Matrix S_{Pool} in einem 6-fach Ansatz vor und nach der Fermentation gewogen (Kern EMB 200-2 $\pm 0,01\text{g}$).

3.5. Statistische Analysen

Die jeweiligen Tests sind mit den jeweiligen Stichprobenzahlen im Ergebnisteil angegeben. Für die Berechnungen wurde das Programm „SPSS Statistics 20“ (IBM, Deutschland, Ehningen) genutzt. Bei Werten unter der Nachweisgrenze von 2,00 bis 3,00 \log_{10} KbE/g wurde stets mit exakt 2 bzw. 3 \log_{10} KbE/g gerechnet, daher konnte im Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov nie eine exakte Signifikanz (2-seitig) von $p < \alpha$ ($\alpha = 0,4$) erreicht werden. Daher konnte kein t-Test verwendet werden. Bei nicht-normalverteilten, verbundenen Stichproben sowie Stichprobenzahlen mit $n \geq 6$, wurde der Wilcoxon-Test für die Berechnung der signifikanten Unterschiede verwendet (siehe 4.2.2, 4.4 und 4.7). Darüber hinaus wurde bei nicht-verbundenen, nicht-normalverteilten Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet (4.6.).

3.6. Fehlerfortpflanzung

Bei dem Vergleich zweier Mittelwerte sollte neben der Standardabweichung der verschiedenen Wiederholungen auch die Intraassayvarianz berücksichtigt werden. Beide Fehler (Standardabweichungen und Assayvarianzen) für einen Wert können näherungsweise mit der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung als die Wurzel aus der Summe der beiden quadrierten Fehler betrachtet werden. Vergleicht man im Folgenden zwei Werte untereinander, wurden dementsprechend 4 Summanden addiert, sofern keine anderen statistischen Verfahren, wie z. B. Wilcoxon- oder Mann-Whitney-U-Test, Anwendung fanden. War der Gesamtfehler aus den 4 Summanden dann größer als die Differenz der beiden gezählten Werte, wird davon ausgegangen, dass keine Unterschiede bestehen.

Während der Diskussion wird für die im Plattenzählverfahren ermittelten Werte stets von der höchsten Intraassayvarianz ausgegangen (0,18 \log_{10} KbE/g, siehe 4.1).

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen eine sehr deutliche quantitative und qualitative Veränderung der bakteriellen Flora während der Fermentation der Matrices. Den Fäkalien zugegebene sowie inhärente Krankheitserreger wurden häufig inaktiviert. Die gemessenen pH-Werte sowie die VFA-Konzentrationen führen allein zu einem bakteriostatischen Effekt, jedoch nicht zu einem bakteriziden. Dafür sind jedoch die Fäkalflora sowie das Vorhandensein von Weizenkleie essentiell für die Inaktivierung von pathogenen Bakterien. Auch die molekularbiologischen Analysen zeigen einen Wechsel der Mikroflora der nicht kultivierten Spezies an, die Heterogenität der Floren nimmt während der Fermentation ab.

4.1. Inter- und Intraassay-Varianzen der Lebendkeimzahlbestimmung

Das häufigste Verfahren zur Ermittlung der quantitativen Daten war die Lebendkeimzahlbestimmung. Aus diesem Grunde wurden die Varianzen der Methode zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Standardabweichung bei der Ermittlung der koloniebildenden Einheiten betrug zwischen 0,15 und 0,18 \log_{10} KbE. Das entspricht einem Variationskoeffizient von 33,11 % bis 70,79 %. Die Interassayvarianz betrug 47,86 %.

4.2. Populationsanalysen im Verlauf der Fermentation

4.2.1. Quantitative Bakteriologische Untersuchungen

4.2.1.1. Rindergüllematrices

4.2.1.1.1. Matrix K

Abbildung 7 stellt die Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Rindergüllematrix **K** von Tag 21 dar. Die aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) sinkt nach 3 Wochen Fermentation deutlich um über 90 %. Gram-negative MO sind nach 3 Wochen Fermentation nicht mehr nachweisbar. Ähnlich verhält es sich bei den Enterokokken. Die anaerobe GKZ unterliegt starken Schwankungen, was sich in der Standardabweichung niederschlägt. Im Mittel jedoch sinkt die Konzentration innerhalb der 3 Wochen, wenngleich auch nicht so stark wie die aerobe GKZ. Die Konzentration der *Lactobacillaceae* hingegen steigt stark an und liegt nach drei Wochen nahezu gleichauf mit der anaeroben GKZ bei gleichzeitig ähnlichen Standardabweichungen. Die Konzentration der Hefe- bzw. Schimmelpilze sowie Clostridien liegt unter der Nachweisgrenze von 3,00 \log_{10} KbE/g.

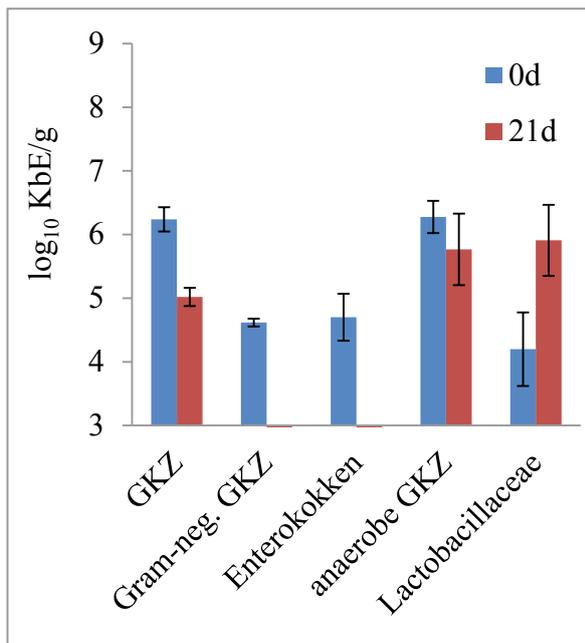


Abbildung 7: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Matrix **K** von 21 Tagen (GKZ: Gesamtkeimzahl)

4.2.1.1.2. Matrices **KEM** und **K(EM)_a**

Abbildung 8 und **Abbildung 9** stellen die Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Matrices **KEM** und **K(EM)_a** zu Beginn, nach 21 und 56 Tagen dar. Damit sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Abhängigkeit einer zusätzlichen Laktobazillenquelle gezeigt werden. Die aeroben Gesamtkeimzahlen (GKZ) fallen nach den ersten 3 Wochen Fermentation sehr stark ab und sinken nach weiteren 5 Wochen etwas weiter, jedoch deutlich geringer als im ersten und kürzeren Zeitabschnitt. Gram-negative MO sind bereits nach 3 Wochen in keiner der beiden Matrices nachweisbar. Ähnlich verhält es sich bei den Enterokokken sowie bei den Hefe- bzw. Schimmelpilzen. Die anaeroben GKZ sinken in den ersten 3 Wochen der Fermentation sehr stark und in den nachfolgenden 5 Wochen geringfügig weiter. Die Konzentration der *Lactobacillaceae* sank während der ersten 3 Wochen Fermentation sehr stark, in **KEM** sogar stärker als in **K(EM)_a**. Nach 5 weiteren Wochen stieg sie in Matrix **KEM** wieder und in Matrix **K(EM)_a** fiel sie leicht auf eine insgesamt vergleichbare Konzentration.

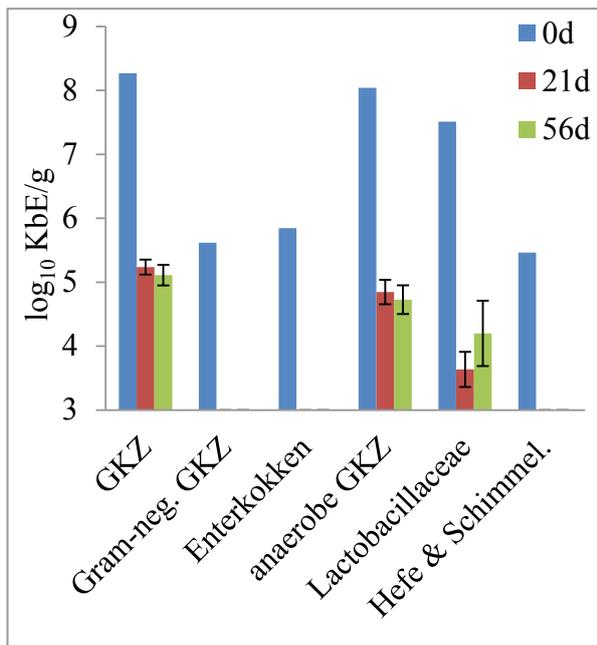


Abbildung 8: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Matrix **KEM**, im Verlauf von 56 Tagen (GKZ: Gesamtkeimzahl)

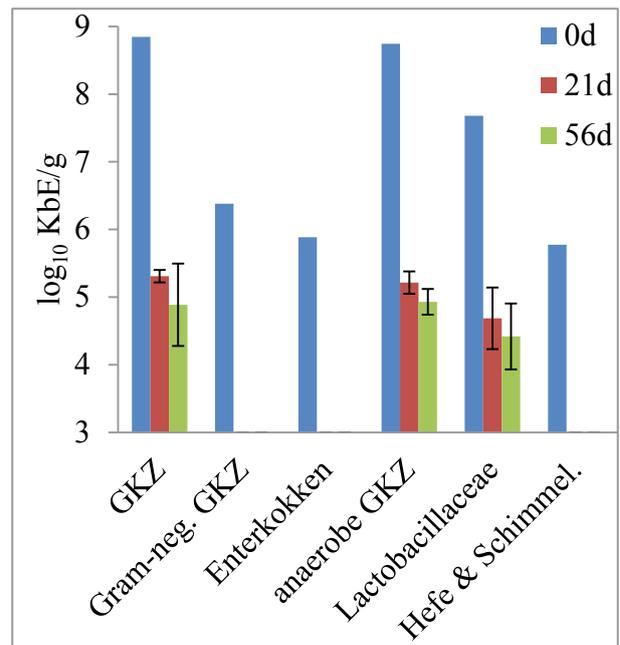
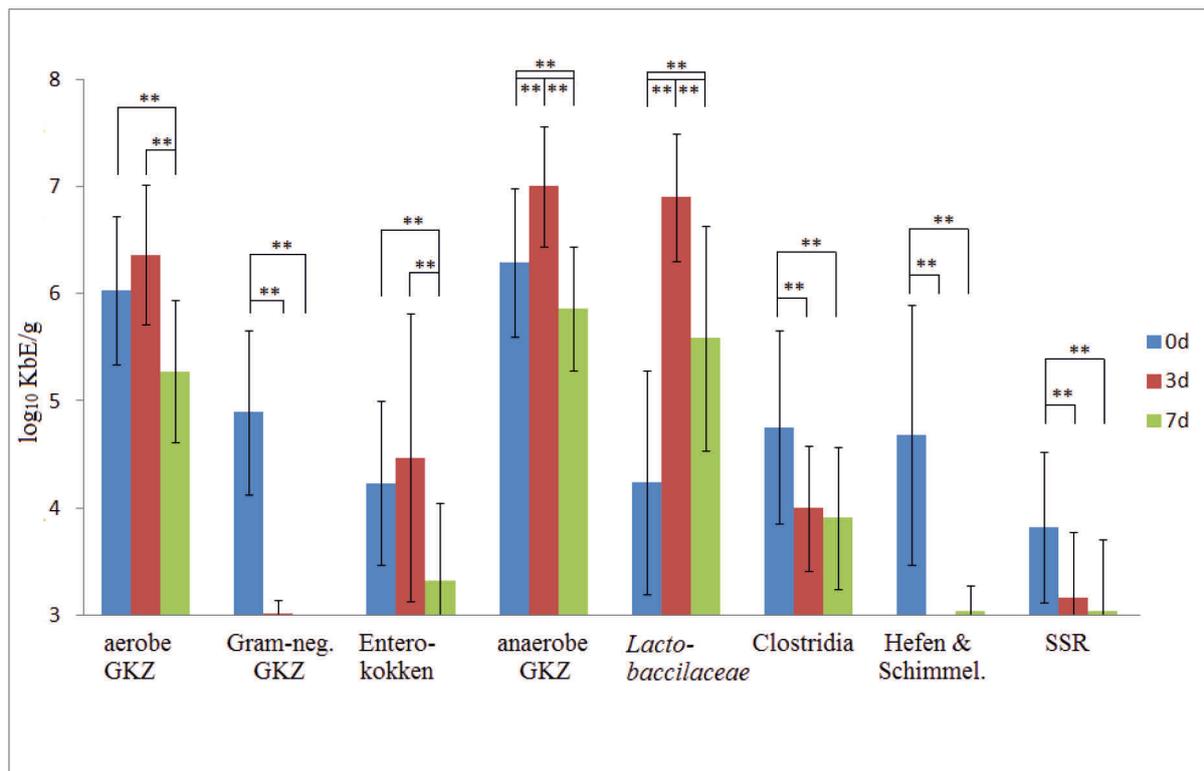


Abbildung 9: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter der Matrix **K(EM)_a**, im Verlauf von 56 Tagen (GKZ: Gesamtkeimzahl)

4.2.2. Klärschlammtrizes S

Abbildung 10 stellt die Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter aller 10 Klärschlämme (Matrix **S**) im Verlauf von 7 Tagen dar. Die Werte der einzelnen Schlämme sind im Anhang ab Seite 116 dargestellt. Die aerobe Gesamtkeimzahl steigt nach dreitägiger Fermentation leicht, um dann zu Tag 7 stärker zu sinken. Dabei unterscheidet sich die GKZ von Tag 7 signifikant von Tag 3 und Tag 0. Tag 0 und Tag 3 hingegen unterscheiden sich nicht signifikant in der GKZ. Die Gram-negative GKZ sinkt bereits nach 3 Tagen signifikant auf 3,02 (0,12) \log_{10} Kbe/g, um dann nach 7 Tagen unter die Nachweisgrenze zu sinken. Dabei führte ein Einzelfund am Tag 3 zu einem Mittelwert der über der Nachweisgrenze liegt, Tag 7 und Tag 3 hingegen unterscheiden sich dabei nicht signifikant voneinander. Die Konzentration der Enterokokken steigt nach 3 Tagen im Durchschnitt nur leicht, jedoch steigt die Standardabweichung enorm im Zuge der sehr unterschiedlichen Ergebnisse der jeweiligen Schlämme. Nach 7 Tagen sinkt sie stark bei einer sich deutlich verringernden Standardabweichung. Diese starke Dynamik konnte erst mit kürzeren Probeentnahmeintervallen entdeckt werden. Die kürzeren Intervalle wurden auf Grund der überraschend kurzen Überlebenszeit der pathogenen Bakterien (4.3, Seite 41 ff.) gewählt. Die Enterokokkenkonzentration unterscheidet sich an Tag 7 signifikant von Tag 3 und Tag 0. Tag 0 und Tag 3 hingegen unterscheiden sich nicht signifikant. Die mittlere anaerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) steigt während der drei Tage Fermentation an, um dann zu Tag 7

wieder zu sinken. Dabei unterscheiden sich die anaeroben Gesamtkeimzahlen an allen Tagen signifikant voneinander. Ähnliches lässt sich bei den *Lactobacillaceae* beobachten, nach drei Tagen Fermentation steigt die Konzentration sehr stark an, um dann zu Tag 7 wieder zu sinken. Dabei unterscheidet sich auch die Konzentration der *Lactobacillaceae* an allen Tagen signifikant voneinander. Deutlich höher sind aber zu Beginn und nach 7 Tagen die Standardabweichungen im Vergleich zur anaeroben GKZ. Ähnlich wie bei den Enterokokken ist eine starke Dynamik der Konzentrationen in den ersten 7 Tagen der Fermentation zu beobachten. Nach 3 Tagen sinkt die Konzentration der Clostridien signifikant sowie nach 7 Tagen etwas weiter, jedoch unterscheiden sich die beiden letzteren Zählungen nicht signifikant voneinander. Die Konzentration der Hefe- und Schimmelpilze sinkt bereits nach 3 Tagen sehr stark unter die Nachweisgrenze von $3,00 \log_{10}$ KbE/g. Nach 7 Tagen wurde eine Probe positiv getestet mit einer Konzentration von $4,46 \log_{10}$ KbE/g, was eine Gesamtkonzentration von $3,04(0,24) \log_{10}$ KbE/g ergab. Dabei unterscheidet sich die Hefen- und Schimmelpilzkonzentration von Tag 7 und Tag 3 signifikant von Tag 0. Tag 7 und Tag 3 hingegen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in der Pilzkonzentration. Parallel zur Clostridienzahl sinkt die Konzentration der sporenbildenden Sulfitreduzierer bereits nach 3 Tagen signifikant sowie nach 7 Tagen leicht, nicht signifikant, weiter. Das Signifikanzniveau lag bei allen angegebenen signifikanten Unterschieden bei $p < 0.01$, die Stichprobenzahl betrug $n_{0d}=40$, $n_{3d}=36$, $n_{7d}=36$.



** = $p < 0.01$, $n_{0d}=40$, $n_{3d}=36$, $n_{7d}=36$, (Wilcoxon test).
 Balken = Standardabweichung GKZ = Gesamtkeimzahl SSR = sporenbildende Sulfidreduzierer

= Signifikanz: A vs. B; = Signifikanz: A vs. C (jedoch nicht B vs C)
 = Signifikanz: A vs. B; B vs. C und A vs. C

Abbildung 10: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter aller 10 Klärschlämme (Matrix S), im Verlauf von 7 Tagen. ** = $p < 0,01$, $n_{0d} = 40$, $n_{3d} = 36$, $n_{7d} = 36$, (Wilcoxon-Test). SSR = sporenbildende Sulfidreduzierer; GKZ: Gesamtkeimzahl.

4.2.3. Qualitative bakteriologische Untersuchung

4.2.3.1. Rindergüllematrix K

Nach der Bestimmung der quantitativen Parameter wurden die qualitativen auf Speziesebenen erfasst. **Abbildung 11** sowie **Abbildung 12** stellen exemplarisch die aeroben GKZ der Matrix **K** vor und nach 3-wöchiger Fermentation dar. Die Sektoren entsprechen den im Uhrzeigersinn aufsteigenden Verdünnungsstufen (Faktor 10). Auf 9 Uhr befindet sich die Verdünnungsstufe 10^{-3} , auf 12 Uhr 10^{-4} etc. Neben dem Absinken der GKZ um eine Logarithmusstufe fällt insbesondere auch die Veränderung im Keimspektrum auf, wie auch aus **Tabelle 2** ersichtlich wird. Das gesamte ermittelte Keimspektrum vor und nach 3-wöchiger Fermentation von Matrix 1 ist im Anhang ab Seite 125 in **Tabelle 17** zu finden. Dabei ist festzustellen, dass alle nicht sporenbildenden Mikroorganismen mit Ausnahme der *Lactobacillaceae* nach der Fermentation nicht mehr nachweisbar sind. Potentielle,

fäkalinhärente Krankheitserreger wie z. B. *Aerococcus viridans* (14), *E. coli*, *Enterobacter amnigenus* (106), *Pantoea agglomerans* (109), *Providencia rettgeri* (502) werden im Zuge der Fermentation degradiert. Generell nimmt die ermittelte Spezieszahl ab, die der Familie *Lactobacillaceae* hingegen nimmt zu.

Tabelle 2: aerobe Keimspektren von Matrix **K** vor und nach Fermentation

Bakterienspezies vor Fermentation	Bakterienspezies nach 3-wöchiger Fermentation
1.) <i>Corynebacterium casei</i>	1.) <i>Bacillus licheniformes</i>
2.) <i>Staphylococcus fleurettii</i>	2.) <i>Bacillus pumilus</i>
3.) <i>Aerococcus</i> spp.	3.) <i>Brevibacillus agri</i>
4.) <i>Bacillus pumilus</i>	4.) <i>Bacillus pumilus</i> (ohne β -Hämolyse)
5.) <i>Bacillus licheniformes</i>	
6.) <i>E. coli</i>	
7.) <i>Mucor</i> spp.	

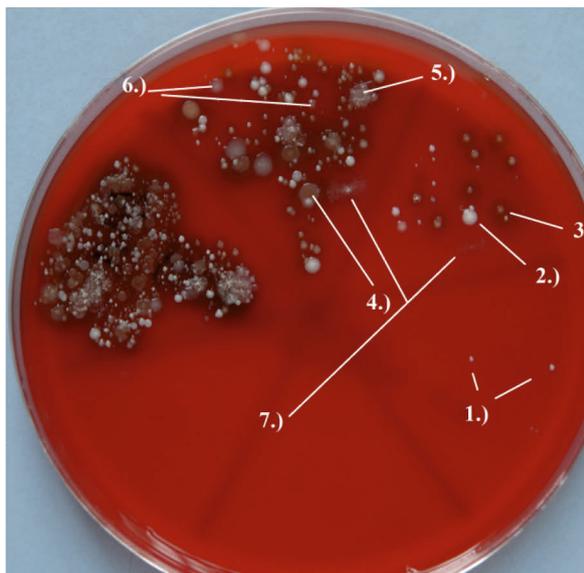


Abbildung 11: Blutagarplatte, aerobe Gesamtkeimzahl, Matrix **K** vor Fermentation

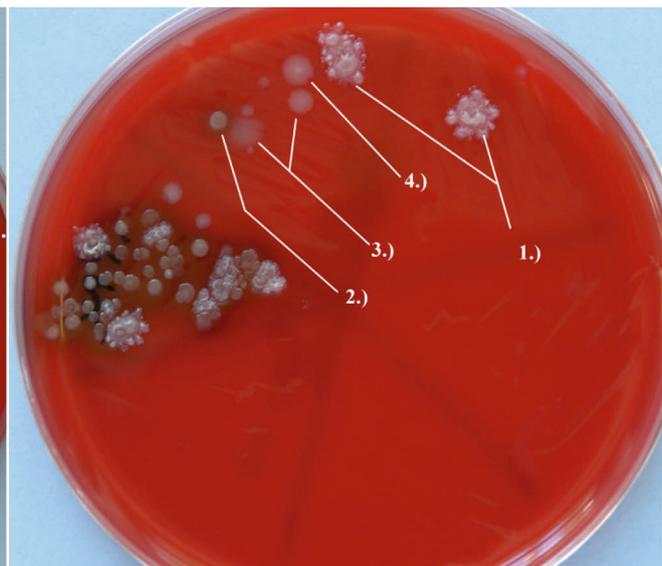


Abbildung 12: Blutagarplatte, aerobe Gesamtkeimzahl, Matrix **K** nach 3 Wochen Fermentation

4.2.3.2. Klärschlammatrix **S**

Dieser Abschnitt stellt die qualitativen Daten der Klärschlammatrixes auf Gattungsebene dar. Die Spezies im Detail bewertet sind im Anhang in **Tabelle 19** auf Seite 127 ff zu finden.

Parallel zu der Beobachtung aus Matrix **K** (siehe 4.2.3.1) nimmt die absolute Spezieszahl während der Fermentation ab. Alle ermittelten Arten der Gattung *Acinetobacter*, *Candida*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces* und *Staphylococcus* sowie der Familie der

Enterobacteriaceae werden innerhalb der ersten drei Tage bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Die Artenzahl bzw. die Keimzahl der Gattung *Enterococcus* nimmt ebenso bereits zum 3. Fermentationstag deutlich ab. Die einzige Ausnahme jedoch bildet *Enterococcus faecium*, die Konzentration dieser Enterokokkenspezies nimmt in nahezu allen gemessenen Proben stark zu, mit Ausnahme der Klärschlämme (KS) 5 und 7, dort sinkt sie leicht bzw. bis unter die Nachweisgrenze. Zum 7. Fermentationstag sinkt die Konzentration in allen Klärschlämmen, in KS 1, 5 und 6 auch unter die Nachweisgrenze von $3 \log_{10}$ KBE/g. Die Keimzahlen der beiden Arten der Gattung *Pediococcus* nehmen stark zum 3. Fermentationstag zu, um zum 7. Tag wieder abzusinken. Die nachweisbare Artenzahl der Gattung *Lactobacillus* steigt von zu Beginn 8 Arten auf 11 bzw. 12 Arten an, nach 3 bzw. 7 Tagen Fermentation. Parallel zu den Keimzahlen der Gattung *Pediococcus* steigen bzw. sinken die Keimzahlen der Gattung *Lactobacillus* zum 3. bzw. 7. Tag, wie auch in **Abbildung 10** für alle *Lactobacillaceae* dargestellt. Während die Keimzahl der Clostridien generell während der Fermentation sinkt, kann ein Anstieg von *C. bifermentans* in einer Probe sowie von *C. clostridioforme* in 2 Proben festgestellt werden. *Clostridium paraputrificum* konnte besonders häufig am 3. Fermentationstag nachgewiesen werden. Für KS 1 liegen keine Befunde für den 3. Tag vor.

4.3. Hygienisierung von pathogenen Bakterien in den verschiedenen Matrices

4.3.1. Hygienisierung von pathogenen Bakterien in den Rindergülle-Matrices **KEM** und **K(EM)_a**

4.3.1.1. Tenazität von pathogenen Bakterien

Zum Startzeitpunkt der Untersuchungen zur Inaktivierung bakterieller Krankheitserreger in Rindergülle konnte eine pathogene Gesamtkeimzahl von $8,27 \log_{10}$ KBE/g gezählt werden. Diese setzte sich zusammen aus $7,99 \log_{10}$ KBE/g *Listeria monocytogenes*, $7,74 \log_{10}$ KBE/g *Staphylococcus aureus*, $7,40 \log_{10}$ KBE/g *E. coli* O:157 und $6,86 \log_{10}$ KBE/g *Salmonella* Anatum. Bereits nach 72 h Stunden sanken die Keimzahlen unter die Nachweisgrenze von $3,00 \log_{10}$ KBE/g, wie es in **Abbildung 13** zu erkennen ist. Auch im Direktausstrich konnten keine pathogenen Erreger gefunden werden. Zudem konnten keine wesentlichen Unterschiede in den Einflüssen auf die Erreger zwischen den unterschiedlichen Matrices **KEM** und **K(EM)_a** festgestellt werden, daher wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet (406). Als Nebenbefund konnte festgestellt werden, dass sämtliche Gram-negativen Bakterien sowie Hefe- und Schimmelpilze innerhalb von 3 Tagen unter die Nachweisgrenze degradiert wurden. Wie in **Abbildung 14** dargestellt, ist ein Absterben von *S. Senftenberg* von den

anfänglich $7,98 \log_{10}\text{KbE/g}$ bis unter die Nachweisgrenze nach 3 Tagen Fermentation zu beobachten. Der Erreger konnte auch mittels Anreicherung nach Preuss nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Animpfmengung von *Mycobacterium fortuitum* wurde mit einer Konzentration von $7,93 (0,06) \log_{10} \text{KbE/g}$ ermittelt, wie in **Abbildung 15** dargestellt. Die Differenz derselben Suspension auf dem speziell supplementierten Mykobakteriennährboden betrug $0,64 (0,15) \log_{10} \text{KbE/g}$, was auf einen suppressiven Effekt der Antibiotika deutet. Die Wiederfindungsrate konnte auf Grund des starken Konkurrenzdruckes der Begleitflora am Tag 0 auch mit dem supplementierten Nährboden nicht bestimmt werden. Mit dem Abfall des Konkurrenzdruckes konnte die Nachweisgrenze bereits nach 3 Tagen für den Mykobakterien-NB auf die methodische Nachweisgrenze von $3,00 \log_{10} \text{KbE/g}$ reduziert werden. Der unsupplementierte CBA hingegen hatte weiterhin eine recht hohe Nachweisgrenze mit abnehmender Standardabweichung von $5,60(0,89 \text{ bzw. } 0,55) \log_{10} \text{KbE/g}$. Die Konzentration von *Mycobacterium fortuitum* lag stets unter der jeweiligen abgebildeten Nachweisgrenze.

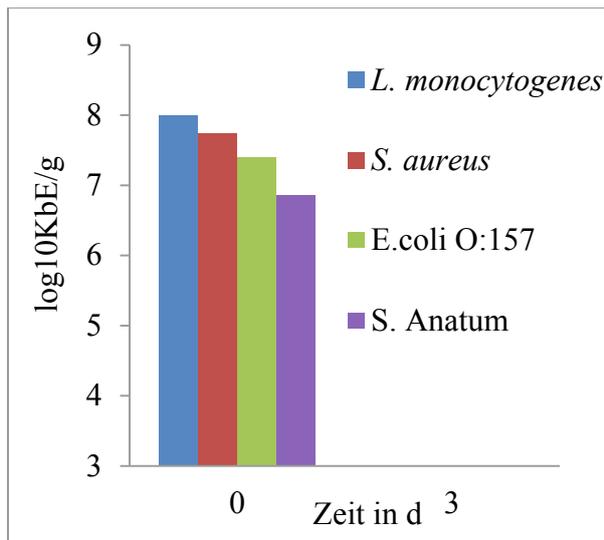


Abbildung 13: Tenazität von pathogenen Bakterien in den Matrizes K(EM)a im Verlauf von 3 Tagen

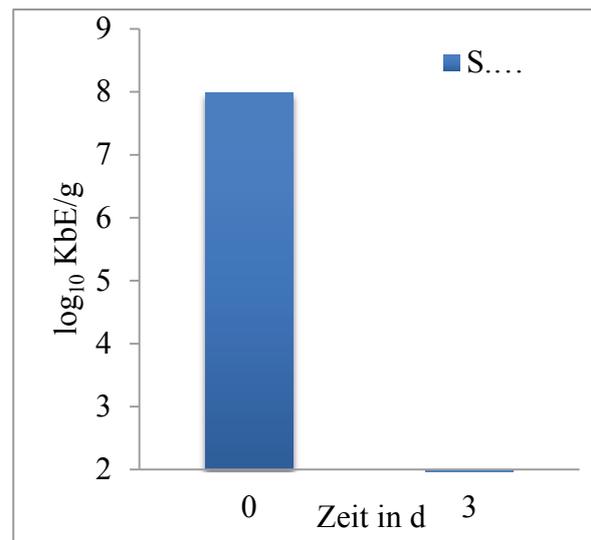


Abbildung 14: Tenazität von *Salmonella* Senftenberg in den Matrizes K(EM)a im Verlauf von 3 Tagen

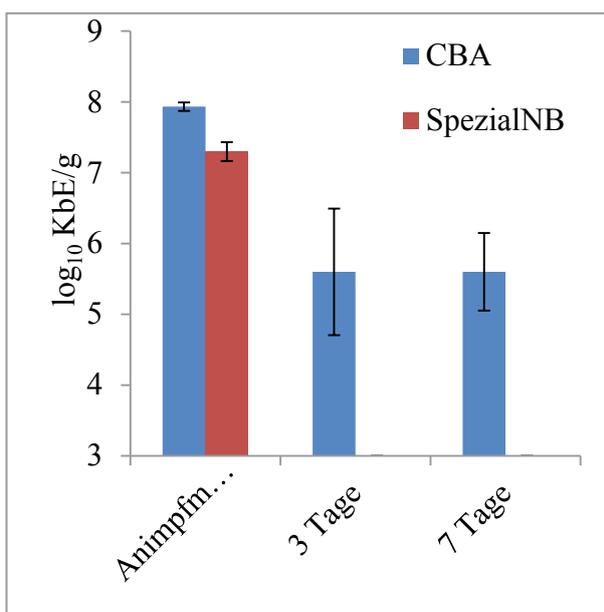


Abbildung 15: Tenazität von *Mycobacterium fortuitum* in den Matrix K im Verlauf von 7 Tagen.

Alle Werte, nebst der Animpfmenge, sind als „kleiner als“ zu lesen. Dargestellt sind de facto nur die Nachweisgrenzen auf Grund der konkurrierenden Begleitflora.

4.3.1.2. Tenazität von pathogenen Bakterien in autoklavierten Matrizes

In **Abbildung 16** werden die Tenazitäten von Erregern in den Matrizes KEM und (KEM)_a gegenübergestellt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Abhängigkeit einer zusätzlichen Laktobazillenquelle zu zeigen. Während zu Beginn die mittlere Konzentration von *L. monocytogenes* in Matrix KEM bzw. (KEM)_a ähnlich ist, fällt sie in Matrix KEM nach 3 Tagen Fermentation unter die Nachweisgrenze von 2,00 log₁₀ KbE/g. In Matrix (KEM)_a steigt sie jedoch an. Während zu Beginn die mittlere Konzentration von *E. coli* O:157 in den beiden Matrizes ähnlich hoch ist, sinkt sie während der Fermentation in Matrix KEM unter die

Nachweisgrenze von $2,00 \log_{10} \text{KbE/g}$, wohingegen sie in Matrix $(\text{KEM})_a$ nahezu unverändert hoch bleibt. Anders verhält es sich bei den mittleren Konzentrationen von *C. perfringens*, die in Matrix KEM bzw. $(\text{KEM})_a$ zu Beginn der Fermentation noch relativ ähnlich sind. Nach drei Tagen jedoch sinkt sie in Matrix KEM unter die Nachweisgrenze von $2,00 \log_{10} \text{KbE/g}$. Auch in $(\text{KEM})_a$ sinkt die Konzentration, wenngleich stark, nicht unter die Nachweisgrenze. Bei gleicher Animpfmenge sinkt die Konzentration in Matrix $(\text{K}(\text{EM})_a)_a$ jedoch wesentlich weniger und unterscheidet sich in lediglich diesem Parameter deutlich von Matrix $(\text{KEM})_a$; hingegen verhalten sich alle anderen Erreger in Matrix $(\text{KEM})_a$ und $(\text{K}(\text{EM})_a)_a$ ähnlich. Während zu Beginn die mittleren Konzentrationen von *Salmonella* Senftenberg in Matrix KEM bzw. $(\text{KEM})_a$ einander relativ ähnlich sind, fallen sie in Matrix KEM nach 3 Tage Fermentation unter die Nachweisgrenze bzw. sinken sie in Matrix $(\text{KEM})_a$ nur unwesentlich. Vor der Fermentation waren sich die mittleren Konzentrationen von *Staphylococcus aureus* in den Matrices KEM bzw. $(\text{KEM})_a$ sehr ähnlich, nach 3 Tagen Fermentation ähnelten die Konzentrationen jedoch eher denen von *C. perfringens*. Während die Erreger in der Fäkalflora-Matrix inaktiviert werden, sinkt die Konzentration in der autoklavierten Matrix lediglich. Vollkommen unabhängig von der Matrix verhält sich jedoch *Clostridium sporogenes*. Die Konzentration des Modellorganismus bleibt unverändert während der milchsauen Fermentation.

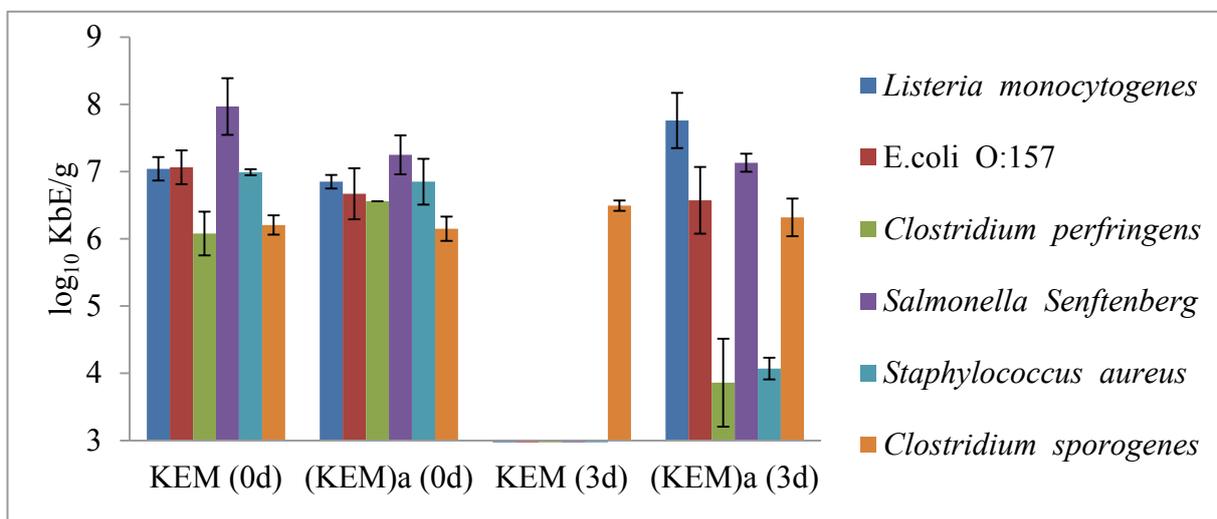


Abbildung 16: Tenazität von pathogenen Bakterien in den Matrices **KEM** und **(KEM)_a** im Verlauf von 3 Tagen

4.3.1.3. Tenazität von ECBO-Viren

Die Tenazität von ECBO während der Fermentation in den Matrices **KEM** und **(KEM)_a** wird in **Abbildung 17** dargestellt. Zu Beginn der Fermentation konnte ein Virustiter von $5,49 \log_{10} \text{CPE/ml}$ auf den Keimträgern nachgewiesen werden. Dieselbe Konzentration konnte auch

nach dem Mischen der Keimträger in der jeweiligen Matrix quantifiziert werden. Nach drei Tagen sank die Konzentration der Partikel auf den Keimträgern aus **KEM** deutlich schwächer als in der Matrix **K(EM)_a**. Nach 7 Tagen lag die Konzentration auf den Keimträgern in Matrix **KEM** knapp über der Nachweisgrenze, in der Matrix **K(EM)_a** bereits unter der Nachweisgrenze von 3,00 log₁₀ CPE/ml. Nach insgesamt 14 Tagen lag in beiden Matrices der Virustiter unter der Nachweisgrenze.

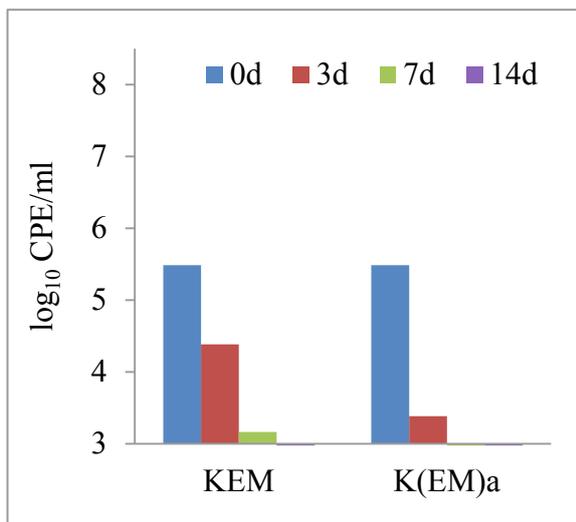


Abbildung 17: Tenazität von ECBO-Viren in den Matrices **KEM** und **K(EM)_a** im Verlauf von 14 Tagen

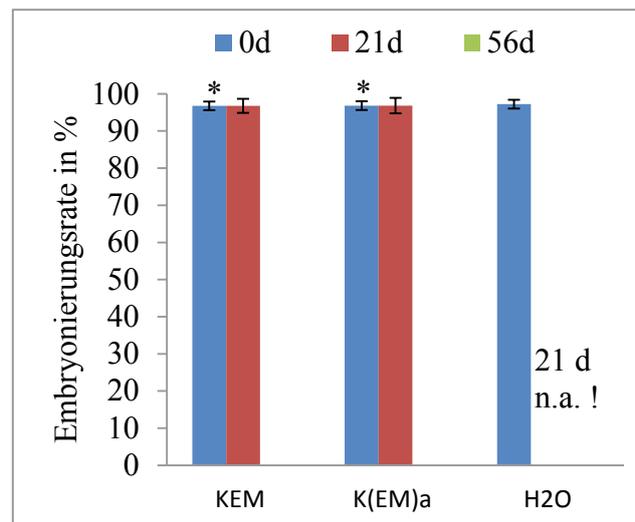


Abbildung 18: Tenazität von *Ascaris suum* Eiern in den Matrices **KEM** und **K(EM)_a** und Wasser im Verlauf von 56 Tagen (* = extrapolierte Daten, für Wasser sind keine Daten für Tag 21 verfügbar)

4.3.1.4. Tenazität von *Ascaris suum*-Eiern

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Tenazität von *Ascaris suum* Eiern zeigt **Abbildung 18**. Zu Beginn beträgt die Embryonierungsrate 97,2 (1,17) %. Während die Embryonierungsrate am Tag 21 in Matrix **KEM** und **K(EM)_a** nahezu unverändert bleibt, fällt sie innerhalb von 56 Tagen Bebrütung in beiden Matrices sowie in Leitungswasser auf eine Rate von 0 % ab.

4.3.2. Hygienisierung von pathogenen Bakterien in Klärschlamm-matrices

Abbildung 19 stellt die Tenazität von bakteriellen Erregern in den Klärschlamm-matrices **S_{Pool}** und **(S_{Pool})_a** gegenüber. Dabei lassen sich Parallelen zu den Versuchen unter 4.3.1.2 auf Seite 43 entdecken. Alle unversporteten pathogenen Bakterien werden in der unbehandelten Matrix inaktiviert, wohingegen die gleichen MO in der sterilisierten Matrix weit oberhalb der Nachweisgrenze verweilen. Auf Grund des klärschlamm-inhärenten *Clostridium perfringens* (siehe **Abbildung 10** S. 39 und **Tabelle 19** S. 127 ff) wurden keine zusätzlichen Clostridien in die Matrices gegeben.

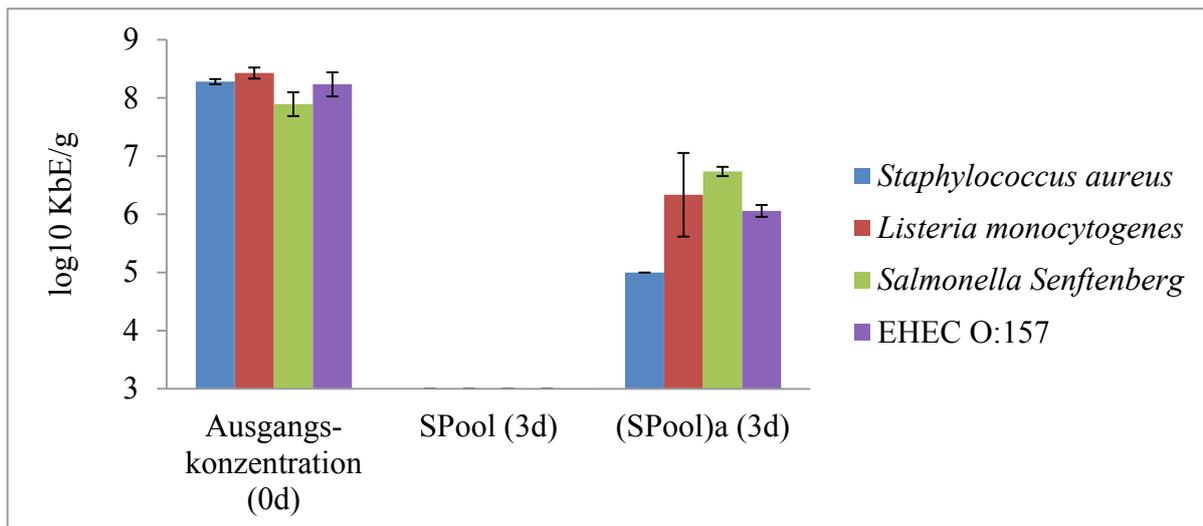


Abbildung 19: Tenazität von pathogenen Bakterien in den Matrizes S_{Pool} und $(S_{\text{Pool}})_a$ im Verlauf von 3 Tagen

4.4. pH-Wert Messungen

Um naheliegende Ursachen für den Hygienisierungsprozess zu finden, wurde unter anderem der pH-Wert bestimmt. Wie in **Abbildung 20** zu erkennen, sinkt während der Fermentation der Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** der pH-Wert deutlich nach 21 Tagen, in **KEM** sogar stärker. Nach insgesamt 56-tägiger Fermentation liegt er in beiden Matrizes auf ähnlichem Niveau. **Abbildung 21** hingegen stellt die pH-Werte nach 3 Tagen dar. Zudem wurden die pH-Wertänderungen der autoklavierten Matrizes mitefassen. Zu Beginn der Fermentation waren die pH-Werte der Matrizes **KEM**, **K(EM)_a**, **(KEM)_a** und **(K(EM)_a)_a** nahezu identisch. Nach der Fermentation sanken die pH-Werte in den Matrizes **KEM**, **K(EM)_a** deutlich und erneut stärker bei **KEM**, jedoch nicht in **(KEM)_a** und **(K(EM)_a)_a**. In **Abbildung 22** hingegen ist die Veränderung des pH-Wertes von Matrix **S** nach 7 Tagen dargestellt. Die dargestellten Mittelwerte wurden aus allen 10 Schlämmen bestimmt. Vor der Fermentation liegt der pH-Wert der Klärschlamm matrizes auf ähnlichem Niveau wie alle Matrizes auf Rindergüllebasis, nach der 7-tägigen Fermentation hingegen auf ähnlichem Niveau wie **K(EM)_a** nach 3 tägiger Fermentation.

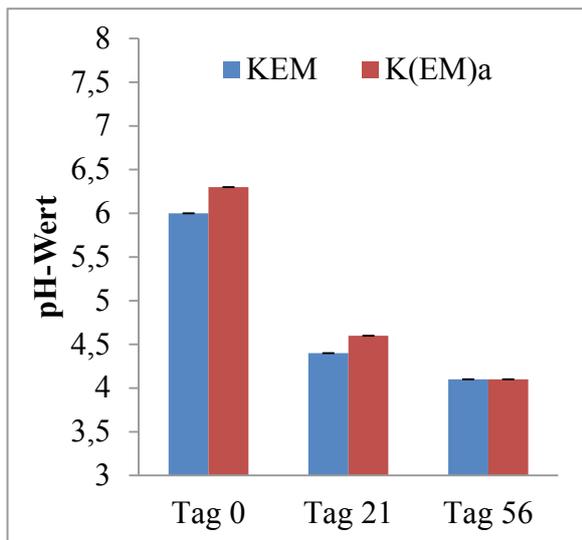


Abbildung 20: Änderung der pH-Werte der Matrices **KEM** und **(KEM)_a** an Tag 0, 21 und 56

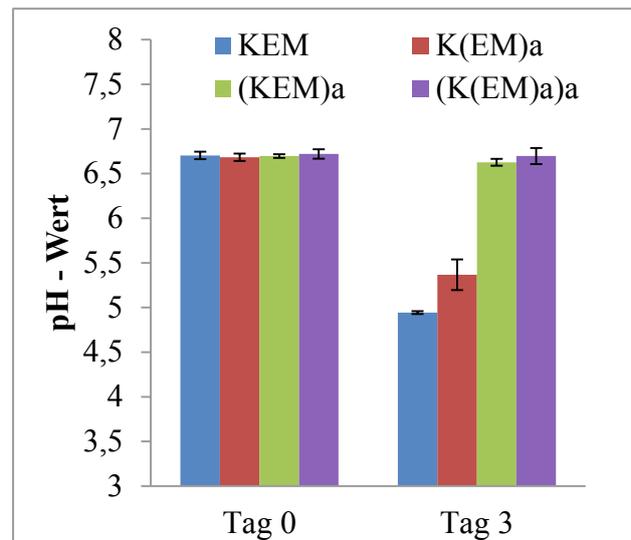


Abbildung 21: Änderung der pH-Werte der Matrices **KEM**, **K(EM)_a**, **(KEM)_a** und **(K(EM)_a)_a** an Tag 0 und 3

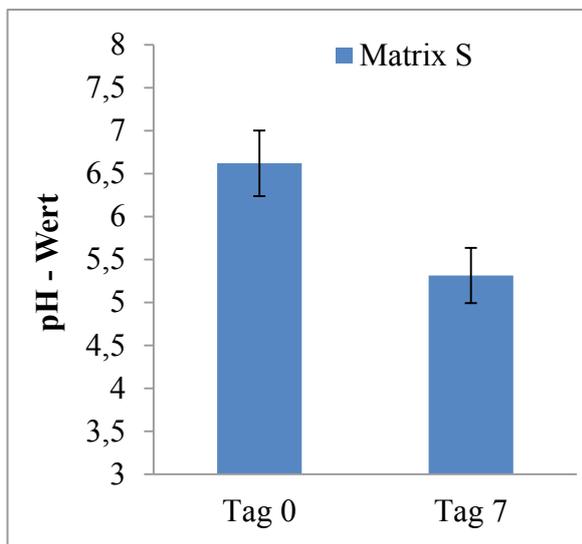


Abbildung 22: pH-Wert, Matrix **S** an Tag 0 und 7
 $p < 0,01$, $n_{0d}=40$, $n_{7d}=36$, (Wilcoxon- Test)

4.5. Gärsäuren- und Laktatbestimmungen

Neben dem pH-Wert wurden auch VFA und Laktatkonzentrationen zur Ursachenfindung analysiert. **Tabelle 3** stellt die mittleren Konzentrationsveränderungen der Milch- und Gärsäuren über 3 Tage und 16 Stunden in Matrix **S_{Pool}** dar. Dabei nehmen alle Werte bis auf die Propionsäure, die i-Buttersäure sowie die Valeriansäure stark zu, während die zuletzt genannten Säuren leicht in ihrer Konzentration abnehmen. Die n-Caprinsäure bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum unter der Nachweisgrenze.

Tabelle 3: Mittlere Konzentrationen (Standardabweichungen) der Milch- und Gär-säureanalytik in Matrix SPool zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Zeitpunkt Säuren	0 h in g/kg	20 h in g/kg	47 h, 15' in g/kg	88 h in g/kg
Essigsäure	0,860 (0,122)	3,823 (0,170)	4,170 (0,131)	4,603 (0,424)
Propionsäure	1,320 (0,139)	1,120 (0,046)	1,083 (0,061)	1,033 (0,136)
i-Buttersäure	0,071 (0,002)	0,067 (0,001)	0,066 (0,001)	0,064 (0,004)
n-Buttersäure	0,105 (0,014)	1,250 (0,164)	1,187 (0,120)	1,173 (0,138)
i-Valeriansäure	0,091 (0,003)	0,083 (0,003)	0,083 (0,001)	0,078 (0,007)
n-Valeriansäure	0,073 (0,007)	0,074 (0,002)	0,068 (0,004)	0,064 (0,006)
n-Caprionsäure	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Milchsäure	4,900 (1,658)	9,833 (0,404)	12,167 (0,058)	12,467 (0,709)

4.6. Bioassay zum bakteriziden Effekt der Milch- und flüchtigen Fettsäuren (VFA)

Um den Effekt der gemessenen chemischen Parameter zu bewerten, wurden Bioassays durchgeführt. **Abbildung 23** stellt die mittlere Konzentration von *S. aureus* in Abhängigkeit der verschiedenen Supplemente nach 3-tägiger Bebrütung dar. Während zu Beginn des Versuches die Konzentration von *S. aureus* im Mittel bei $3,09 \log_{10} \text{KbE/g}$ lag, stieg sie nach 3 Tagen Bebrütung in fast allen Nährlösungen enorm an. Deutlich geringer fiel der Konzentrationsanstieg bei dem Supplement Essigsäure aus und auch das VFA Gemisch 1 aus allen Supplementen führte zu einem geringeren Konzentrationsanstieg. Dabei unterschied sich die NB1 mit dem VFA Supplementgemisch von der Essigsäure nicht signifikant, obgleich eine deutliche Tendenz erkennbar war. (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,057$, $n = 4$)

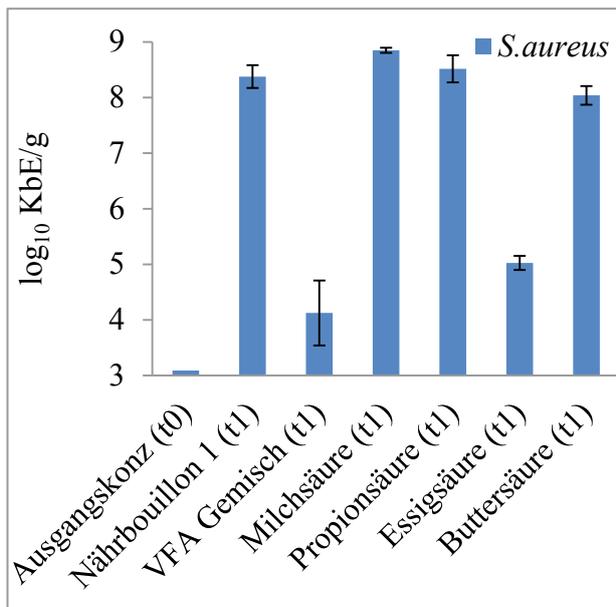


Abbildung 23: Mittlere Konzentration von *S. aureus* in Abhängigkeit der Supplemente zu Beginn (t0) und nach 3-tägiger Inkubation (t1)

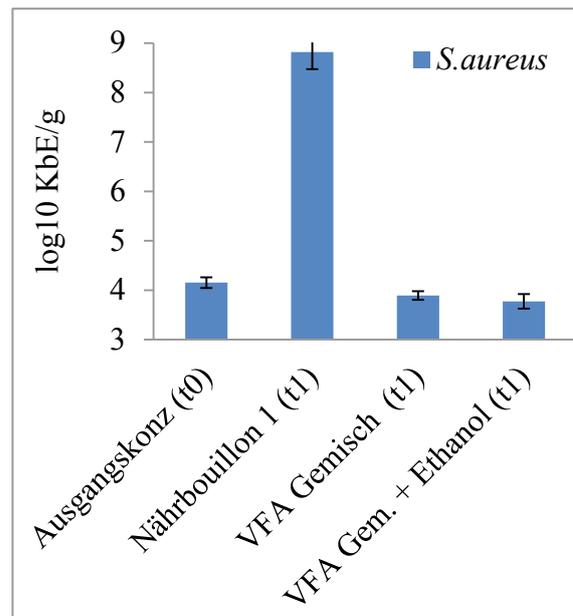


Abbildung 24: Mittlere Konzentration von *S. aureus* in Abhängigkeit der Supplemente zu Beginn (t0) und nach 3-tägiger Inkubation (t1)

Abbildung 24 stellt die mittlere Konzentration von *S. aureus* in Abhängigkeit der verschiedenen Supplemente nach 3-tägiger Bebrütung dar. Nach der Inkubation sank sie signifikant mit den Supplementen VFA-Gemisch 2 sowie mit dem VFA-Gemisch 2 in Kombination mit 0,15 % Ethanol. (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,019$ bzw. $p = 0,010$, $n_{(t0)} = 4$, $n_{(t1)} = 6$). Ohne Supplement hingegen steigt die Konzentration des Erregers sehr deutlich.

4.7. Untersuchungen zum Masseverlust während der Fermentation

Nach 21-tägiger Fermentation betrug der signifikante Masseverlust der fermentierten Matrix S_{Pool} 0,66 g (StAbw.: 0,052 g), was 2,44 % der Gesamtmasse von 27 g entspricht ($p = 0,031$; $n = 6$; Wilcoxon-Test).

4.8. Eliminierungs- und Substitutionsexperimente der Matrixzusammensetzung

4.8.1. Quantitative bakterielle Untersuchungen

In den Eliminierungs- und Substitutionsexperimenten sollten die für die Hygienisierung notwendigen Matrixkomponenten näher bestimmt werden. Wie in **Abbildung 25**, **Abbildung 26** und **Abbildung 27** dargestellt, unterscheiden sich die bakteriologischen Parameter in den Matrizes S_{Pool} , $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ ab dem 3. Tag. Während in Matrix S_{Pool} die Gram-negativen GKZ bereits unter die Nachweisgrenze von 3,00 log₁₀ KbE/g sinkt, steigt sie in den Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ bzw. $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$. Am Tag 7 sinkt die Gram-negative GKZ in Matrix

$S_{\text{Pool-Wk}}$ auf etwas weniger als das Ausgangsniveau und steigt in Matrix $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ noch weiter, während sie in Matrix S_{Pool} unter der Nachweisgrenze bleibt. Zudem sinkt auch die Konzentration der Hefe- und Schimmelpilze in Matrix S_{Pool} unter die Nachweisgrenze nach 3 Tagen Fermentation. In Matrix $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ hingegen steigt die Konzentration leicht. Nach 7 Tagen sind Schimmel- oder Hefepilze in keiner der Matrizes nachweisbar. Deutliche Unterschiede sind auch in den Enterokokkenkonzentrationen im Verlauf der 7 Tage zu sehen. Zu Beginn des Versuches ist sie noch recht einheitlich in den Matrizes S_{Pool} , $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$. Nach 3 Tagen Fermentation sinkt die Konzentration in der Matrix S_{Pool} , in den anderen jedoch steigt sie sehr stark. Nach 7 Tagen Fermentation sinkt die Enterokokkenkonzentration in allen Matrizes, in Matrix S_{Pool} unter die Nachweisgrenze, in den Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ hingegen auf etwas unter bzw. immer noch stark über der Ausgangskonzentration. Während der ersten 3 Tage Fermentation steigt die aerobe GKZ in allen Matrizes sehr stark an, in der Matrix ohne Weizenkleie mit zusätzlichen Sägespänen sogar noch deutlich stärker. Nach 7 Tagen Fermentation sinkt die aerobe GKZ in allen Matrizes wieder sehr stark ab, jedoch mit sehr großen Standardabweichungen in den Matrizes ohne Weizenkleie. Die Dynamik der anaeroben GKZ ist relativ ähnlich, wenngleich die Konzentrationsanstiege und -abfälle deutlich geringer ausfallen. Nach drei Tagen Fermentation steigen die Konzentrationen der *Lactobacillaceae* in allen Matrizes deutlich an, nach 4 weiteren Tagen Fermentation sinkt die Konzentration in allen Matrizes wieder, jedoch in Matrix $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ wesentlich stärker. Die Konzentration der Clostridien sinkt nach 3 Tagen Fermentation in Matrix S_{Pool} deutlich, hingegen steigt sie in den anderen beiden Matrizes. Nach dem 7. Tag Fermentation steigt die Konzentration in S_{Pool} wieder auf den Ausgangswert und sinkt in den Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ auf etwas mehr als den Ausgangswert. Wenngleich sich die Konzentration der SSR am 3. Tag allein in S_{Pool} extrem stark von der Dynamik der Clostridien unterscheidet, ist sie in vielen anderen Punkten ähnlich. Die hohen Standardabweichungen der SSR sind methodenbedingt, da das MPN-Verfahren semiquantitativ ist.

In einem weiteren Experiment mit Matrix **Fä+Wk** wurde festgestellt, dass Fäkalien allein mit Weizenkleie fermentiert zu einer Inaktivierung der Gram-negativen GKZ, Enterokokken sowie Schimmel- und Hefepilze bis unter die Nachweisgrenze von $2,00 \log_{10} \text{KbE/g}$ innerhalb von 3 Tagen führen.

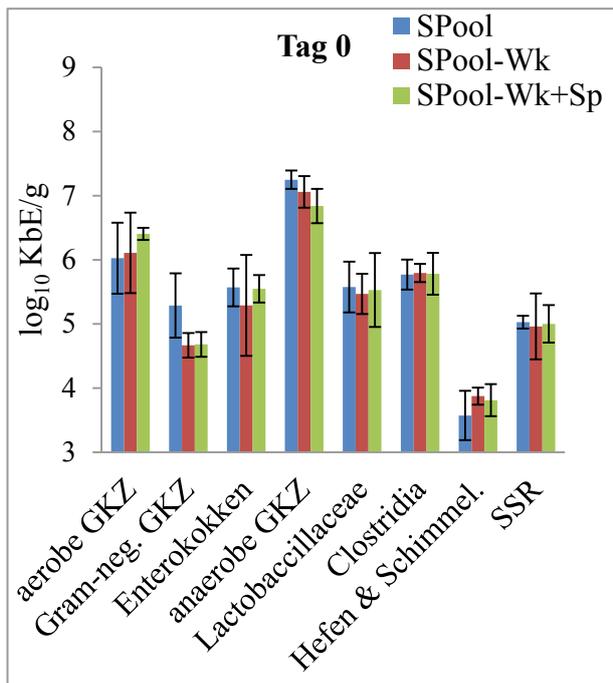


Abbildung 25: Quantitative Auswertung bakteriologischer Parameter im Substitutionsexperiment zum Tag 0

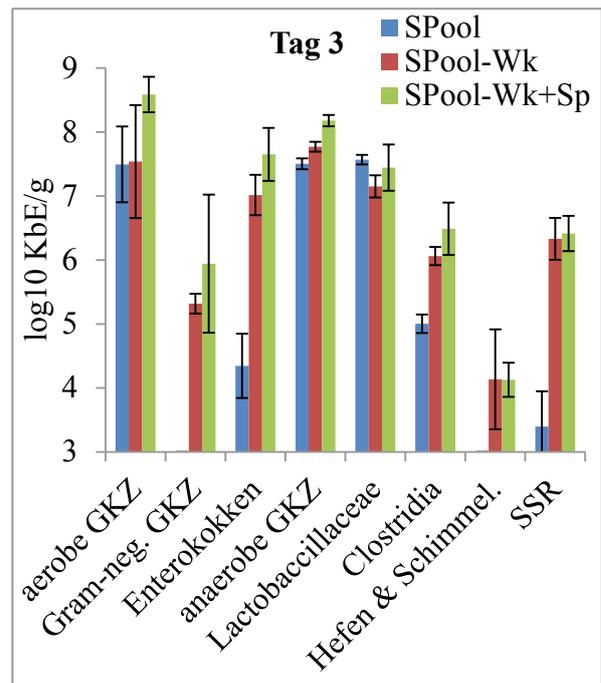


Abbildung 26: Quantitative Auswertung bakteriologischer Parameter im Substitutionsexperiment zum Tag 3

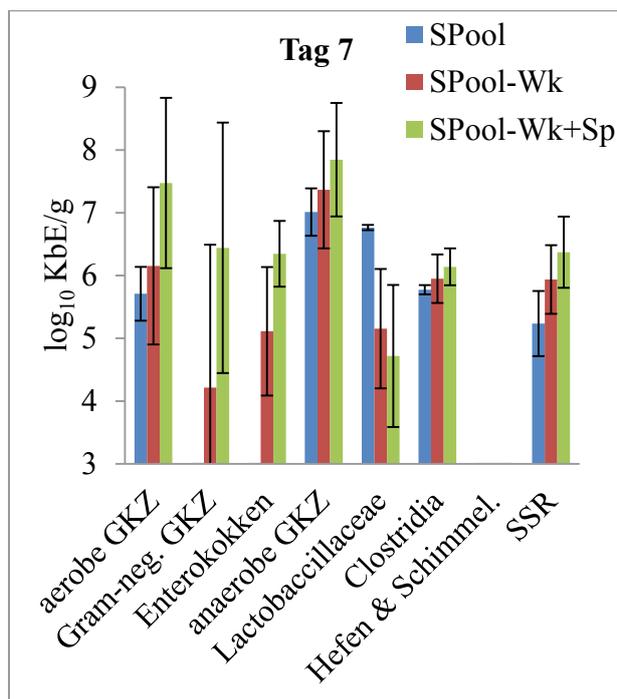


Abbildung 27: Quantitative Auswertung bakteriologischer Parameter im Substitutionsexperiment zum Tag 7

4.8.2. Qualitative bakterielle Untersuchung

Neben den quantitativen Unterschieden in den Enterokokkenpopulationen gibt es auch zahlreiche qualitative Unterschiede festzustellen (**Tabelle 26**, Seite 142). So wird in allen Proben aller drei Matrizes vor der Fermentation *E. faecalis* nachgewiesen, nach 3 Tagen Fermentation zudem in allen Proben der Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$, jedoch nicht in

Matrix S_{Pool} . *E. avium* und *E. casseliflavus* können während der Fermentation auch lediglich in den Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ ermittelt werden. Wie in **Tabelle 26** dargestellt, wird der anaerobe Erreger *Eggerthella lenta* in allen Proben der Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ am 3. Tag der Fermentation nachgewiesen, jedoch nicht mehr nach 7 Tagen Fermentation bzw. nie in Matrix S_{Pool} . Auch *E. coli* wird in allen Matrizes ohne Weizenkleie gefunden. Erst in der qualitativen Untersuchung werden die Unterschiede in den *Lactobacillaceae*-Population besonders deutlich, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. kitasatonis*, *L. reuteri* und *Pediococcus acidilactici* werden nach bzw. während der Fermentation in nahezu allen Proben der Matrix S_{Pool} gefunden, jedoch nie in den Matrizes $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$.

4.9. Molekularbiologische Untersuchungen

4.9.1. Erstellung eines Standardbandenmuster für die TGGE

Um verschiedene Gele miteinander vergleichen zu können, bedurfte es eines einheitlichen Standards. Um diesen zu erstellen, wurden Amplifikate von bekannten Spezies (Markerstämme) zuerst auf das Agarosegel und dann auf das Temperaturgradientengel (Acrylamidgel) aufgetragen. Wie in **Abbildung 28** zu sehen, konnte ein positives Signal im Bereich zwischen 400 und 500 bp bei allen Amplifikaten ermittelt werden. Zum einen bestätigt dies die Funktion des Universalprimers und zum anderen entspricht die erwartete Länge von 433 bp (+ GC-Klammer ~40bp) der Laufstrecke. Die Negativkontrolle erzeugte keine Bande. Die stärkste Bande stammt von *Clostridium perfringens*. *Nocardia asteroides* und *Enterococcus faecalis* erzeugten jeweils nur eine schwache Bande. Das Gemisch aus Templates, das vor der Amplifikation erstellt wurde, führte zu einer mittelstarken Bande. Die PCR-Produkte, die die drei kontrastreichsten Banden im Agarosegel erzeugten, wurden nun im Acrylamidgel aufgetrennt. Wie in **Abbildung 29** dargestellt, stammt auch dort das kontraststärkste Bandenmuster von der 16S-rDNS von *C. perfringens*. In dem Gemisch der Amplifikate kommt es zu einer Abschwächung der Kontraste aller Banden, zudem sind die Banden von *C. perfringens* und *S. aureus* nur schwer voneinander differenzierbar. *E. coli* Nissle hat die am weitesten migrierenden Banden der verglichenen Stämme, wenngleich auch die kontrastärmsten. Daher wurde als zukünftiger Standard für alle TGGE-Gele das Amplifikat von *C. perfringens* verwendet, um Streckungen und Stauchungen sowie andere Interassayvarianzen auszugleichen und unterschiedliche Gele miteinander vergleichbar zu machen.

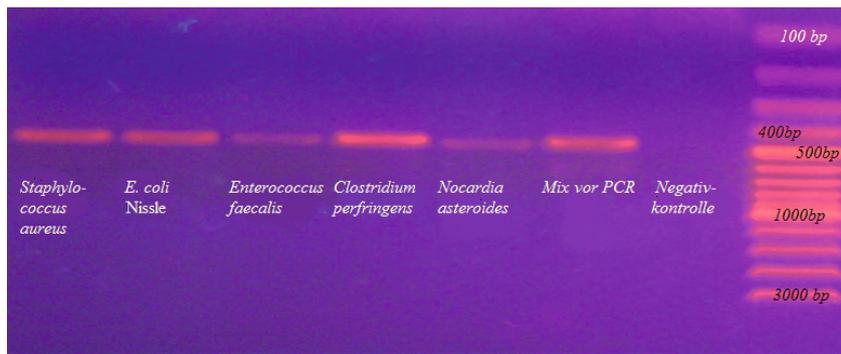


Abbildung 28: Standard-Banden im Agarosegel, Überprüfung des PCR-Produktes der 16S-rDNS für verschiedene Markerstämme

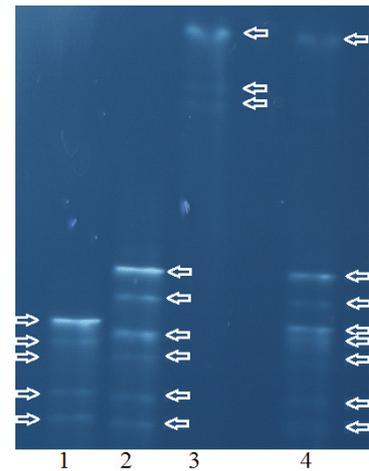


Abbildung 29: Standard-Banden der 16S-rDNS im TGGE-Acrylamid-Gel,
1: *S. aureus*
2: *C. perfringens*
3: *E. coli* Nissle
4: Gemisch der Stämme

4.9.2. TGGE-Bandenmuster der unterschiedlichen Klärschlämme

Abbildung 30 zeigt die Bandenmuster von Matrix **S** mit den Klärschlämmen verschiedener Kleinkläranlagen vor der Fermentation. Die mittlere Ähnlichkeit der Bandenmuster liegt bei 38 %. Wie in **Abbildung 31** offensichtlich wird, unterscheidet sich das Bandenmuster nach der 7-tägigen Fermentation mit einer mittleren Ähnlichkeit von ca. 50 % deutlich von dem vorherigen. Die Bandenmuster vor und nach der Fermentation aller Schlämme befinden sich in verschiedensten Ansichten und Gegenüberstellungen im Anhang ab Seite 147. Eine starke Änderung in den Bandenmustern vor und nach der jeweiligen Fermentation konnte im direkten Einzelvergleich bei allen Klärschlämmen gefunden werden, auch nahm die Heterogenität der Banden mit der Fermentation ab.

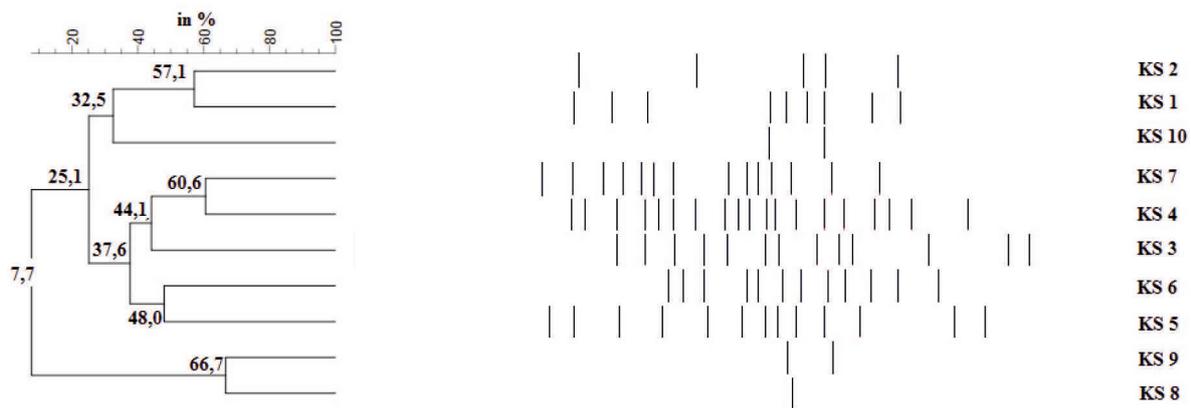


Abbildung 30: Repräsentative TGGE-Bandenmuster vor der Fermentation der Matrix **S** auf Basis verschiedener Klärschlämme aus 10 verschiedenen Kleinkläranlagen (KS 1 – 10), Anordnung nach Ähnlichkeit der 16S-rDNS

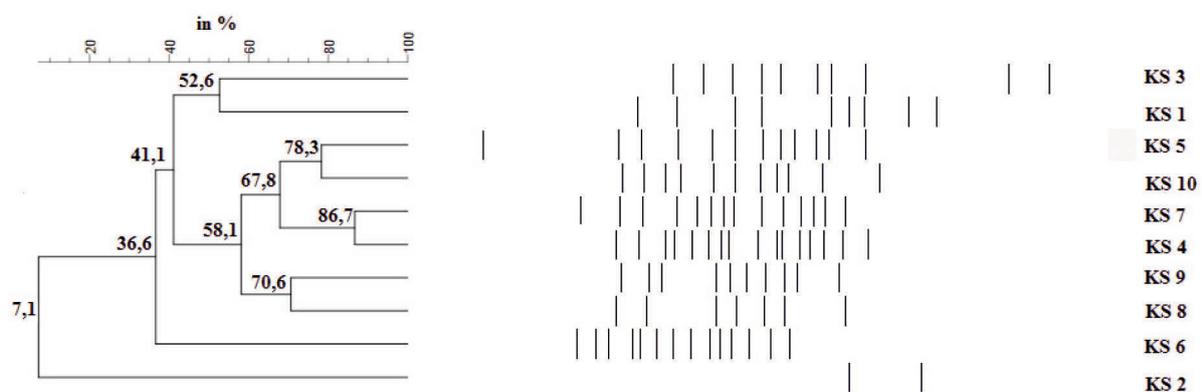


Abbildung 31: Repräsentative TGGE-Bandenmuster nach der Fermentation der Matrix **S** auf Basis verschiedener Klärschlämme aus 10 verschiedenen Kleinkläranlagen (KS 1 – 10), Anordnung nach Ähnlichkeit der 16S-rDNS

4.9.3. Vergleich der Bandenmuster von Matrix S_{Pool}

Abbildung 32 stellt die Bandenmuster vor und nach 3-wöchiger Fermentation von Matrix S_{Pool} dar. Bei Betrachtung der Bandenmuster fällt auf, dass die Banden vor der Fermentation (BvF) 1 bis 3 während der Fermentation verschwinden, die Banden nach der Fermentation (BnF) 1 bis 4 hingegen erhalten bleiben, wobei BnF 3 an Kontrastintensität stark zunimmt.

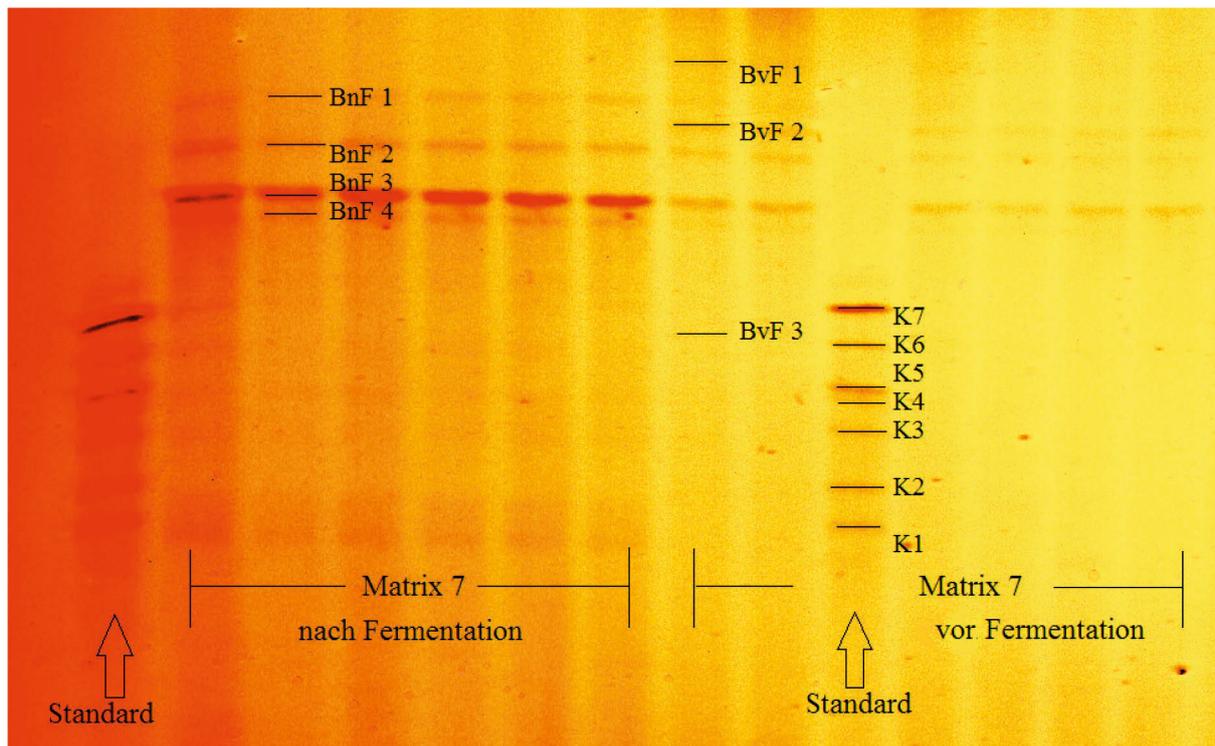


Abbildung 32: TGGE-Bandenmuster der 16S-rDNS vor und nach Fermentation von Matrix S_{Pool}

4.9.4. Sequenzierung ausgewählter Banden

Insgesamt konnten 7 Banden aufgereinigt und sequenziert werden: K2 und 7, BvF 1 und 2 sowie BnF 4 lieferten dabei verwertbare Sequenzen. Bei diesen 5 Sequenzen wurden Homologien von 100 % ermittelt und in **Tabelle 4** dargestellt, die Sequenzen im Detail sind im Anhang auf Seite 152 zu finden. Darüber hinaus werden die in der Datenbank erwähnten taxonomischen Einheiten der nächstgenannten Sequenzen bis zu einer Sequenzhomologie von 95 % angegeben.

Tabelle 4: Sequenzierungsergebnisse der TGGE-Banden, (BLAST325, 507).

Banden- bezeichnung	Datenbank- referenz- nummer BLAST (nächst- genanntes Taxon)	Basenpaar- Homologie (nächst- genanntes Taxon)	Art (ähnlichstes bekanntes Taxon)	Beschreibung des Datenbank- eintrages durch den Ersteller
BnF 4	JN381505.1	171/171 (100%)	nicht kultivierte <i>Clostridium</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp CRIB 16S-rDNS Teilsequenz
BvF 1	GU559776.1	241/241 (100%) (238/241 (99%))	nicht kultiviertes Bakterium (Lachnospiraceae)	clone C9.53 16S-rDNS Teilsequenz
BvF 2	EU864478.1	361/361 (100%)	nicht kultiviertes Bakterium (kein Treffer \geq 95%)	clone E42 16S-rDNS, Teilsequenz
K2	JX267089.1	366/366 (100%)	<i>Clostridium perfringens</i>	strain E060 16S-rDNS Gene, Teilsequenz
K7	NR_074482.1	361/361 (100%)	<i>Clostridium perfringens</i>	strain 13 16S 16S-rDNS, Teilsequenz

5. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die deutliche Mehrzahl der zugegebenen sowie der inhärenten Krankheitserreger inaktiviert wurde, lediglich versportete Bakterien sowie Spulwurmeier überdauern den hygienisierenden Effekt der milchsauren Fermentation.

Die kulturell ermittelten Daten weisen deutlich auf die milchsaure Fermentation als Ursache für den Hygienisierungsprozess hin. Gleichzeitig wird dargestellt, dass die gemessenen volatilen Fettsäuren, die Milchsäure, der pH-Wert und auch das Ethanol allein und in Kombination nicht zu dem beobachteten bakteriziden Effekt führen. Weitere Faktoren wie Bakteriozine werden nun als (weitere) wirksame Reagenzien in Betracht gezogen.

Eine „lebendige“ Fäkalflora sowie eine fermentierbare Kohlenstoffquelle werden als essentiell für den Hygienisierungsprozess dargestellt, im Gegensatz zu der gewählten Starterkultur.

Eine sinkende Heterogenität der Flora konnte sowohl kulturell als auch mittels molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden. Jedoch wirft auch die molekularbiologische Methodik neue Fragen auf, da die dort stichprobenhaft ermittelten Spezies andere sind und deren Einfluss auf das Fermentationssystem im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter geklärt werden kann.

Der Masseverlust der hier vorgestellten milchsauren Fermentation ist im Vergleich zu den in der Literatur hinterlegten Verlusten alternativer Methoden verschwindend gering. Somit steht effektiv mehr organische Substanz bei gleichzeitig umfassenderer Hygienisierung von bakteriellen Krankheitserregern zur Düngung und zum zukünftigen Humusaufbau zur Verfügung.

5.1. Material- und Methodendiskussion

5.1.1. Matrixzusammensetzung

5.1.1.1. Homogenität der Matrices

Bereits die Herstellung der verschiedenen Matrices stellte sich als fehleranfällig dar. Da die Keimbelastungen aller anderen Zusätze mit $< 3,0$ bis $3,6 \log_{10}\text{KBE/g}$ deutlich geringer ausfielen als die der Fäkalien mit rund 6 bis $8 \log_{10}\text{KBE/g}$, waren sie hinsichtlich des quantitativen bakteriellen Eintrags als vernachlässigbar einzustufen. Umso entscheidender war eine sorgfältige Vermischung aller Komponenten, zumal bei einer Holzkohleruß-Körnung von < 1 bis 10 mm eine nicht selektive Probenentnahme von $0,5$ g nicht immer gelang. Mitunter mussten daher Holzkohlestückchen bei einer zu großen Körnung (> 3 mm) ausgeschlossen werden. Während alle anderen Zusätze einer Charge entsprachen, war die Rindergülle stets frisch und somit natürlichen Schwankungen unterworfen. Auf eine Lagerung der Gülle wurde verzichtet, da sich mit der Lagerung das Keimspektrum von Fäkalien reduziert (308).

5.1.1.2. Homogenität der Fäkalchargen

Die Rindergülle stammte mitunter von unterschiedlichen Rindern, unterschiedlichen Zeitpunkten und/oder unterschiedlichen Fütterungen, da die Tiere sich im Stall frei bewegen konnten und eine Zuordnung somit nicht möglich war. Die Gülle unterliegt somit natürlichen Schwankungen in Keimspektrum und Keimkonzentration. So sind die Ausgangskeimzahlen zum Startzeitpunkt von Matrix **K** in **Abbildung 7** (S. 36) nicht mit denen aus Matrix **KEM** und **K(EM)_a** aus **Abbildung 8** und **Abbildung 9** (S. 37) zu vergleichen, während die beiden letzteren untereinander vergleichbar sind. Generell wurde die Anordnung der Abbildungen so gewählt, dass sie in einem Diagramm bzw. in einer gemeinsamen Anordnung derselben Fäkalcharge entsprechen, sofern sie sich nicht generell hinsichtlich Klärschlamm oder Rindergülle unterscheiden. Heterogen verhielt sich auch die Ausgangskeimkonzentration sowie die Keimflora der Klärschlämme unterschiedlicher Herkunft (**Tabelle 18**, S. 126). Der Keimgehalt und die Keimzusammensetzung von Schlämmen aus Kleinkläranlagen hängt von Nutzer, Nutzerzahl, Entnahmezeitpunkt, Verdünnung, Entnahmepunkt sowie zahlreichen anderen Faktoren, wie z. B. dem Eintrag von Haushaltschemikalien, Essensresten oder Medikamenten ab (243, 485). Die Heterogenität zeigt sich zum einen im Keimspektrum, wie in **Tabelle 19** (S. 127) im Anhang zu sehen ist, zum anderen auch in den quantitativen Parametern, ebenfalls im Anhang in **Abbildung 41** (S. 116) bis **Abbildung 48** (S. 123) dargestellt. Die daraus gebildeten Mittelwerte, die in **Abbildung 10** (S. 39) dargestellt sind,

weisen dementsprechend hohe Standardabweichungen auf. Nichtsdestotrotz konnten signifikante Unterschiede in den Keimzahlen zwischen den einzelnen Zeitpunkten ermittelt werden.

5.1.2. Lebendkeimzahlbestimmung (Plattenzählverfahren)

Das Plattenzählverfahren besitzt zahlreiche mögliche Fehlerquellen. Neben der Selektivität der Inkubationsbedingungen (Medium, Temperatur, Sauerstoffspannung, Dauer) sowie dem möglichen Übersehen kleiner Kolonien (304) besteht auch die Möglichkeit von Interaktionen der Kolonien auf der Platte. Langsam wachsende Kolonien werden überwachsen, andere durch die räumliche Nähe zu anderen im Wachstum gehemmt. Zudem wurde die natürliche Anordnung der Mikroorganismen in der Matrix durch das Suspendieren aufgelöst. Auch das Angebot und die Konkurrenz um Nährstoffe des Nährbodens stellen sich *in-vitro* anders als *in-situ* dar. Amann (27) resümiert, dass je nach Ursprungshabitat lediglich 0,001 bis 15 % der Mikroflora kultivierbar sei. Folglich können diese hier verwendeten kulturellen Methoden nur einen sehr kleinen Ausschnitt der *in-situ* „Black Box“ beleuchten. Sie bieten jedoch den Vorteil, Aussagen über die Vitalität und potentielle Infektiosität der Erreger zu treffen. So kann ein geschädigter Erreger zwar molekularbiologisch nachgewiesen werden, jedoch sind Aussagen über seine Lebensfähigkeit nicht möglich.

5.1.3. Inter- und Intraassay-Varianzen der Kulturverfahren

Ein Variationskoeffizient der Intraassay-Varianz von bis zu ~70 % sowie der Interassay-Varianz von bis zu ~48 % deuten auf eine ungenaue Methodik hin. Vergleicht man die Standardabweichungen von 0,15 bis 0,18 \log_{10} KbE/g mit den im selben Labor ermittelten Standardabweichungen von Ständer (438) mit 0,05 bis 0,42 \log_{10} KbE/g, so liegen sie in diesem Varianzbereich. Obgleich die Methode an sich recht ungenau ist, gilt sie immerhin als die genaueste bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl (304).

5.2. Populationsanalysen im Verlauf der Fermentation

5.2.1. Quantitative bakteriologische Untersuchungen

5.2.1.1. Rindergüllematrizes

5.2.1.1.1. Matrix K

Bei der Betrachtung von **Abbildung 7** (S. 36) fallen sofort die massiven Änderungen in der Gram-negativen GKZ sowie der Konzentration der Enterokokken auf. Sie sanken unter die Nachweisgrenze, das entspricht nahezu drei dekadischen Logarithmusstufen. Allein anhand

dieser Parameter kann man jedoch noch nicht schließen, dass alle Gram-negativen Erreger bzw. Enterokokken tatsächlich inaktiviert worden sind, da die Nährböden mitunter bestimmte Erreger diskriminieren. Anspruchsvolle MO wie z. B. die Gram-negative *Pasteurella multocida* wachsen nicht auf dem Metachromgelb-Wasserblau-Lactoseagar nach Gassner. Auch führen die Hemmstoffe der verschiedenen Nährböden zu einer Einschränkung des Wachstums. Während Enterokokken auf dem Columbia-Blood-Agar (CBA) innerhalb von 24 h wachsen, benötigen sie auf dem CATC-Agar 72 h. Neben der Wachstumsgeschwindigkeit kann auch eine quantitative Einschränkung erfolgen, so wuchs z. B. *Mycobacterium fortuitum* auf dem mit Antibiotika supplementierten Nährboden nicht nur langsamer, sondern auch deutlich schlechter. Dies zeigte sich in einer um $0,75 \log_{10}\text{KbE}$ verringerten Keimzahl im Vergleich zum CBA. Erst die qualitative Betrachtung dieser Organismengruppen untermauert die Aussage: Enterokokken und Gram-negative Erreger wurden unter die Nachweisgrenze inaktiviert. Einen weiteren starken Hinweis auf eine Floraänderung erlaubt die Betrachtung der GKZ – sie sank um über eine \log_{10} -Stufe. Dieser Abfall der GKZ ist auch unter Einbeziehung der Standardabweichungen sowie des methodischen Fehlers (Gesamt: $0,35 \log_{10}\text{KbE}$) als gesichert anzunehmen. Anders jedoch verhält es sich bei der Betrachtung der anaeroben GKZ. Bei einem Gesamtfehler von $0,66 \log_{10}\text{KbE}$ erscheint der Unterschied zwischen den Werten vor und nach der Fermentation als nicht gesichert. Betrachtet man parallel dazu den Anstieg von $1,71 \log_{10}\text{KbE}$ bei den *Lactobacillaceae* mit einem Gesamtfehler von $0,85 \log_{10}\text{KbE}$, liegt die Vermutung nahe, dass die anaerobe Flora nunmehr von den *Lactobacillaceae* dominiert wurde. Dass weder Hefe- oder Schimmelpilze noch Clostridien detektiert werden konnten, liegt vermutlich zum einen an dem adulten sowie klinisch unauffälligen Tier (389), welches sich nicht in der Laktation befand, und zum anderen auch an der direkten, rektalen Kotentnahme, was eine Kontamination mit anderen Darmflora und der Bodenflora ausschließt. Die rektale Entnahme fand statt, da der Stallboden am Tage der Beschaffung frisch gereinigt war.

5.2.1.1.2. Matrix **KEM** und **K(EM)_a**

Die Versuche mit den Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** wurden zu Beginn der praktischen Arbeiten durchgeführt. Der methodische Ansatz weist deutliche Mängel auf, so wurde zum Startzeitpunkt lediglich eine Stichprobe entnommen. Somit konnte eine Standardabweichung nicht errechnet werden, und auch Verdünnungsfehler können nicht ausgeschlossen werden. Die Unterschiede der Keimzahlen im Vergleich zum Startzeitpunkt von Matrix **K** sind enorm. Dies könnte zum einen an der Methode der Fäkaliengewinnung liegen, die durch das Auflösen vom Stallboden erfolgte und somit sicherlich zu Fremdkontaminationen führte, zum anderen

handelte es sich bei diesen Rindern um laktierende Tiere des Milchviehbestandes des Lehr- und Versuchsgutes Oberholz, die während der Laktation in gängiger Praxis ein anderes Futtermisch erhielten als nicht laktierende Rinder (318). Es erklärt jedoch nicht die hohe Konzentration der Anaerobier, da diese sich unter aeroben Bedingungen auf dem Stallboden nicht vermehren. Die Ursache hierfür ist vermutlich in der Methodik zu finden und wird im Vergleich mit Matrix **K** diskutiert. Vergleicht man die jeweiligen Parameter zum Zeitpunkt 0 der Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** miteinander, so lagen die Unterschiede innerhalb von 0,7 \log_{10} KbE. Bei einer angenommenen Standardabweichung von 0,5 \log_{10} KbE muss dieser Unterschied als nicht maßgeblich gewertet werden. Auch nach 3 bzw. 8 Wochen Fermentation unterschieden sich die unterschiedlichen Behandlungen nicht in der GKZ (Gesamtfehler: 0,30 bzw. 0,68 \log_{10} KbE). Ähnlich verhält es sich zudem mit der anaeroben Gesamtkeimzahl, nach 3 bzw. 8 Wochen Fermentation unterschieden sich die unterschiedlichen Behandlungen nicht (Gesamtfehler: 0,36 bzw. 0,39 \log_{10} KbE). Die Unterschiede zwischen den aeroben und anaeroben GKZ nach 3 (Gesamtfehler 0,34 \log_{10} KbE) bzw. 8 (0,37 \log_{10} KbE) Wochen Fermentation fielen in Matrix **KEM** verschwindend gering aus bzw. waren in Matrix **K(EM)_a** gar nicht als Unterschiede erkennbar. Im Vergleich zu den Experimenten mit Matrix **K** fällt auf, dass die anaerobe GKZ nach 3-wöchiger Fermentation in den Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** tendenziell geringer war als die aerobe GKZ, während sie in Matrix **K** (Gesamtfehler 0,63 \log_{10} KbE) leicht stieg. Es scheint vielmehr schlüssig, dass bei einer anaeroben Fermentation die anaerobe GKZ höher liegt als die aerobe. Die abweichenden Ergebnisse sind vermutlich in der Sauerstoffspannung der unterschiedlichen Bebrütungsarten der Platten zu suchen. Während die Platten der Matrizes **KEM** und **K(EM)_a** noch in einem Anaerobrutschrank (DW Scientific, Shipley, UK) bebrütet wurden, wurden alle weiteren in Töpfen mit den Anaerocult-Kits (Merck) bebrütet. Im Gegensatz zu den in Töpfen bebrüteten Platten, wuchsen auf denen im Anaerobrutschrank auch Bazillen sehr üppig, mitunter schwärmend, was auf eine Anwesenheit von Sauerstoff hinwies. Dies führte zu einer massiven Konkurrenz auf der Platte und ist zudem Hinweis darauf, dass evtl. Wachstumsbedingungen für strikte Anaerobier nicht gegeben waren. Auf Grund dessen wurde die anaerobe Bebrütungsmethode generell auf das Anaerocult-System umgestellt. Anders jedoch verhält es sich bei den *Lactobacillaceae*. Da die Supplemente (**Abbildung 38**, S. 113) das Wachstum von Bazillen verhinderten und Laktobazillen zumeist auch bei geringer Sauerstoffspannung am besten wachsen (201), sind diese Daten weniger mit methodischen Fehlern behaftet. Besonders auffällig sind hier die Konzentrationsunterschiede der *Lactobacillaceae* am Tag 21 zwischen Matrix **KEM** und **K(EM)_a** (Gesamtfehler 0,60

\log_{10} KbE). Da sich zu Beginn der Fermentation die Ausgangskonzentrationen der *Lactobacillaceae* trotz Zugabe von EM nicht quantitativ unterschieden und es nichtsdestoweniger zu einer unterschiedlichen Keimzahl am 21. Tag kam, lag mutmaßlich ein qualitativer Unterschied in der *Lactobacillaceae*-Population vor. In diesem Zeitraum könnte eine qualitativ andere Laktobazillenflora zu einer anderen Populationsentwicklung führen. Es erscheint zudem naheliegend, dass die kotinhärenten Laktobazillen eine deutlich besser adaptierte Population darstellen als die EM-inhärenten Laktobazillen, die in einer Suspension auf Melasse-Basis vermehrt wurden. Nach 56 Tagen konnten keine quantitativen Unterschiede ermittelt werden, und es hat sich vermutlich eine ähnliche Klimaxpopulation eingestellt, sodass früher oder später die Gülle-inhärente Laktobazillenpopulation die Keimzahl bestimmte. Das Autoklavieren der EM-Suspension dürfte sowohl Bakterien als auch darin enthaltene bakterizide Substanzen in Mitleidenschaft gezogen haben, sodass sich Verbindungen wie volatile Fettsäuren verflüchtigten bzw. Bakteriozine auf Peptidbasis denaturierten. Schneider (413) konnte nachweisen, dass selbst hitzeresistente Bakteriozine unter einer 20 minütigen 120°C-Drucksterilisation zerstört werden können. Sollte es durch die Hitzesterilisation dazu gekommen sein, könnte auch dies zu einem weniger starken Abfall der kot-typischen *Lactobacillaceae* in Matrix **K(EM)_a** geführt haben. Da die Gruppe der *Lactobacillaceae* besonders betroffen schien, könnte es sich bei den vermuteten Peptiden um Bakteriozine mit einer schmalen Wirkbandbreite handeln, die nur bestimmte Taxa angreifen (387). In beiden Matrices **KEM** und **K(EM)_a** wurden Gram-negative Erreger, Enterokokken und Hefe- und Schimmelpilze reduziert sowie eine generelle Reduktion der Keimfracht beobachtet. Aufgrund der lediglich geringen Unterschiede zwischen **KEM** und **K(EM)_a** kann davon ausgegangen werden, dass eine zusätzliche Laktobazillenzugabe in Form von EM für die untersuchten Parameter nicht notwendig ist, wie es jedoch in der EM- und Bokashiszene häufig kommuniziert wird (222, 297, 313). Trotz unterschiedlicher Ausgangsfäkalien fallen zudem die Gemeinsamkeiten mit dem Fermentationsversuch der Matrix **K** auf. Gram-negative und Enterokokken wurden inaktiviert und auch alle Keimkonzentrationen mit Ausnahme der *Lactobacillaceae* reduziert. Diese Ausnahme ist für die Beurteilung der Hygienisierungsleistung als positiv zu bewerten, da diese Familie keine Krankheitserreger enthält, vielmehr jedoch zahlreiche Antagonisten von pathogenen MOs (128, 201, 387). Ob die höhere Konzentration der *Lactobacillaceae* in Matrix **K** nach 21 d auf die Abwesenheit von der EM-Suspension bzw. der autoklavierten EM-Suspension zurückzuführen ist oder allein daher resultiert, dass die Abwesenheit der Suspensionen einen für diese Milchsäuregärung besseren TS-Gehalt darstellte, kann durch diesen Versuchsaufbau jedoch

nicht untersucht werden. Während bei der (Gras-)Silageherstellung ein TS-Gehalt im Bereich von 30 – 40 % als Optimalbereich für eine Milchsäuregärung beschrieben wird (192), scheinen Schwankungen im TS-Gehalt zwischen Matrix **K** sowie **KEM** und **K(EM)_a** keinen Einfluss auf die generelle Reduktion von Gram-negativen bzw. Enterokokken gehabt zu haben. Somit scheint die milchsäure Fermentation als Hygienisierungsmethode eine recht hohe Toleranz gegenüber TS-Gehaltsschwankungen zu besitzen. Auch scheinen noch geringe TS-Gehalte eine Milchsäuregärung nicht zu verhindern, dies verdeutlicht die Joghurt-, Kefir- oder Sauerkrautproduktion mit TS-Gehalten von 10 % – 12 %. (462). Einige Parallelen können zu der Fermentation von Futterabfällen nach Hrubant gezogen werden (234), die auch Enterobakterien inaktivierte. Jedoch stieg dort die Hefenpopulation deutlich an. Möglicherweise lag dies an der dortigen niedrigeren Fermentationstemperatur und einem Eintrag von Sauerstoff.

5.2.1.2. Klärschlammmatrizes

Aus den Erfahrungen der Experimente mit den Matrizes **K**, **KEM** und **K(EM)_a** wurde bei der klärschlammhaltigen Matrix **S** auf den Zusatz von EM verzichtet. Da chronologisch die Experimente zur Hygienisierung von pathogenen Bakterien in Rindergülle vor den Experimenten mit Klärschlämmen erfolgten, wurde auch hier an Hand der zuvor gewonnenen Erfahrungen das Beobachtungszeitfenster auf 7 Tage reduziert. Es konnte darin als Nebenbefund festgestellt werden, dass innerhalb der ersten 3 Tage die qualitativ und quantitativ größten Veränderungen auftraten (siehe 4.3.1.1 S. 41). Weitere zeitliche Auflösungen der quantitative Untersuchungen (**Abbildung 49** S. 124) zeigten ebenso, dass eine besonders starke Veränderung in der Bakterienzahl in den ersten 7 Tagen stattfand. Durch die Zusammenfassung aller Klärschlämme konnten eine hohe Gesamtprobenzahl realisiert und daraufhin mittels Wilcoxon-Test Untersuchungen auf signifikante Unterschiede vorgenommen werden. Innerhalb der ersten 3 Tage kam es zwar zu einem Anstieg der aeroben GKZ, dieser war jedoch nicht signifikant. Das Gros der gezählten Kolonien nahm dabei die Familie der *Lactobacillaceae* ein. Das erscheint zwar widersprüchlich, da die *Lactobacillaceae* speziesabhängig eher unter mikroaerophilen Bedingungen wachsen(201). Trotz alledem dominierten sie die Matrix so stark, und zusätzlich führte ihre Säureproduktion auf dem CBA zu einer gut sichtbaren α -Hämolyse, dass sie selbst bei aerober Bebrütung zwar unscheinbar waren, aber dennoch sichtbar wurden, obgleich auch in einer deutlich geringeren Konzentration als bei anaerober Bebrütung. Möglich ist aber auch, dass diese eher sauerstofftolerante Spezies auf der anaerob bebrüteten Platte von MO derselben Familie verdrängt wurde. Zusätzlich konnten auch Enterokokken in höheren Konzentrationen auf dem

CBA-Agar gezählt werden. So wird in **Tabelle 19** die Abundanz von *E. faecium* deutlich. Die Konzentration fiel geringer auf dem CATC-Agar aus, was auf die hemmende Wirkung der Supplemente auch auf Enterokokken zurückzuführen ist, wie im Datenblatt des CATC-Agars (**Abbildung 35** S. 110) beschrieben. Ein ähnliches Phänomen konnte ebenso bei dem antibiotikasupplementierten Agar für *Mycobacterium fortuitum* beobachtet werden. Nach 7 Tagen Fermentation sank die GKZ stark und war nun nicht mehr durch Laktobazillen oder Enterokokken dominiert, vielmehr waren nahezu ausschließlich aerobe Sporenbildner zählbar. Anhand dieser Beobachtung wird bereits deutlich, dass sporenbildende Bakterien den über 3 Tage hinausgehenden Fermentationsvorgang besser überdauerten als andere Bakterien. Im Gegensatz zur sporenbildenden Bakterienflora wurde die Gram-negative Flora innerhalb von 3 Tagen unter die Nachweisgrenze ($3 \log_{10} \text{KbE/g}$) inaktiviert, lediglich eine einzelne Probe wies nach 3 Tagen noch einen positiven Befund auf, was jedoch höchstwahrscheinlich eine Kontamination war. In der Regel wurden die Gram-negativen Erreger auch noch unter eine herabgesetzte Nachweisgrenze von $2 \log_{10} \text{KbE/g}$ reduziert. Eine besonders hohe Standardabweichung konnte bei den Keimzahlen der Enterokokken festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Zeitraum ganz besonders starke Schwankungen in den Konzentrationen auftraten. Dadurch waren keine signifikanten Änderungen von Tag 0 zu Tag 3 bestimmbar, und auch eine separate Betrachtung der Enterokokkenkonzentrationen der einzelnen Klärschlämme (**Abbildung 44** S. 119) ermöglichte keine generalisierbaren Aussagen in diesem Zeitfenster. In 4 von 9 Schlämmen kam es zu einem Anstieg der Enterokokkenkonzentration, in den restlichen 5 Schlämmen zu einem Abfall. Zum Tag 7 jedoch fielen im Vergleich zu Tag 0 und 3 alle Enterokokkenkonzentrationen, was auf sich verschlechternde Lebensbedingungen für die Enterokokken schließen lässt. Ob, wie in **Abbildung 10** (S. 39) angedeutet, eine klassische exponentielle Wachstumskurve (303) mit exponentieller Absterbephase auf Grund exponentiell anwachsender Antagonisten (z. B. *Lactobacillaceae*) und/oder Nährstoffmangel vorliegt, ist mit der geringen zeitlichen Auflösung schwer einschätzbar. Die quantitative Betrachtung allein ermöglicht jedoch keine zuverlässige Aussage, so hatten die Schlämme 5 und 8 (**Abbildung 44**) sowie 3 und 9 eine nahezu identische Ausgangskonzentration, jedoch völlig andere Enterokokkengehalte an Tag 3 und 7. Die enormen Abweichungen in den Schlämmen 2, 4 und 9 geben einen Hinweis darauf, dass die Populationskurven ggf. phasenverschoben auftreten oder in Bezug zum Nutzer der Kläranlage die Tenazitäten der MOs unterschiedlich sind. Bei einer täglichen Beprobung hätten vielleicht Phasenverschiebungen beobachtet werden können. Die anaerobe Gesamtkeimzahl wurde zu Beginn von ähnlichen Spezies dominiert wie die aerobe GKZ, und

zwar von fakultativen Anaerobiern wie *Enterobacteriaceae* und Enterokokken. Nach drei Tagen jedoch war die Konzentration von *Lactobacillaceae* so sehr gestiegen, dass sie die vorherrschende Flora auf dem anaerob bebrüteten CBA darstellten. Auch noch nach 7 Tagen dominierten sie die CBA-Platte. Untermauern lässt sich diese Beobachtung mit den Konzentrationen der *Lactobacillaceae*, die sich ab dem dritten Tage relativ deckungsgleich verhielten, wie auch in **Abbildung 42** und **Abbildung 45** (S. 117 und S. 120) für die Einzelschlämme dargestellt ist. Lediglich die Konzentrationen in Klärschlamm 6 wichen von diesem Schema ab. Wie in **Tabelle 19** (S. 127) dargestellt, konnte lediglich in diesem Schlamm zu diesem Zeitpunkt *C. clostridioforme* in sehr hoher Konzentration festgestellt werden, was für eine atypische Fermentation spricht. Generell fiel im Mittel jedoch die Konzentration der Clostridien im Verlauf von 3 Tagen Fermentation. Das erscheint in Anbetracht der bisherigen Beobachtungen erstaunlich, waren es doch gerade die Sporenbildner, die nach der Fermentation erhalten blieben und auf Grund der starken Inaktivierung aller nicht versporteten Mikroorganismen (mit Ausnahme der *Lactobacillaceae*) besonders ins Auge fielen. Auch der in Matrix **KEM** und **(KEM)a** getestete sporenbildende Mikroorganismus *C. sporogenes* (**Abbildung 16**, S. 44) wurde durch den Fermentationsvorgang nicht reduziert, im Gegensatz zu dem unter Laborbedingungen schlecht versporenden *C. perfringens*. Betrachtet man dazu die SSR in **Abbildung 10** (S. 39), so scheinen auch Sporen angegriffen zu werden, da ihre Konzentration ebenso in den ersten 3 Fermentationstagen sank. Dabei kann nicht geklärt werden, ob die Reduktion auf Grund einer subletalen Schädigung der Sporen erfolgte, die darauf eine höhere Hitzesensitivität während der Aufbereitung für das MPN-Verfahren aufwies, oder aber eine letale Schädigung durch die Fermentation verursacht wurde. Sugiyama (445) beschrieb eine erhöhte Hitzeresistenz bei *C. botulinum*-Sporen in der Gegenwart von Zucker, Essig- oder Buttersäure. Cameron und Mafart hingegen beschrieben eine verringerte Hitzeresistenz von Sporen durch das Absenken des pH-Wertes (83, 305). Sporen können jedoch auch durch Bakteriozine reduziert werden, wie Vandenberg anhand des Bakteriozins Nisin beschrieb (474).

Bei den Hefen- und Schimmelpilzen konnte man ähnliches wie bei der Gram-negativen GKZ beobachten. Nach drei Tagen waren sie bis unter die Nachweisgrenze inaktiviert. Lediglich in einer Probe wurde nach sieben Tagen ein positiver Einzelbefund erhoben, welcher offensichtlich für eine Kontamination sprach, da die Hefe zum einen auf dem Neomycin-Agar wuchs und zum anderen nicht der Verdünnungsreihe entsprechend verdünnt wurde. Zusammenfassend kann man feststellen, dass alle Gram-negativen, Hefe- und Schimmelpilze sowie augenscheinlich auch alle weiteren Bakterien, die nicht zu den milieustabilen

Lactobacillaceae gehörten oder die Dauerform Spore rechtzeitig ausbilden konnten, unter die Nachweisgrenze inaktiviert wurden. Einige der beobachteten Daten ähneln den Daten, die Hrubant bei der Fermentation von Futterresten erhob, mit Ausnahme der bei Hrubant nicht stattfindenden Reduktion der Hefen (234). Bei der Fermentation von Lebensmitteln kommt es ebenfalls zur Reduktionen von Enterokokken bzw. Enterobakterien (88). Um diese aus den Untersuchungsergebnissen entstandene These zu untermauern, wurde eine Betrachtung der Vorgänge auf Spezies-Ebene notwendig.

5.2.2. Qualitative bakteriologische Untersuchungen

5.2.2.1. Rindergüllematrix

Die qualitativen Untersuchungen unterlagen gleich zwei Einschränkungen, der der Kultivierungsverfahren, welche bereits oben (siehe 5.1.2 und 5.2.1.1.1) diskutiert wurden, sowie der notwendigen Hinterlegung in der Datenbank der Auswertesoftware des MALDI-TOFs. Im Jahr 2011 waren über 2.000 Spezies (über 3.900 Stämme) hinterlegt (184), mit dem Schwerpunkt auf klinisch relevanten, bakteriellen Erregern sowie Hefen (420). Trotz dieser Einschränkungen bietet das System zahlreiche Vorteile in Bezug auf den Probendurchsatz, Bearbeitungsaufwand, Geschwindigkeit und laufende Kosten. Zudem war für die Fragestellung der Hygienisierung von pathogenen MO die Schwerpunktsetzung der Datenbank ausreichend. Die Legende zur Sicherheit der Identifikation in **Tabelle 17** (S. 125) ist für humanmedizinische diagnostische Zwecke konzipiert und geht von einer sehr hohen Übereinstimmungsnotwendigkeit bei dem Vergleich der gemessenen Spektren mit der Datenbank aus (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 1\%$). Da für die hier untersuchten Stämme eine so hohe Genauigkeit nicht unbedingt nötig ist, werden in den folgenden Abschnitten auch Mikroorganismen mit einer „wahrscheinlichen Gattungsidentifikation“ als Spezies diskutiert. Darüber hinaus werden Spezies als pathogen diskutiert, bei denen ggf. nur bestimmte Serovare oder Stämme in der Literatur als virulent beschrieben sind. Die Quantifizierung erfolgte aus den bereits angesprochenen Konkurrenzbedingungen auf dem Nährboden gerade in den Verdünnungsstufen mit zahlreichen KbE lediglich semiquantitativ. Die jeweilige höchste Verdünnungsstufe, in der die jeweiligen Bakterien noch auffindbar waren, wurde als Konzentrationsangabe genutzt. Wie es sich bereits während der quantitativen Auswertung der Matrizes angedeutet hatte, wird auch in der Betrachtung der qualitativen Untersuchungen deutlich, dass viele Arten inaktiviert wurden. Im Zuge dessen lässt sich die Flora in 4 Gruppen aufteilen: die Gram-negative, die Gram-positive, die Gram-positive Fermentationsflora sowie die Gram-positiven Sporenbildner. Dabei ähnelten die

Beobachtungen der Matrizes **K** und **S** einander so stark, dass sie in einer Übersicht (**Abbildung 33**) auf Seite 70 zusammengefasst werden konnten.

Gruppe der Gram-negativen MO

Wie bereits unter 4.2.1. auf S. 35 auffiel, wurden alle Gram-negativen Bakterien inaktiviert. Die Auflösung auf Spezies-Ebene erbrachte dahingehend wenig Erkenntnisgewinn, jedoch konnte verdeutlicht werden, welche (potentiell) pathogenen MO auf Grund der milchsauen Fermentation inaktiviert wurden. In **Tabelle 20** auf Seite 134 wird ersichtlich, dass 80 % der gefundenen Gram-negativen MO eine klinische Relevanz aufweisen.

E. coli ist der bedeutendste Vertreter dieser Gruppe. Einige der sehr zahlreichen Krankheitsbilder des MO wurden bereits in der Einleitung auf S. 9 beschrieben. Darüber hinaus dient er u. a. in der Trinkwasserverordnung als Indikatorkeim (134). Insofern kann man festhalten, dass die Inaktivierung dieser Erregergruppe ein deutlicher Hygienisierungserfolg ist.

Gruppe der Gram-positiven MO

Wie sich bereits unter 4.2.1 auf S. 35 zeigte, wurden eine bedeutende Teilpopulation der Gram-positiven Bakterien inaktiviert. Die Auflösung auf Spezies-Ebene auf S. 135 erbrachte dahingehend einen nennenswerten Erkenntnisgewinn. Es konnte verdeutlicht werden, welche (potentiell) pathogenen MO auf Grund der milchsauen Fermentation inaktiviert wurden. Es fällt im Besonderen auf, dass gerade neben klinisch nicht relevanten, z. T. sogar als Therapeutikum oder in der Lebensmittelproduktion eingesetzten MO, wie *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lactobacillus plantarum* und *L. salivarius*, auch (potentiell) pathogene MO wie *Enterococcus faecium* inaktiviert wurden. Bei dem Vergleich der Matrizes **K** und **S** fällt zudem auf, dass die Anzahl insbesondere der pathogenen Gram-positiven Arten in Matrix K deutlich geringer ausfiel. Darüber hinaus waren alle *Staphylococcus*-Arten nach der Fermentation nicht mehr nachweisbar, obgleich Sie zu den säurestabileren MO zählen (290). Dieser Aspekt wird in der nachfolgenden Diskussion der Matrix S noch weiter vertieft. Trotz der Pathogenität der hier und auf S. 135 aufgezählten Spezies existieren auch unter jenen einige wenige Stämme, die als Probiotikum eingesetzt werden, wie z. B. *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* und *E. coli* (168). Dies verdeutlicht einmal mehr, dass die Virulenz einer Spezies stammabhängig sein kann. Nichtsdestotrotz ist die Inaktivierung der besagten Gruppe der Gram-positiven Flora als positiv im Sinne der Hygienisierung zu werten.

Gruppe der Gram-positiven Fermentationsflora

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Matrix **S** kann lediglich eine Start- bzw. Klimaxpopulation der Matrix **K** auf Grund von nur zwei Probenentnahmezeitpunkten diskutiert werden. Drei Vertreter der Familie der *Lactobacillaceae* sowie ein Vertreter der Gattung *Pediococcus* konnten nach der Fermentation in relativ hohen Konzentrationen bestimmt werden. *Lactobacillus buchneri* und *L. harbinensis* konnten lediglich in der Rindergüllematrix gefunden werden. Ob das nun ein matrixspezifischer Effekt ist oder in der 3-wöchigen Fermentationszeit begründet liegt, lässt sich auf Grund des unterschiedlichen experimentellen Designs nicht feststellen. Grundsätzlich werden Laktobazillen als nützliche Gattung betrachtet und sie erfahren als Probiotikum (399) eine häufige Anwendung, so auch *L. plantarum* und *L. salivarius* (168, 201). Cannon beschreibt jedoch auch klinisch relevante *Lactobacillus*-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten (84), obgleich Bifidobakterien sowie Laktobazillen prinzipiell als Mikroorganismen mit geringer Virulenz beschrieben werden (338). Generell wird der Anteil an Endokarditiden sowie Bakteriämien, die durch Laktobazillen verursacht wurden, auf 0,05 – 0,48 % geschätzt. Dies belegt für Hammes, gerade bei Betrachtung des geringen Anteils im Verhältnis zu der Aufnahme von hohen Konzentrationen und Artenzahlen über fermentierte Nahrungsmittel, die Unbedenklichkeit der Laktobazillen (202).

Das Vermögen von *Pediococcus acidilactici* und *L. paracasei*, Breitbandbakteriozine zu bilden, wird in **Tabelle 22**, S. 135 und **Tabelle 24**, S. 138 dargestellt sowie detaillierter in der hier nachfolgenden Diskussion von Matrix **S** ausgeführt. *Lactobacillus buchneri* produziert Bakteriozine (501), die Gram-positive MO wie *Enterococcus* angreifen, nicht jedoch Angehörige der Fermentationsflora, wie z. B. *Pediococcus*. Er kommt damit als ein Mitverursacher für die Hygienisierung in Betracht. Ähnliches gilt für *Lactobacillus harbinensis*, der Hefen antagonisiert (113).

Die Auflösung auf Spezies-Ebene erbrachte insgesamt einen relativ hohen Erkenntnisgewinn und bestätigt die Hypothese, dass eine milchsaure Fermentation stattfand und ermöglicht es darüber hinaus, eine weitere aufzustellen. Demnach könnten Bakteriozine als weiterer Faktor, neben den gemessenen chemisch-bakteriostatischen Parametern, für die Inaktivierung der zahlreichen pathogenen MO in Frage kommen.

Gruppe der Gram-positiven sporenbildenden MO

Besonders deutlich wird der Unterschied der Rindergüllematrizes zu den Klärschlammtrizes bei der Betrachtung der Gram-positiven Sporenbildner. Es konnten keinerlei anaerobe Sporenbildner oberhalb der Nachweisgrenze nachgewiesen werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die aeroben sporenbildenden MO verhältnismäßig wenig beeinflusst werden. So scheint den Daten zufolge allein *Brevibacillus agri* stark zu wachsen, obgleich das eine schwer erklärbare Ausnahme wäre. Näher liegt jedoch eine Verwechslung. Zudem wuchs *B. agri* nur auf dem aerob bebrüteten CBA, nicht auf dem anaerob bebrüteten CBA, was gegen ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen während der Fermentation spricht. Auch in der Erstbeschreibung von Laubach wird *B. agri* als aerob klassifiziert (279). Da *B. agri* auf dem CBA nur sehr zart und erhaben wächst und dem zehnfach höher konzentrierten *Corynebacterium casei* morphologisch stark ähnelt, besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass während der Zählung zum Startzeitpunkt *B. agri* als *C. casei* gezählt wurde. Erst nach der Inaktivierung von *C. casei* war lediglich *B. agri* noch auffind- und somit differenzierbar. Die Konzentration der Vertreter der Gattung *Bacillus* blieb nahezu unverändert. Daher erscheint es als naheliegend, dass versportete Mikroorganismen generell die Behandlung besser überdauern. Neben den zahlreichen bodengebürtigen, medizinisch weniger relevanten *Bacillus*-Arten existierten auch bedeutendere Arten. So ist *B. anthracis* ein Zoonoseerreger (149, 204) und *B. cereus* ein typischer lebensmittelvergiftender Mikroorganismus (149).

Es konnte beobachtet werden, dass alle nachweisbaren, nichtsporenbildenden Bakterien, mit Ausnahme der *Lactobacillaceae*, degradiert wurden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die verbleibende Flora zwar ein Infektionsrisiko für immunsupprimierte Menschen darstellen kann, jedoch in einem wesentlich geringeren Maße (202, 338) als das bei üblicher Rindergülle zu erwarten wäre.

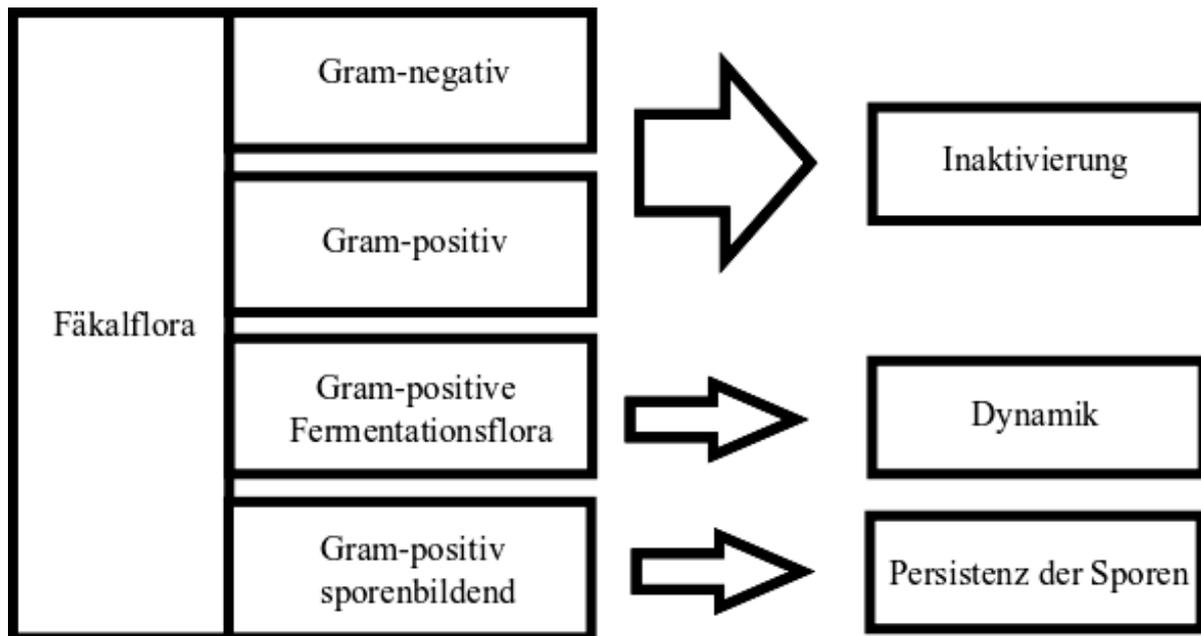


Abbildung 33: Schematische Übersicht der Florentwicklung

5.2.2.2. Klärschlammtrizes

Die Daten der Analyse der Klärschlammtrizes bestätigen die bereits unter 4.2.2 auf S. 37 gezeigten Daten und erlauben darüber hinaus eine Spezifikation. Generell lässt sich auch hier die Fäkalflora in vier Gruppen einteilen, wie in **Abbildung 33** schematisch dargestellt. Die Gram-negativen MO werden innerhalb von 3 Tagen inaktiviert, ebenso die Gram-positiven, nicht sporenbildenden MO. Lediglich die sporenbildenden MO bzw. die „Klimax-Fermentations-MO“ überdauern die Fermentation. Nach den sehr weit auseinander liegenden Probeentnahmezeitpunkten der Matrix **K** ermöglichte die engere Beprobung gerade in der ersten Woche neue Einblicke. So konnte anhand der Daten z. B. die Pionierleistung der Enterokokkenspezies *E. faecium* zu Fermentationsbeginn erkannt werden. Sicherlich ist eine Übertragung der Daten auf die unterschiedlichen Matrizes experimentell nicht gesichert, obgleich viele Gemeinsamkeiten, insbesondere in den Klimaxpopulationen, offensichtlich sind. In den folgenden Abschnitten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich einige Gattungen und Spezies der vier Gruppen diskutiert, vorrangig jene, welche einen potentiellen, in der Literatur hinterlegten Effekt auf Tiere, Menschen, Pflanzen oder das Fermentationssystem ausüben könnten. Eine Tabelle zur Bedeutung jeder ermittelten Spezies und deren Bewertung im Allgemeinen sowie in Bezug auf die milchsäure Fermentation ist darüber hinaus im Anhang auf S. 134 ff. zu finden.

Gruppe der Gram-negativen MO

Auch hier bestätigten sich die Beobachtungen, die bei der quantitativen Analyse von Matrix S gemacht werden konnten: Es wurden alle Gram-negativen Bakterien inaktiviert. Die Auflösung auf Spezies-Ebene erbrachte ebenso nur bedingten Erkenntnisgewinn, jedoch konnte auch hier verdeutlicht werden, welche (potentiell) pathogenen MO auf Grund der milchsauen Fermentation inaktiviert wurden.

Dabei sind Gemeinsamkeiten zu der Fermentation von Rindergülle offensichtlich. So wurden alle gefundenen *Acinetobacter*-Arten innerhalb von 3 Tagen inaktiviert. *Acinetobacter* spp. erlangen zunehmende klinische Bedeutung als nosokomialer Infektionserreger mit einem Anteil von ~ 9 % (249). Auf Grund des Infektionsortes, der schweren Krankheitsverläufe und seines breiten Resistenzspektrums spricht Rello (384) sogar von *A. baumannii* als „Gram-negativem MRSA“. Zahlreiche Krankheiten des ubiquitären Darmbewohners *E. coli* wurden bereits auf Seite 9 aufgezählt, daher wird an dieser Stelle darauf verzichtet. Bei der semiquantitativen Betrachtung wurde deutlich, dass auch *E. coli*, wie alle anderen *Enterobacteriaceae*, innerhalb von 3 Tagen Fermentation inaktiviert wurde. Die alleinige Ausnahme (KS 3/3), mit einem Einzelfund zum 3. Tag in mittlerer Konzentration, könnte als Fehler gewertet werden. Gleichzeitig fällt jedoch auch auf, dass allein zu diesem Zeitpunkt in dieser Probe auch *Clostridium disporicum* nachweisbar war. Dies kann ein Zufallsbefund sein oder jedoch beides ein Hinweis auf eine Fehlgärung. Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass apathogene Pseudomonaden in den KS gefunden werden konnten. Pathogene Arten wie *Pseudomonas aeruginosa* (355) wären wahrscheinlich ebenso wie alle anderen Pseudomonaden bzw. Vertreter der sehr nahe verwandten Gattung *Burkholderia* (500) in 3 Tagen inaktiviert worden. Aus diesem Grunde stellt diese Methode offensichtlich eine zuverlässige Inaktivierung von Pseudomonaden dar. *Yersinia enterocolitica* ist ein zoonotischer Erreger, dessen Reservoir-Wirt das Schwein ist. Der psychrophile Durchfallerreger verursacht mitunter schwere Darmentzündungen, aber auch Septikämien, Meningitiden, Pneumonien etc. In der Umwelt sowie im humanen Stuhl kommen jedoch auch zahlreiche avirulente Biovare vor (108). Die Biovare der avirulenten Gruppe 1A lassen sich mit Hilfe des positiven Äskulintestes relativ einfach von den virulenten Stämmen unterscheiden (69). Der in dieser Arbeit gefundene MO gehört zur Gruppe 1A. Da es sich hierbei um einen darmbewohnenden bzw. Umwelt-MO handelt, ist ein Fund in Klärschlämmen nicht unwahrscheinlich. Wie alle Gram-negativen Erreger bzw. Enterobakterien wurde dieser Erreger innerhalb von 3 Tagen Fermentation inaktiviert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Gruppe der fäkalen Gram-negativen MO zahlreiche (potentiell) (phyto-)pathogene MO enthält, die erfolgreich innerhalb von 3 Tagen inaktiviert werden konnten. Darüber hinaus wurden aber auch potentiell pflanzenförderliche MO, wie z. B. *Pseudomonas chlororaphis*, inaktiviert. Trotz der Inaktivierung von nützlichen Gram-negativen MO kann das Ergebnis als sehr positiv im Sinne der Anwendung als Hygienisierung gewertet werden. Pflanzenfördernde MO werden im Ackerboden zu finden sein und das hygienisierte, als Dünger verwendete Substrat wiederbesiedeln können. Ähnliches gilt für potentielle und ubiquitäre Krankheitserreger, jedoch ist die Vermehrungsfähigkeit von obligaten und/oder hochvirulenten Pathogenen in der Umwelt seltener, häufig wird eine s. g. „Lauerstellung“ eingenommen und somit ist insbesondere eine hohe Tenazität für Krankheitserreger von Bedeutung (487). Eine Ansteckung durch adaptierte Krankheitserreger erfolgt i. d. R. von Wirt zu Wirt. Umso entscheidender ist dementsprechend die Unterbrechung des fäkal-oralen Kreislaufs. Die Umwelt-MO infizieren hingegen i. d. R. immunsupprimierte Individuen und sind nicht auf üblichem Wege von Wirt zu Wirt übertragbar. Einige Virulenzfaktoren sichern dabei gleichzeitig das Überleben in der Umwelt. Diese Pathogenese stellt lediglich eine alternative Variante dar. Vormalig als apathogen beschriebene Stämme können laut Casadevall auch durch eine Wirtspassage Virulenzfaktoren (wieder)erlangen (86). Insofern erscheint auch auf Grund der Feststellungen Casadevalls eine Unterbrechung dieses Infektionskreislaufs als erstrebenswert.

Gruppe der Gram-positiven MO

Auch bei dieser Gruppe waren die Gemeinsamkeiten zur Matrix **K** offensichtlich. Eine bedeutende Teilpopulation der Gram-positiven Bakterien wurde inaktiviert. Die Auflösung auf Spezies-Ebene (S. 134 ff.) zeigte deutlich, welche (potentiell) pathogenen MO auf Grund der milchsäuren Fermentation inaktiviert wurden bzw. welchen Einfluss sie auf die Fermentation nahmen. Es fällt im Besonderen auf, dass gerade neben klinisch nicht relevanten, z. T. sogar als Therapeutikum oder in der Lebensmittelproduktion eingesetzten MO, wie *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus plantarum*, (potentiell) pathogene MO inaktiviert wurden. So waren alle *Staphylococcus*-Arten nach der Fermentation nicht mehr nachweisbar, obgleich sie zu den säurestabileren MO zählen, so ist z. B. *S. aureus* in der Lage, pH 2,5 zu überleben (290). Da sowohl die gemessenen pH-Werte als auch die gemessenen VFAs-Konzentrationen weder in der Literatur (290) noch im Experiment (S. 48) für eine Bakterizidie ausreichen, scheinen weitere Effekte in Betracht zu

kommen. Bei der späteren Betrachtung der fermentationsrelevanten *Lactobacillaceae* wird daher verstärkt auf die Bakteriozinbildung eingegangen.

Enterokokken werden in der Regel zumeist ebenso schnell inaktiviert. Eine bedeutende Stellung jedoch, auf Grund des obligaten Vorhandenseins in den Klärschlämmen sowie ihrer bedeutenden klinischen Relevanz, nehmen zwei Arten ein. Der Anteil von *E. faecalis* an Enterokokkeninfektionen beträgt rund 80% (236). Sie nehmen zudem unter nosokomialen Infektionserregern auf Grund ihrer breiten Resistenzspektren sowie ihres häufigen Auftretens im menschlichen Darm einen folgenschweren Platz ein. Insbesondere virulente Stämme produzieren häufig Zytolysine. Zu den üblichen Krankheitsbildern zählen Bakteriämien, Wund- und Harnwegsinfektionen. Septikämien enden in 7 – 50 % der Fälle tödlich (245). Da für die Darmflora typisch, ist die Häufigkeit und Konzentration der Funde nicht verwunderlich. Das punktuelle Auftreten in einer Probe von KS 2 und KS 7 weist auf Schwächen des Plattenzählverfahrens in der Konkurrenzsituation hin. Bereits nach 3 Tagen sank die Konzentration des Erregers mindestens um den Faktor 10 bzw. unter die Nachweisgrenze. Nach 7 Tagen war der Erreger nicht mehr nachweisbar. (nicht so in Abwesenheit von Weizenkleie, vgl. hierzu S. 142). *E. faecium* ist nach *E. faecalis* der zweitbedeutendste humanpathogene Erreger unter den Enterokokken, der nahezu die restlichen 20% der Infektionen ausmacht (236). Zwar sind keine zytolysinbildenden Stämme bekannt (236, 475), jedoch besitzt *E. faecium* ein noch breiteres Resistenzspektrum (236). Wie zu erwarten war, findet sich in nahezu allen Schlämmen das Darmbakterium. Dabei fällt zudem zweierlei im Vergleich zu *E. faecalis* auf. Zum einen war *E. faecium* in jedem Schlamm vorhanden (KS 1 wurde zum 3. Tag nicht untersucht), zum anderen wuchs die Population innerhalb der ersten 3 Tage der Fermentation, um daraufhin zum 7. Tag wieder stark abzufallen, während die *E. faecalis*-Population bereits zum 3. Tag hin deutlich sank bzw. spätestens bis zum 7. Tag komplett inaktiviert war. Nach 14 – 21 Tagen Fermentation konnten in keiner Untersuchung Enterokokken nachgewiesen werden. Zwar sind unter **Abbildung 7** (S. 36) und **Abbildung 9** lediglich Matrizes auf Rindergüllebasis dargestellt, jedoch handelte es sich bei der dominierenden Enterokokkenspezies auch bei den Rindern um *E. faecium*. Sicherlich setzt sich ein Klärschlamm anders zusammen als Rindergülle, sodass Eiweiße oder Detergenzien einen protektiven oder destruktiven Effekt ausüben könnten, jedoch ist die Tendenz des Konzentrationsabfalls bereits zum 7. Tag deutlich in Richtung untere Nachweisgrenze erkennbar. Dass es zum 3. Tag hin zu einem massiven Wachstum von *E. faecium* kam, ist vielleicht auf die besonders breite enzymatische Ausstattung zurückzuführen. So ist diese Spezies zum Abbau von Gluconsäure und ähnlicher organischer

Säuren zur Energiegewinnung befähigt (281). Der nach den beiden Entdeckern benannte Entner-Doudoroff-Weg ist unter Gram-positiven Mikroorganismen gänzlich unüblich (303) und könnte somit einen Vorteil (53) gegenüber *E. faecalis* in diesem begrenzten Zeitfenster der Fermentation darstellen. Zudem ist *E. faecium* in der Lage, potente Breitbandbakteriozine zu bilden, die zum einen *E. faecalis*, Listerien und Staphylokokken stark hemmen, und zum anderen Laktobazillen sowie Pediokokken und Laktokokken kaum bis gar nicht beeinflussen (94). Somit könnte dies ein Indiz dafür sein, dass *E. faecium* eine Art Pionierspezies darstellt, die die milchsaure Fermentation sowie die Etablierung von *Lactobacillaceae* fördert. Denn ähnlich den verwandten *Lactobacillaceae* (121) (gleiche Ordnung), produzieren Enterokokken im Allgemeinen fermentativ Laktat sowie Azetat, Ethanol und Formiat (281).

Wenngleich taxonomisch sehr weit auseinanderliegend (unterschiedliche Domänen!), werden die Hefen auf Grund ihres Absterbe- und Gram-Verhaltens ebenfalls in der Gruppe der Gram-positiven MO aufgezählt. Sie scheinen für die Fermentation keine Bedeutung zu haben, da unabhängig von ihrer Anwesenheit die Fermentation stattfand. Die klinische Bedeutung der Sprosspilze nimmt jedoch zu (156, 489), daher ist deren Inaktivierung positiv zu werten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Gruppe der fäkalen Gram-positiven MO zahlreiche (potentiell) pathogene MO enthält, die erfolgreich innerhalb von 3 – 7+ Tagen inaktiviert werden konnten. Darüber hinaus wurden aber auch klinisch unbedenkliche MO wie z. B. *Bifidobacterium* spp. inaktiviert. Trotz der länger dauernden Inaktivierung von Gram-positiven MO kann das Ergebnis als sehr positiv im Sinne der Anwendung als Hygienisierung gewertet werden.

Da die Inaktivierung der Enterokokken z. T. deutlich länger dauerte als die Inaktivierung von Gram-negativen MO, erscheint die Verwendung von *Enterococcus* (*faecium*) als Indikatorgattung(-spezies) für den Fermentationserfolg, vergleichbar mit den Coliformen bzw. *E. coli* für die Trinkwasserverordnung (134), sinnvoll.

Gruppe der Gram-positiven Fermentationsflora

Wie bereits unter 4.2.2 auf S. 37 und bei Matrix **K** beobachtet, war die Population der Familie der *Lactobacillaceae* dynamisch. So können neben der zuvor diskutierten Spezies *E. faecium* mehrere Vertreter der Gattung *Lactobacillus* sowie zwei Vertreter der Gattung *Pediococcus* als fermentationsrelevante Flora auf Grund ihrer Dynamik benannt werden. Die Auflösung auf Spezies-Ebene erbrachte dahingehend hohen Erkenntnisgewinn und warf neue Fragestellungen auf. Es konnte verdeutlicht werden, welche *Lactobacillaceae* zu welchem

Zeitpunkt dominierten und welche Interaktionen potentiell möglich erscheinen (**Tabelle 24**, S. 138). Als besonders relevant neben den potentiell relevanten *Lactobacillus*-Spezies konnten *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. kitasatonis*, *L. mucosae*, *L. paracasei* und *L. reuteri* ausgemacht werden.

Mit Blick auf **Tabelle 24** lässt sich feststellen: Laktobazillen werden als ungefährlich eingestuft bzw. in vielen Fällen als gesundheitsfördernde Probiotika eingesetzt (46, 202). Einige auch in 5.2.2.1 diskutierte Ausnahmen klinischer Isolate relativieren geringfügig diese generelle Aussage für immungeschwächte Patienten. Auf Grund ihrer stark zunehmenden, zum Teil auch sehr dynamischen Abundanz (vgl. *L. paracasei* und *L. reuteri*) während der Fermentation, ihrer bakteriziden Stoffwechselprodukte und ihrer weitverbreiteten Fähigkeit, (Breitband-)Bakteriozine zu bilden, haben sie vermutlich nebst den Pediokokken eine herausragende Bedeutung bei der Inaktivierung der Fäkalflora.

Bei den Pediokokken sind viele Ähnlichkeiten zu den *Lactobacillaceae* zu erkennen. Als besonders relevant können beide Spezies, *Pediococcus acidilactici* und *P. pentosaceus*, bewertet werden. Pediokokken werden ebenso wie *Lactobacillaceae* häufig als Probiotika bzw. bei der Fermentation von Lebensmitteln eingesetzt (124, 161, 326). Zudem wurden auch in dieser Gattung sehr seltene Fälle von potentiell virulenten, klinische Isolate beschrieben (38, 104, 188, 400). Diese ebenso bakteriozid wie bakteriozinbildende Gattung (50, 95, 361) hat vermutlich, auf Grund der hohen festgestellten Konzentration der einzelnen Vertreter, einen vergleichbar hohen Einfluss auf den Florenwechsel wie die *Lactobacillaceae*. Dabei weisen beide Spezies eine deutliche Dynamik auf: Schnell wachsende und wieder z. T. langsam absinkende Konzentrationen konnten während der Fermentation beobachtet werden. Dabei scheinen auch beide Gattungen derselben Familie in häufiger Interaktion zu stehen.

So wirkt das „Pediocin AcH“ gegen *Lactobacillus plantarum* (49), was in KS 2 zu der Reduktion von ebendiesen geführt haben kann. Beide MO wurden nie zum gleichen Zeitpunkt nachgewiesen, *L. plantarum* tauchte in Probe 4 sogar alternierend auf. *P. pentosaceus* ist in der Lage, Bakteriozine gegen Gram-positive MO zu bilden (361). Dabei konnte Okereke (347) sogar eine sporozide Wirkung gegenüber *Clostridium botulinum* (Typ A und B) nachweisen. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, warum auch die Konzentration der versporteten Clostridien abnahm. Der Omnipräsenz von *P. pentosaceus* steht die Abwesenheit des MO in KS 6 und 9 gegenüber. Da für KS1 keine Daten am Tag 3 vorliegen, kann eine Anwesenheit zum Tag 3 nicht ausgeschlossen werden, zum 7. Tag hin nahm die Konzentration in den meisten KS bereits wieder ab, sodass auch in KS1 ggf. eine vorhandene

Population unter die Nachweisgrenze gefallen sein könnte, wie bei KS 4 und 7. Dass in KS 6 kein *P. pentosaceus* gefunden wurde, wurde bereits im Zusammenhang mit dem potentiellen Antagonismus von *L. crispatus* in **Tabelle 24** angezeigt. Auch fällt bei dem Vergleich der Daten von *P. pentosaceus* und *L. reuteri* auf, dass bei KS 4, 6 und 9 auf die Probe genau kein paralleles Auftreten beider MO stattfand. Bei KS 4 wird es besonders deutlich, da in den Proben 1 bis 3 *L. reuteri* gefunden wurde, jedoch nicht *P. pentosaceus*, bei KS 4/4 war es genau umgekehrt. Lediglich die Daten von KS 2 der Proben 3 und 4 widersprechen dieser Vermutung, was ggf. auf einen anderen Stamm mit einer anderen Bakteriozin-Ausstattung zurückgeführt werden kann oder auf weitere Interaktionen mit z. B. *L. amylovorans*, wie in **Tabelle 24** zu sehen ist. Auf Grund der Abundanz des MO scheint *P. pentosaceus* eine herausragende Rolle während der Hygienisierung zuzufallen. Darüber hinaus scheint diese ökologische Nische auch von anderen MO besetzt werden zu können, wie die Abwesenheit des MO in einigen Schlämmen zeigt. Möglicherweise können in zukünftigen Untersuchungen funktionelle Cluster ermittelt werden, in denen unterschiedliche Spezies ähnliche Mikrohabitatsansprüche haben und sich daher gegenseitig stärker antagonisieren. Gleichzeitig könnten sie auch ähnliche Fermentationsleistungen gegenüber der Fäkalflora erbringen, wie die Bildung von VFAs sowie Bakteriozinen. Für eine zukünftige Prozesssteuerung erscheint aber auch eine Starterkultur sinnvoll, sollte es eine unterschiedliche Sporozidie der Bakteriozine der verschiedenen Spezies geben.

Anhand von *P. pentosaceus* wird im besonderen Maße deutlich, wie komplex und vage die dargestellten Zusammenhänge sind. Umso wichtiger scheint zukünftig eine genauere zeitliche Auflösung und eine Untersuchung auf bekannte und unbekannte Bakteriozine bzw. deren kodierende DNS.

Für einen kumulativen Effekt verschiedener Faktoren während des Fermentationsprozesses spricht die Beobachtung von Kalchayanand. Die Arbeitsgruppe konnte anhand des Beispiels Pediocin zeigen, dass kälte-, hitze- oder säuregestresste MO sensibler auf Bakteriozine reagieren können. Dabei variierte die Reaktion von keiner bis hin zu einer sehr stark erhöhten Sensibilität gegenüber dem Bakteriozin. Zuweilen reagierten nun auch Gram-negative MO, die ohne Stress keine Reaktion zeigten (253). Da die verschiedenen Matrices vor dem Versuch eingefroren waren, könnte hier durchaus eine Kältestressschädigung vorliegen. Jedoch erfolgte das Auftauen schonend bei Zimmertemperatur und die Bebrütung erst im Anschluss bei 37°C. Zudem wurden die darin enthaltenen potenziellen Bakteriozinbildner ebenso gefroren. Auch bei ihnen wird mit Sicherheit eine Kälteschädigung vorgelegen haben,

sodass während der Adaptionszeit Bakteriozinbildner sowie deren Adressaten subletale Kälteschäden behoben haben könnten. Der Säurestress nahm hingegen während der Fermentation zu. Insofern könnte mit dem Absinken des pH-Wertes neben der Wirksamkeit der VFAs auch die Wirksamkeit einiger Bakteriozine erhöht worden sein.

Gruppe der Gram-positiven sporenbildenden MO

Wie sich bereits in anderen Experimenten zeigte, wurden sporenbildende MO verhältnismäßig wenig beeinflusst. Die Auflösung auf Spezies-Ebene erbrachte dahingehend Einblicke, dass es zwar zu einem Abfall der Konzentration der (hitzebeständigen) Sporen kam, jedoch vereinzelt Spezies existierten, die unter Fermentationsbedingungen wachsen können. Generell bleibt dabei zu betonen, dass vermeintliche Populationszuwächse, die mittels Keimzählung bestimmt worden sind, artifiziell sein können. Während es im Zuge der Fermentation zu einem Wegfall ganzer Gruppen an Keimen kam, entfiel auch beim Plattenzählverfahren ein hohes Konkurrenzpotential, wahrscheinlich auch eine starke quorum sensing/quenching-Interaktion. Konnten vor der Fermentation mitunter nur *B. cereus* oder *C. perfringens* auf Grund ihrer markanten Hämolyse unter dem Bakterienrasen festgestellt werden, wuchsen sie nach der Fermentation vereinzelt. Folglich sollten geringe Zuwächse vorsichtig bewertet werden, wohingegen geringe Abnahmen weniger fehlerbehaftet erscheinen. Starke Abnahmen hingegen scheinen ebenso unrealistisch, da die Sporenpersistenz mehrfach (z. B. unter 4.3.1.2 S. 43) experimentell nachgewiesen wurde. Generell kann die Gruppe der sporenbildenden MO in aerobe und anaerobe Sporenbildner, die Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* eingeteilt werden. Auch die vormals zu *Bacillus* gehörend gezählten Gattungen *Lysinibacillus* und *Paenibacillus* werden der Übersicht halber zur *Bacillus*-Untergruppe gehörend gezählt. Während jene i. d. R. nicht anaerob vermehrungsfähig sind, wachsen Clostridien i. d. R. nicht aerob. Folglich wäre eine Vermehrung der Anaerobier bei einer anaeroben Fermentation wahrscheinlicher. Die klinische Relevanz der Gattungen ist ebenfalls sehr unterschiedlich. Während *Bacillus* lediglich die pathogene Spezies *B. anthracis* sowie einige weniger pathogene Arten und Lebensmittelverderber (z.B. *B. cereus*) enthält, gibt es zahlreiche pathogene *Clostridium*-Spezies (z.B. *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. septicum*) sowie neurotoxinbildende Spezies (*C. tetani*, *C. botulinum*). *Bacillus cereus* wurde in nahezu allen Proben gefunden, was für einen ubiquitären Bodenbewohner auch nicht unüblich erscheint. Medizinisch ist er als Lebensmittelverderber relevant (149). Im Rahmen der semiquantitativen Betrachtung der Spezies muss man feststellen, dass ähnlich den *Bacilli* in der Rindergülle die Population auf gleichem Niveau bleibt. Auf Grund der sehr nahen Verwandtschaft (216) von

B. cereus zu *B. anthracis* kann er auch durchaus als Modellorganismus für den Milzbranderreger betrachtet werden. Folglich wäre eine Dekontamination von milzbrandhaltigem Fäkalabfall mit dieser Methode nicht realisierbar. Zusammenfassend lässt sich unter der semiquantitativen Betrachtung der Konzentrationsveränderungen der Spezies feststellen, dass sich die Gattung *Bacillus* von dem Fermentationsvorgang kaum beeinflussen lässt. Wie in der **Tabelle 25**, S. 140, sowie auch in den quantitativen Ergebnissen auf S. 37 dargestellt, kam es zwar zu einer signifikanten, geringen Reduktion der Clostridien, jedoch nicht unter die Nachweisgrenze. Während nahezu die meisten Spezies in der Spore überdauerten, bzw. deren Konzentration sank, konnte bei wenigen Spezies ein dynamischer Populationsverlauf beobachtet werden. Dazu zählen *C. celerecrescens*, *C. bifermentans* und *C. clostridioforme*. Während die Virulenz von *C. celerecrescens* als äußerst gering eingeschätzt werden kann, da erst 2004 der erste klinische Fall beschrieben wurde, ist die von *C. bifermentans* und *C. clostridioforme* als umstritten und potentiell krankheitserregend zu werten. *C. perfringens* kommt nahezu obligatorisch im Darm von homoiothermen Omnivoren sowie Carnivoren vor. Die verschiedenen durch diesen Erreger hervorgerufenen Krankheiten sind auf S. 9 genauer beschrieben. Die Omnipräsenz dieses Erregers spiegelte sich auch in den Funden wieder, nicht zuletzt auch durch die gute Differenzierbarkeit auf Grund der sehr gut sichtbaren Doppelzonenhämolyse, die selbst bei sehr starker Konkurrenz durch andere KbE meist erkennbar blieb. Da es sich hierbei um die abundante Clostridienspezies handelt, mit Ausnahme der oben genannten mutmaßlichen Fehlfermentationen (vgl. *C. bifermentans*, *C. celerecrescens* sowie *C. clostridioforme*), ist das Absinken der *C. perfringens* Konzentration im Verlauf der Fermentation auch maßgeblich für den signifikanten Abfall der Clostridienzahl, wie auf S. 37 gezeigt. Wie bereits zuvor diskutiert, kann nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob lediglich die vegetativen Zellen oder auch die Sporen der *C. perfringens* Population inaktiviert wurden. Die quantitative Untersuchung der SSR im MPN-Verfahren deutet ebenso auf eine Reduktion der Sporen bzw. zumindest auf eine eingeschränkte Hitzebeständigkeit der Spore hin (vgl. S. 37).

Generell kann man im Anbetracht der quantitativen Ergebnisse sowie der Betrachtung auf der Speziesebene mit semiquantitativen Angaben feststellen, dass es in den meisten Fällen zu einer Reduktion auch der pathogenen Clostridienlast in den KS-Matrizes kam. Jedoch muss zudem festgestellt werden, dass in wenigen Proben eine Vermehrung von potentiellen pathogenen Clostridien auftrat. Dies erscheint im Hinblick auf das anaerobe Milieu durchaus realistisch, bleibt aber die Ausnahme. Die Ursachen für diese Ausnahmen bedürfen dagegen noch einer Klärung, bevor die milchsäure Fermentation als unbedingt empfehlenswert für die

biologische Dekontamination von Fäkalien erklärt werden kann. Eventuell könnte bereits eine Umstellung des leicht fermentierbaren Materials bereits Erfolg versprechen, da Weizenkleie einen hohen Anteil an Proteinen enthält (~15 %) (285), der das Wachstum von proteolytischen Erregern wie Clostridien wahrscheinlich begünstigt. Zudem sollte eine Alternative gefunden werden, da Weizenkleie ein Lebens- bzw. Futtermittel darstellt. Ein späterer Anstieg der Clostridienzahl innerhalb von 21. Fermentationstagen konnte in einem weiteren Experiment (**Abbildung 49**, S. 124) nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lassen sich bei der Betrachtung der **qualitativen Fermentations-Ergebnisse** die quantitativen Ergebnisse bestätigen. Gram-negative und Enterokokken ($t > 7$ d) sowie Hefen wurden inaktiviert. Enterokokken und *Lactobacillaceae* hatten eine hohe auf- und absteigende, phasenverschobene Dynamik und werden als Hauptursache für die Fermentation sowie der Floraverschiebung identifiziert. Die Flora enthielt nach der Fermentation weitaus weniger potentiell pathogene Erreger als zuvor, und kann damit als deutlich weniger gefährlich bewertet werden. In 6 von 37 Fällen (16,2 %) kam es trotz des generell signifikanten Abfalls des Medians der Keimzahl der Clostridien zu einem Anstieg von bestimmten Clostridienspezies (vgl. *C. bifermentans*, *C. celerescrescens* sowie *C. clostridioforme*), die mit Ausnahme von *C. celerescrescens* als kritisch betrachtet werden müssen (3 von 37, 8,2 %). Die Ursachen dafür sollten in zukünftigen Arbeiten genau untersucht werden. Eventuell ist es mit einfachen Prozesssteuerungseingriffen möglich, die Entwicklung von Clostridien noch weiter zu unterdrücken. So erscheint Kleie auf Grund ihres hohen Proteingehaltes (318) als geeignetes Substrat für eine proteolytische Gattung wie *Clostridium*. Generell wurden versportete MO weniger stark beeinflusst als nicht sporenbildende MO. Folglich erscheint diese Hygienisierungsmethode nützlich bei der Dekontamination von unversporteten MO in fäkalen Abfällen. Die generelle Inaktivierung von Enterobakterien sowie Enterokokken ($t \geq 7$ d) stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber alternativen Hygienisierungen dar. Im Vergleich zu einer herkömmlichen Pasteurisierung in einer Biogasanlage, bei der es spätestens während der Lagerung zu einer Wiederausbreitung von Coliformen und Enterokokken kommen kann (35) bzw. im Vergleich zur Kompostierung, bei der es zwar zu einer Reduktion beider Taxa kommt, jedoch dauert dieser Vorgang Wochen bis Monate. Zudem verblieb eine nicht unerhebliche, mittlere Restkonzentration ($4 \log_{10}$ KbE/g) an Fäkalbakterien im Kompost erhalten (363). Sporenbildende MO überstanden alle drei Methoden relativ unbehelligt. Dass eine Wiederbesiedlung mit Fäkalkeimen in keiner

der milchsauer fermentierten Matrices beobachtet werden konnte, ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den konservierenden Charakter der Methode zurückzuführen (201). Es ist daher davon auszugehen, dass, solange das fermentierte Gut unter Sauerstoffabschluss verbleibt, eine Wiederbesiedlung mit Fäkalkeimen nicht stattfindet. Abschließend kann man unter der qualitativen und quantitativen Betrachtung der milchsäuren Fermentation Enterokokken als Indikatorkeimgruppe vorschlagen. Sie gehören zu den obligaten Darmbesiedlern und konnten in jedem KS gefunden werden, zudem zählen sie zu den MO, die als letzte inaktiviert wurden.

5.2.3. Hygienisierung von pathogenen MO in Rindergülle Matrices

5.2.3.1. Tenazität von pathogenen Bakterien.

Die Ergebnisse der hygienisierungsexperimente verdeutlichen, dass eine Inaktivierung der jeweils inokulierten Erreger unabhängig von der Zugabe der Laktobazillensuspension EM erfolgt. Dies hat zum einen den monetären Vorteil, dass eine finanziell bedeutsame Komponente entfallen kann, und zudem auch die Notwendigkeit einer Starterkultur in Frage gestellt ist, sofern die Sporozidie besonderer Bakteriozinbildner nicht notwendig erscheint. Die rindergülle-inhärenten Milchsäurebildner sind an das Milieu wohl deutlich besser angepasst als die hinzugegebenen MO aus der EM-Suspension. Deutlich wird auch, dass die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Erhebungen aus 4.2.1.1.1 auf Seite 35 sowie aus 4.2.3.1 auf Seite 39 einige Parallelen aufweisen. Unversportete MO, auch in sehr hohen Konzentrationen, die nicht zu den *Lactobacillaceae* gehören, wurden inaktiviert. Nichtsdestoweniger ist das experimentelle Design dieser Erhebung suboptimal und hatte eher Vorexperiment-Charakter. Zwar wurde die Animpfmenge mit einer Doppelbestimmung erhoben und dann die Verdünnung errechnet, jedoch weder Wiederfindungsrate bestimmt, noch eine ausreichende Menge zu Beginn der Messung ausgezählt, um eine Standardabweichung darstellen zu können. Es wurden nach drei Tagen Fermentation alle Proben ausgezählt. Die Aussage über eine generelle Inaktivierung, unabhängig vom Zusatz von Laktobazillen, kann getroffen werden. Diese entspricht den qualitativ und quantitativ erhobenen Daten (4.2.1.1.1 und 4.2.1.1.2 sowie 4.2.3.1). Jedoch können ungleichmäßige Verteilungen der pathogenen MO oder Wiederfindungsraten nach der Zugabe und Vermischung nicht angegeben werden. Auf Grund dessen wurde das experimentelle Design für die weiteren Untersuchungen verbessert. Trotz alledem konnte aus diesem Experiment eine neue These aufgestellt werden, nämlich, dass die bzw. Teile der inhärenten Fäkalflora zu einer Inaktivierung der pathogenen Bakterien führt. Deutlich später wurden die Experimente

mit *M. fortuitum* durchgeführt. Gut erkennbar ist in **Abbildung 15** (S. 43) die Inhibition des MO auf dem supplementierten NB, dies liegt mutmaßlich an den Antibiotika. So dauerte das Wachstum deutlich länger (4 vs. 9 Tage), um ähnlich große Kolonien zu erhalten, obgleich der NB wachstumsfördernde Supplemente wie Glucose und Glycerol enthält (165, 377, 393). Zudem zeigte sich, dass die Bebrütungstemperatur von 37°C zu hoch gewählt war. Nach der erneuten Betrachtung von nicht sofort nach der Erstablesung entsorgten Platten zeigte sich ein besseres Wachstum bei 25°C. Aus diesem Grunde wurden alle Platten nach der 37°C-Inkubation noch weitere 3 Tage bei 25°C bebrütet. Das änderte zwar nichts an der Zahl der KbE, jedoch war die kolonimorphologische Differenzierung deutlich einfacher. Trotz verzögerten Wachstums konnte mit Hilfe des supplementierten NB die Nachweisgrenze ab dem dritten Fermentationstag deutlich reduziert werden, und es konnten keine Mykobakterien nachgewiesen werden, woraus sich schließen lässt, dass die Mykobakterien die Fermentation nicht überstehen. Nach Ziehl-Neelsen und Rakette gefärbte Präparate der Animpfkultur zeigten keine Sporen, was eine Sporenkonzentration von $< 5 \log_{10}$ KbE/g impliziert. Insofern ist es durchaus möglich, dass es sich mit der Animpfsuspension ähnlich wie bei *C. perfringens* (vgl. 5.2.3.2) verhält und die Sporenkonzentration der potentiellen Sporenbildner unter Laborbedingungen unter der Nachweisgrenze liegt. Die Arbeit von Ghosh (175) zeigt, dass die Sporen der Mykobakterien durchaus in der Lage wären, extreme Stressbedingungen zu überdauern, welche die vegetativen Zellen nicht überleben würden. Insofern kann mit diesen Ergebnissen keine Aussage zu versporteten Mykobakterien getroffen werden. Neben dem Test der Tenazität einzelner MO stellt sich die Frage, ob auch ein Mix an Erregern sowie versportete MO inaktiviert werden können, so wie sie in Fäkalien (von [Tier-]Kliniken) wahrscheinlich sind.

5.2.3.2. Tenazität von pathogenen Bakterien in autoklavierten Matrices

Diese und weitere Fragestellungen (5.2.3.1) sollten in diesem Versuch beantwortet werden. Die Experimente wurden ursprünglich ebenfalls mit und ohne EM, also Matrices **KEM** und **K(EM)_a** sowie **(KEM)_a** und **(K(EM))_a**, entwickelt. Auf Grund der auch hier sehr ähnlichen Ergebnisse wird auf eine gesonderte Darstellung verzichtet und werden lediglich Matrix KEM und (KEM)_a diskutiert. Es zeigte sich, dass sich die Technik von Linde (292) zur Selektion von resistenten Stoffwechselluftmutanten bewährte und den Nachweis erleichterte. Die Wiederfindungsrate entsprach der Animpfdosis, zudem ermöglichte das Versuchs- und Nährbodendesign eine schnelle Differenzierung und Auszählung der pathogenen MO trotz Begleitflora ohne zeitaufwendigere Differentialdiagnostik. Die Verwendung von Stoffwechselluftmutanten könnte zu einer gleichzeitigen Verringerung der

Umweltstresstoleranz des Testorganismus führen. Linde konnte jedoch darstellen, dass diese Mutationen auch zur Stresstoleranzerhöhung im Vergleich zu den Elternstämmen beitragen können (293). Bakterien sind in der Lage, auf verschiedenste Umweltstressoren zu reagieren. So stabilisieren sie z. B. Zellwände mittels Oligosacchariden, um auf osmotischen Stress zu reagieren (110). Auch eine hyper- bzw. hypotone Bebrütung der Bakterien vor der Einbringung in die Matrizes konnte keine verbesserte Tenazität der Erreger in dem beobachteten Zeitraum mit sich bringen. Wie zuvor die einzeln getesteten pathogenen Bakterien, werden diese auch als Gemische in nicht autoklavierten Matrizes inaktiviert. Dass auch *C. perfringens* inaktiviert wurde, verdeutlicht, dass auch vegetative Formen von Sporenbildnern inaktiviert werden. Wie Gram-Präparate zeigten, sporulierte *C. perfringens* nicht im RCM-Medium, und auch das MPN-Verfahren konnte keine Sporenkonzentrationen über der Nachweisgrenze ermitteln. *C. sporogenes* hingegen hatte eine Sporulationsrate von ~50% und wurde nicht inaktiviert. Verglichen mit den SSR und der Clostridienzahl in **Abbildung 10** (S. 39) sowie den Daten von *C. perfringens* in **Tabelle 19** (S. 46) fällt auf, dass dort der Erreger nicht so stark inaktiviert wurde, was auf eine Versporung des MO im KS rückschließen lässt. Es wird deutlich, dass eine autoklavierte Matrix keinen bzw. nur einen schwachen inaktivierenden Effekt auf die Pathogene ausübte. Vielmehr scheint die Interaktion der Pathogene miteinander in autoklavierten Matrizes ausschlaggebend zu sein. So war die gemeinsame Inkubation von *C. perfringens* und *C. sporogenes* nicht möglich, da letzterer Erregerstamm vom ersteren inhibiert wurde. Hemmungen von Clostridien untereinander wurden bereits 1975 beschrieben (430). Generell werden Bakteriozine nicht nur von *Lactobacillaceae* gebildet, sondern von vielen verschiedenen Taxa (386, 448). Obgleich sich einige Erreger während der Fermentation vermehrten bzw. in ihrer Konzentration abnahmen, wurde jedoch kein Pathogen in der autoklavierten Matrix unter die Nachweisgrenze inaktiviert. Folglich scheint die gesamte Kotflora oder zumindest ein Teil davon notwendig für die Hygienisierung. Andererseits stellt die Dampfsterilisation eine nicht unerhebliche Manipulation der Matrix dar, z. B. durch die Denaturierung von Eiweißen. Somit wäre auch eine Denaturierung von Bakteriozinen auf Eiweißbasis denkbar. Eine Gammasterilisation wäre gegebenenfalls eine schonendere und damit bessere Methode gewesen, da die Gamma-sterilisierte Matrix ggf. besser mit der Ausgangsmatrix vergleichbar gewesen wäre. Der erwähnte Unterschied der *C. perfringens*-Population in den Matrizes **(KEM)_a** und **(K(EM)_a)_a** könnte auf eine stärkere Hitzeinaktivierung von Bakteriozinen der nunmehr doppelsterilisierten EM-Suspension hinweisen, die gegen *C. perfringens* wirksam sind.

5.2.3.3. Tenazität von ECBO-Viren

Da der Virustiter pro Probe und Zeitschritt mit Hilfe einer Titration (MPN) auf Zellkulturen bestimmt wurde, brauchte es bereits 3 Keimträger pro Einzelwert. Folglich war die Anzahl der Bestimmungen stark begrenzt und eine Beschränkung auf 2 Wiederholungen pro Variante und Zeitschritt erschien als kleinster gemeinsamer Nenner, um möglichst viele Informationen mit einer gewissen Aussagekraft zu erhalten. Aus diesem und auf Grund des obligatorischen Vorhandenseins einer Fäkalflora für die Inaktivierung von pathogenen Bakterien wurde auf Varianten mit komplett autoklavierter Matrix verzichtet. In Folge der Über-Nacht-Inkubation schienen die Viruspartikel so stark mit den Keimträgern assoziiert zu sein, dass das Einbringen in die Matrix sowie das Mischen der Matrix zu keiner nennenswerten Reduktion des Titers führte. Im Zuge der lediglich zwei erhobenen Werte pro Zeitpunkt und Variante erlaubt der Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten in den beiden Matrices keinen gesicherten statistischen Rückschluss, jedoch scheint es eine Tendenz zu einem langsameren Abbau in der Anwesenheit von EM zu geben. Ob dies mit dem niedrigeren pH-Wert zusammenhängt (vgl. **Abbildung 21** S. 47) oder ggf. mit protektiven Proteinen, die bei dem autoklavierten EM-Zusatz bereits denaturiert wurden, ist ungewiss. Relativ sicher scheint aber die Inaktivierung des Virus innerhalb einer 14-tägigen Fermentation. Dass eine temperaturabhängige Inaktivierung erfolgen kann, ist bereits von Boegel beschrieben worden, der einen Abfall von $0,5 \log_{10}$ CpE/g je Tag bei 37°C beobachtete (61). Zudem sind neben Temperatur- auch Matrixeffekte essentiell, wie Nazir darstellen konnte (335). Ähnliches beschrieb Lund, der eine Titerreduktion um $4 \log_{10}$ CpE/g bei 35°C innerhalb von 219 h in physiologischer Kochsalzlösung beobachtete, jedoch innerhalb von 23 h in einer Mist-Bentonit-Mischung unter anaeroben Bedingungen bei einem pH von 8. Im Gegensatz dazu stellte Biermann eine sehr hohe Tenazität von ECBO-Viren in Rindergülle dar. Er beobachtete bei 20°C Lagertemperatur einen Abfall von lediglich $2 \log_{10}$ CpE/g in 26 Wochen. Eine zukünftige Möglichkeit, um Matrixeffekte zu spezifizieren, wären weitere Untersuchungen mit den Keimträgern lediglich in einer feuchten, anaeroben Kammer. Darauf aufbauend sollten weitere Versuche bei niedrigeren Temperaturen vorgenommen werden, um eine Praxisrelevanz unter Feldbedingungen zu untersuchen.

5.2.3.4. Tenazität von *Ascaris suum*-Eiern

Auf eine Untersuchung der unbehandelten Rindergülle auf *Ascaris* sp.- Eier wurde verzichtet, da bovine Askaridosen zwar möglich, aber eher selten sind (169), und die Rinder keinerlei Klinik aufwiesen. Die *Ascaris*-Eier blieben während der ersten 21 Fermentationstage nahezu unbeeinflusst. Jedoch konnte ein negativer Effekt auf die Embryonierungsrate im weiteren

Zeitraum von 5 Wochen beobachtet werden, der mutmaßlich auf die Temperatur zurückzuführen ist. Germans konnte einen schädigenden Effekt von Temperaturen von 37°C über einen längeren Zeitraum für den sehr nah verwandten (12) *A. lumbricoides* nachweisen (174). Seamster beschrieb die optimale Embryonierungstemperatur für *A. suum* mit 31,3°C und steigende Temperaturen als hemmend. Bei 34,4°C lag die Embryonierungsrate nur noch bei lediglich 10 %. Temperaturen zwischen 35,6 bis 37,8°C und darüber waren fatal (419). Bereits 32°C scheinen für die spätere Entwicklung suboptimal, wie Boisvenue darstellen konnte (64). In einem anaeroben, mesophilen (35°C) Faulschlammbehälter konnte jedoch von Johnson (248) im Gegenzug auch noch nach 5 Wochen eine Embryonierungsrate von 50 % festgestellt werden, was auf einen gewissen protektiven Effekt der Matrix oder unterschiedliche Temperaturtoleranzen der unterschiedlichen Stämme hinweist. Maya testete die Überlebensfähigkeit der Eier unter verschiedensten Bedingungen und stellte ebenfalls eine abnehmende Überlebensfähigkeit mit zunehmender Temperatur fest (314). O'Donnell fand ebenso heraus, dass die Temperatur den wichtigsten Faktor während der Lagerung ausmachte (344), während andere Faktoren wie Lagermilieu etc. eine nur untergeordnete Rolle spielten. Der Verlust ihrer Embryonierungsfähigkeit und damit ihrer Pathogenität wird auch in der vorliegenden Arbeit höchstwahrscheinlich auf die Temperatur zurückzuführen sein, wie auch das Absterben der Eier bei 37°C in reinem Leitungswasser zeigte. Die Daten für die Matrices zum Beginn der Fermentation sind anhand der Leitungswasserdaten extrapoliert worden, da sich die unfermentierte Bakterien- und Pilzflora als so stark sauerstoffzehrend darstellte, dass sie eine Entwicklung der Eier während der parasitologischen Untersuchung beeinträchtigte. Die Daten für Tag 21 der Leitungswasserproben liegen nicht vor, da die Probenzahl aus Kostengründen auf ein Minimum reduziert werden musste. In Anbetracht aller Daten sowie der Literatur scheint die milchsäure Fermentation unter Feldbedingungen ($T < 30^{\circ}\text{C}$) nicht geeignet für die Hygienisierung von Parasitendauerstadien. Demgegenüber ist die Kerntemperatur von 60 – 70 °C, die bei der aeroben Kompostierung entsteht, hoch genug, um Parasitendauerstadien innerhalb weniger Stunden zu inaktivieren (174, 458). Nichtsdestotrotz wurde auch während einer mehrmonatigen Kompostierung das Überleben von *Ascaris*-Eiern beobachtet (260), was vermutlich auf die unterschiedlichen Temperaturzonen der Komposthaufen zurückführbar ist. Bei einer Kombination von Entwässerung und anschließender Kompostierung von Klärschlämmen konnte Koné eine weitaus effektivere Inaktivierung von *Ascaris*-Eiern demonstrieren, eine Reduktion auf 1 Ei pro Gramm Kompost (269). Dazu muss jedoch betont werden, dass die Dosis der Eier pro Gramm deutlich geringer war, als die hier verwendete (< 60 Eier/g vs. 2700 Eier/g). Unter der Betrachtung der

Ergebnisse scheint eine thermische Inaktivierung daher die bessere Alternative für die Hygienisierung von Parasitendauerstadien. Die milchsäure Fermentation allein stößt hier an ihre Grenzen.

5.2.4. Hygienisierung von bakteriellen Erregern in der Klärschlamm-Matrix

Diesem Experiment liegen einige Erfahrungen der Vorgängerexperimente (4.3.1.2) sowie die der qualitativen und quantitativen Untersuchungen der Klärschlamm-matrizes zu Grunde. Die Wiederfindungsrate der pathogenen MO entsprach der entsprechenden Verdünnung der Animpfmenge und unterschied sich nicht in Abhängigkeit von der Sterilisation der Matrix, daher wurde auf eine gesonderte Auszählung und Darstellung in **Abbildung 19** (S. 46) verzichtet. Die Werte von *S. aureus* haben in $(S_{pool})_a$ keine Standardabweichung, da die KbE bei der hohen Konzentration der Konkurrenzflora nicht gezählt werden konnten, lediglich anhand ihrer Doppelzonenhämolysen war eine Identifikation möglich. Daher wurde die Konzentration auf die entsprechende Verdünnungsstufe $5 \log_{10}$ KbE gerundet. Zudem zeigten die Daten in **Abbildung 10** sowie **Tabelle 19** (S. 39 sowie S. 127), dass eine Inaktivierung von Clostridien (vorrangig *C. perfringens*) z. T. nur im sehr geringen Umfang im Vergleich zu den anderen MO-Gruppen stattfand. So liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese schlamminhärenten *C. perfringens*, im Gegensatz zu den im Labor kultivierten, in versporteter Form vorlagen. Diese Annahme wurde zudem durch die 80°C-Behandlung der SSR bestätigt. Aus der Beobachtung der inhärenten, nur leicht inaktivierten Wildstämme folgernd, wurde auf eine experimentelle Überprüfung zur Degradierung von Sporenbildnern verzichtet, da das Modell der Realität nicht näherkommen könnte. Ähnlich der Inaktivierung der bakteriellen Pathogene in Rindergülle-matrizes (4.3.1.2) konnte auch bei Klärschlamm-matrizes festgestellt werden, dass eine autoklavierte Matrix *nicht* zu einer vollständigen Inaktivierung der zugegebenen Erreger führte. Die nicht autoklavierte Matrix hingegen inaktivierte die zugegebenen MO innerhalb von 3 Tagen, wie es auch anhand der qualitativen und quantitativen Daten der nahe verwandten MO bzw. MO-Gruppen zu erwarten war. Die Matrix ist damit vergleichbar mit den bereits mehrfach diskutierten Arbeiten von Hrubant und Catro (88, 234). Bemerkenswert scheint im Vergleich dieser Daten mit denen aus 4.3.1.2, S. 43, dass auch hier *S. aureus* am schlechtesten mit den Konkurrenzbedingungen gegenüber den anderen anwesenden Bakterien zurechtkam, was sich anhand der geringen Keimzahl zeigt. Wie bereits in 5.2.3.2 (S. 81), ausführlicher diskutiert, werden Interaktionen unter den Pathogenen dafür als ursächlich betrachtet. Möglich jedoch bleibt auch ein Matrix-Effekt, der von der autoklavierten Matrix ausging, wie diskutiert. Die nicht vorhandenen Standardabweichungen der Werte von *S. aureus* resultiert aus der Extrapolation der Werte.

Die für *S. aureus* typische Schießscheiben-Hämolyse war in den entsprechenden Plattensektoren sichtbar, auf Grund der Dichte der anderen MO jedoch nicht genauer auflösbar als der Verdünnungsstufe entsprechend. Insgesamt stellen die Daten heraus, dass die milchsaure Fermentation im Vergleich zu den in 2.3 (S. 12) beschriebenen alternativen Maßnahmen die umfangreichste Hygienisierung für pathogene Bakterien darstellt (35, 363).

5.3. pH-Wert-Messungen

Um die mögliche Ursache für die Inaktivierung der Pathogene näher zu beschreiben, wurden pH-Wert-Messungen vorgenommen. Bereits die ersten Messungen zu Beginn der Versuche konnten das bestätigen, was die olfaktorischen Wahrnehmungen vermuten ließen – eine Ansäuerung des Fermentationsproduktes. Auf Grund der wenigen Messwerte und, daraus resultierend, der fehlenden Standardabweichung ist dies zumindest in **Abbildung 20** (S. 47) lediglich als Tendenz wertbar. So sank der pH-Wert in den ersten Tagen bereits am stärksten ($\Delta\text{pH} \geq 1,2$), jedoch tendenziell noch deutlich weiter bis zum 56. Tag ($\Delta\text{pH} \geq 1,7$). Die weiteren Messungen in **Abbildung 21** (S. 47) zeigen zudem, dass die Zugabe von EM zu einer stärkeren pH-Wert-Absenkung führt als die Zugabe von autoklavierten EM. Dies könnte, parallel zu der Diskussion betreffs der Hygienisierung der autoklavierten Matrices, entweder an dem manipulativen Effekt durch die Sterilisation des Additivs (EM) liegen oder eben an der Stoffwechsellleistung der lebenden MO in EM. Deutlich wird in **Abbildung 21** auch, dass in den autoklavierten Matrices keine Absenkung des pH-Wertes stattfand, was für eine stark reduzierte bakterielle Umsetzung der Matrices spricht. Diese resultiert vermutlich daraus, dass die fäkalinhärente Flora sterilisiert wurde und anwesende Pathogene das sterilisierte Substrat nicht so stark oder ggf. nur unter schwächerer Säurebildung umsetzten. Unabhängig von den Ursachen und den geringfügigen pH-Wert-Unterschieden fand die Inaktivierung der Pathogene innerhalb der ersten Tage der Fermentation statt, sowohl in Klärschlamm- ($\Delta\text{pH} \leq 1,3$), als auch in Rindergüllematrices ($\Delta\text{pH} \geq 1,2$). Dabei ist dieser geringe Abfall des pH-Wertes wohl nicht bzw. nicht allein ursächlich für die Inaktivierung der Pathogene. So beschreibt Back ein Wachstum von *E. coli* sowie *Salmonella* bei einem pH von 4,5 (33) und Lind sogar ein Überleben von *S. aureus* bei einem pH von 2,5 (290).

5.4. Gärsäuren und Laktatbestimmungen

Da der nur geringfügig verringerte pH-Wert nicht allein ursächlich für die Hygienisierung in Frage kommt, wurde nach volatilen Fettsäuren (VFAs) gesucht. VFAs wirken in Abhängigkeit ihrer Dissoziationsform unterschiedlich bakterizid, und mit zunehmender Azidität nimmt ihre bakterizide Wirkung zu (288). Auf Grund der dichtesten Datenlage in

Bezug auf die qualitativen sowie quantitativen bakteriologischen Befunde wurde die Klärschlammatrix auf VFAs näher untersucht. Da die stärksten Veränderungen während der ersten Tage der Fermentation auftraten, wurde dieser Zeitraum für die Probenentnahme gewählt. Knarreborg berichtet in einem relativ vergleichbaren Modell (Darmsimulator, anaerob, pH 5,5; 37°C) von einer Reduktion von Coliformen von 6 % pro Stunde in Anwesenheit von 100 mM Buttersäure (265). Diese Konzentration (mmol-Angaben **Tabelle 15 S. 109**) wurde nicht erreicht. Selbst wenn sie erreicht worden wäre, läge nach diesem Modell die Konzentration der Salmonellen deutlich über der Nachweisgrenze nach dreitägiger Fermentation. In Summe lag die Konzentration aller VFAs ab dem 2. Tag leicht über 100 mM. Essigsäure war die höchstkonzentrierte VFA (~70 mM) und ist laut Göpfert auch die VFA mit der höchsten Bakterizidie (185). Göpfert beschreibt einen bakteriziden Effekt von jeweils 0,5%iger Essig-, Propion-, und Buttersäure innerhalb weniger Stunden bis zu 2 Tagen bei 37°C und einem pH-Wert von 5,0 bis 5,5 (185). Die Essigsäurekonzentration betrug in den eigenen Untersuchungen 0,46 % am letzten Messtag, in Summe mit der Propion- und Buttersäure sogar 0,70 %. Dies hätte zumindest zu einer Reduktion der Coliformen führen sollen, jedoch nach jener Literatur nicht zu einer vollständigen Inaktivierung, wie sie hier beobachtet wurde. Auch Laktat besitzt bei einem pH-Wert um 5,3 nur eine sehr geringe Bakterizidität (471) und ist ohnehin kaum bis gar nicht wirksam gegenüber Gram-positiven Erregern (474). Lind beschrieb in seiner Dissertation (290) einen bakteriostatischen Effekt von 0,3 – 0,5 %iger Essigsäure auf den extrem säuretoleranten Erreger *S. aureus* unter aeroben Bedingungen innerhalb von 2 Tagen. Konträr dazu benötigte es eine 0,5 – 1%ige Essigsäurekonzentration und einen pH-Wert von 2,5 – 3,5, um einen ähnlichen Effekt in Anwesenheit von offensichtlich protektiven Proteinen zu erzielen. Auf Grund der Komplexität der Matrix ist eine protektiver oder gar synergistischer Effekt durch z. B. Detergenzien in Wasch- und Spülmitteln nicht auszuschließen, wobei zu bedenken ist, dass sich alle individuellen MO, nicht nur die pathogenen, mit diesen Matrixeinflüssen auseinandersetzen müssen. Wichtig bei der Untersuchung von *flüchtigen* Fettsäuren ist eine zügige Probenentnahme sowie luftdichter Transport und Lagerung. So wurde diese Versuchsreihe ausschließlich auf die VFAs hin untersucht, um ein Öffnen des Gefäßes oder eine Belüftung der Matrix durch Probenentnahme auf ein Minimum zu reduzieren. Vermutlich ist dies der Grund dafür, dass im Vergleich zu den bisherigen Messungen (406, 407) eine höhere Ausbeute erzielt werden konnte. Noch günstiger für die Ausbeute wäre vermutlich eine sofortige Bedeckung des Fermentationsgutes mit Lösungs- bzw. Extraktionsmitteln.

5.5. Bioassay zum bakteriziden Effekt der Milchsäure und flüchtiger Fettsäuren (VFA)

Auf den ersten Blick wird in **Abbildung 23** (S. 49) deutlich, dass es zu keiner vollständigen Inaktivierung des Test-MO kommt, wie es *in-vivo* der Fall war. Im Vergleich zur NB1 konnte die Essigsäure den stärksten Effekt erzielen, der lediglich von dem Gemisch aller VFAs und Milchsäure übertroffen wurde. Die Unterschiede zwischen NB 1 und den anderen separaten Säuren waren vernachlässigbar klein, von einer wirksamen Hemmung kann in den Konzentrationen nicht die Rede sein. Auf Grund der starken Tendenz zu einem synergistischen Effekt des Gemisches wurde noch eine Ethanolmenge in einem weiteren Experiment hinzugegeben. Dabei wurde eine 0,15 %ige Konzentration gewählt, da diese nach einer dreitägigen Fermentation *in-vivo* gemessen werden konnte (407). In diesem Experiment wurde mit einer höheren Animpfmenge gearbeitet, da eine Erregerkonzentration entlang der Nachweisgrenze als ungünstig erachtet wurde, um ggf. einen Konzentrationsabfall zu betrachten. Deutlich wird hierbei, dass erneut eine vollständige Inaktivierung nicht stattgefunden hat. Zwar gab es hier rechnerisch signifikante, leichte Konzentrationsverringerungen, und diese widersprechen den Ergebnissen aus dem ersten Versuch, jedoch liegt der Unterschied im Versuchsdetail. Es wurde nämlich die Bebrütung bei 37°C erst nach einer Nacht Inkubation im Kühlschrank gestartet, sodass die Gemische erst bei 4°C auf den Erreger einwirkten und sich erst später auf 37°C erwärmten, wohingegen im ersten Versuch die Medientemperatur und die der Animpfkultur bei 21°C lag. Nichtsdestoweniger bleibt die Hauptaussage bestehen: Es kommt unter aerober Inkubation auf Grundlage der gemessenen chemisch-physikalischen Größen zu keiner vollständigen Inaktivierung des Erregers. Jedoch sind VFAs auch unter anaeroben Bedingungen in den gemessenen Konzentrationen nur bedingt bakterizid (265). Die These, dass die Inaktivierung auf Grund der VFAs bzw. der Milchsäure stattfindet, ist somit fraglich. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass diese bakteriziden Stoffe in örtlich höherer Konzentration auftraten, sich jedoch auf Grund von Matrixeffekten wie z. B. der Adsorption an Holzkohle dem Nachweis entzogen haben. Auch das synergistische Wirken weiterer Parameter und Stoffe, die nicht bestimmt wurden, ist denkbar. Da es, wie in 5.2.1 bis 5.2.2 umfänglich beschrieben wurde, zu einer Zunahme von potentiellen Bakteriozinbildnern kam, sind Bakteriozine als möglicher antibakterieller Faktor in Betracht zu ziehen. Man kann also von einer Synthese aus bakteriostatischem Milieu, erzeugt von pH, VFAs und Milchsäure, sowie mutmaßlich bakteriziden Effekten durch gebildete Bakteriozine ausgehen.

5.6. Untersuchungen zum Masseverlust während der Fermentation

Der Gewichtsverlust von 2,44 % innerhalb der ersten 21 Tage ist deutlich geringer im Vergleich zu dem während einer Kompostierung. Dieser ist in der Literatur mit 15 % (138) bis 57 % (458) über einen Zeitraum von 42 bzw. 132 Tagen angegeben. Diese Zeiträume sind zwar deutlich länger als die hier beobachteten, jedoch findet die höchste CO₂- (45), NH₃- und Wärmeemission (434) innerhalb der ersten 21 Tage statt, was ein klarer Hinweis für den stärksten Stoffumsatz in diesem Zeitfenster ist. Es könnten nun Einwände bestehen, dass es sich bei den Anaerobier-Töpfen um geschlossene Systeme handelte und z. B. ein Stoffumsatz drucklimitiert gewesen sein könnte. Das Volumen des Topfes betrug 2400 cm³ im Vergleich zu ~ 165 cm³ Matrix, und beim Öffnen des Behälters konnte kein Überdruck festgestellt werden. Selbst nach dem Lösen der Klammern kam es zu keiner Selbstöffnung des Topfes, vielmehr erzeugte der abkühlende Topf eher einen Unterdruck. Folglich ist der Stoffumsatz während der milchsäuren Fermentation im Vergleich zur Kompostierung methodenbedingt geringer und stellt damit im besonderen Maße den Vorteil der Fermentation gegenüber der Kompostierung dar.

5.7. Zur Einordnung in ein nachhaltiges Ackerbodenkonzept

Somit könnte das so fermentierte Substrat, unabhängig ob auf Rindergülle oder Klärschlamm basierend, im Vergleich zu Gärresten, unbehandelten oder kompostierten Substraten desselben Ursprungs, als virologisch und bakteriologisch unbedenklicher betrachtet werden. Sicherlich findet im Zuge des Verweilens des milchsauer fermentierten Substrats auf dem Feld eine aerobe Umsetzung ebendieses durch zahlreiche Organismen statt, jedoch deutlich langsamer als während der exothermen Kompostierung. So scheint das ausgebrachte fermentierte Substrat die Biodiversität von Wirbellosen stark zu erhöhen, wie **Abbildung 66** (S. 155) vermuten lässt. Ökosysteme mit einer höheren Biodiversität werden nicht nur als die stabileren diskutiert, sondern auch als die produktiveren (456). So besteht für die Feldfrüchte über einen längeren Zeitraum die Möglichkeit, die langsam umgesetzten Nährstoffe aufzunehmen. Dabei ist die Gefahr von Auswaschung der in geringerem Maße zur Verfügung stehenden wasserlöslichen Nährstoffe kleiner, da stets ein Reservoir in Form von nicht mineralisierten organischen Verbindungen zur Verfügung steht (57). Die Reservoirfunktion sowie der Schutz vor Auswaschung soll durch Holzkohle, Ton und Gesteinsmehl verstärkt werden und zum Aufbau eines höheren Humusanteiles beitragen. Wie in 2.5.3 und 2.5.3.1 beschrieben, scheinen Kalk, Holzkohle und Ton wichtig für die Bildung von hohen Humusanteilen und Schwarzerden zu sein. Diese ackerbaulichen Zusammenhänge erscheinen naheliegend, die experimentellen Beweise für eine langfristige Bodenverbesserung stehen

aber noch aus. Erste Feldstudien zeigen jedoch bereits positive Auswirkungen durch die Ausbringung von Kompost in Kombination mit Holzkohle (294). Um die Verluste an organischem Material, die mit der Kompostierung einhergehen, zu verringern, erscheint es sinnvoll, in zukünftigen Experimenten kompostierte Abfälle durch fermentierte zu ersetzen.

Anknüpfungspunkte zur Biogasgewinnung scheinen darüber hinaus zu bestehen. So konnte Herrmann darstellen, dass die Biogasausbeute bei milchsauer vergorenem Substrat erhöht ist (217a). Die Nutzung der milchsäuren Fermentation vor der Vergasung könnte die bisherige mangelnde Hygienisierung (35) verbessern. Dagegen steht aber die derzeit in Deutschland gängige Biogaspraxis im krassen Widerspruch zu einer guten und nachhaltigen landwirtschaftlichen Praxis. Stehe Monokulturen des starken Humuszehrer Mais zerstören kurz-, mittel- und langfristig den Humusanteil im Boden (286a) und erhöhen somit die CO₂ Produktion (429). Neben den ackerbaulichen und klimatischen Nachteilen der Monokulturen bleibt nicht zuletzt das ethische Problem bestehen, Nahrungsmittel als Energiequelle zu nutzen. Im Hinblick auf die Mangel- und Unterernährung von über 800 Millionen Menschen weltweit (147a), ist der Anbau von Energiepflanzen aus humanistischer Weltsicht schwer vertretbar. Vielmehr ist ein weltweit einsetzbares, infrastruktur unabhängiges, nachhaltiges Ackerbodenkonzept notwendig, das auch Infektionszyklen unterbricht. Die milchsäure Fermentation könnte dabei ein Schlüsselverfahren darstellen.

5.8. Eliminierungs- und Substitutionsexperimente der Matrixzusammensetzung

5.8.1. Quantitative bakterielle Untersuchung

Auf Grund der Komplexität der Matrix war es für eine weitere Eingrenzung der Hygienisierungsursachen notwendig, die verschiedenen Komponenten in ihrer Wirkung zu untersuchen. Da von vornherein die Weizenkleie als Hauptursache für die Hygienisierung in Frage kam, wurde sie in diesen Experimenten entweder weggelassen oder durch Sägespäne substituiert. Es stellte sich heraus, dass die zuvor beobachteten quantitativen Ergebnisse sich ausschließlich in der Matrix S_{Pool} widerspiegeln. Die Inaktivierung von Gram-negativen Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen sowie Enterokokken wurde nur dort innerhalb der ersten 3 Tage beobachtet. Dass zumindest die Hefe- und Schimmelpilze in allen anderen Varianten innerhalb von 7 Tagen inaktiviert wurden, ist vermutlich dem anaeroben Milieu geschuldet, in dem zelluloseabbauende Bakterien gegenüber Pilzen einen Vorteil besitzen (62). Überraschend erschienen zudem die relativ geringen Unterschiede in der Quantität der Laktobazillen am dritten Fermentationstag, die bisher in dieser Arbeit als essentiell für die Hygienisierung betrachtet wurden. Am siebten Tag jedoch sah man einen sehr viel stärkeren

Abfall der *Lactobacillaceae* in den Matrices $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$. Ein methodischer Fehler wurde am 3. Fermentationstag begangen. Bei der Bestimmung der SSR entfiel die Hitzebehandlung der Probe bei 80°C, sodass die extrem niedrige SSR-Konzentration in Matrix 2 als unrealistisch zu betrachten ist. Jedoch lassen sich dadurch weitere Zusammenhänge erkennen. So fand in dem DRCM (Medium) eine sehr stark verringerte Schwärzung, also sehr stark verringerte Sulfitreduktion statt. Da sich DRCM und M.R.S.-Agar relativ stark in der Zusammensetzung ähneln (siehe Seite 112), ist ein Wachstum von Laktobazillen sowie Enterokokken und der damit verbundenen Verdrängung der SSR in DRCM als möglich zu erachten (271). Die Konzentration der Enterokokken lag unter der Konzentration der Clostridien. Somit hätte spätestens in den hohen Verdünnungen eine Schwärzung auftreten müssen. Daher scheint die Verdrängung der Clostridien zumindest im Medium von den *Lactobacillaceae* ausgegangen zu sein. Dabei fällt insbesondere auf, dass in Matrix $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ die durch die Clostridien verursachte Schwärzung und folglich deren Konzentrationen deutlich höher lagen. Als realistischer sind daher die Werte des Neomycin/Polymyxin-Agars für Matrix S_{Pool} zu betrachten, da jener die Laktobazillen unterdrückt. Jedoch sind auch diese Werte deutlich niedriger als die von Matrix $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$, zudem auch geringer als die Werte von Tag 0 und 7. Dies könnte auf einen Zeitpunkt zurückzuführen sein, in dem besonders viele wachstumshemmende Stoffe in der Matrix vorhanden und somit auch in der ausplattierten Verdünnung wirksam waren. Der beobachtete Moment könnte dahingehend außergewöhnlich sein, dass sich einige Bakteriozinbildner gerade im exponentiellen Wachstum befanden, da eine Bakteriozinbildung häufig an das Wachstum bzw. an Stress- und Konkurrenzsituationen gebunden ist (10) sowie häufig am Ende der exponentiellen Wachstumsphase abfällt (482). Generell scheint die Erhöhung des Sägespäneanteils zu einer Erhöhung der Keimzahlen beizutragen und auch zu dem höchsten Clostridienanteil. Dies wirkt nicht verwunderlich, da viele Clostridien in der Lage sind, Zellulose abzubauen und in Interaktionen mit anderen Bakterien als Kohlenstoffquelle zu nutzen (62). Generell waren Standardabweichungen bei den Matrices $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ am 7. Fermentationstag extrem hoch und sprechen für eine sehr dynamische Florenveränderung in diesem Zeitraum. Die quantitativen Ergebnisse weisen auf eine gesundheitlich bedenklichere Flora in den Matrices $S_{\text{Pool-Wk}}$ und $S_{\text{Pool-Wk+Sp}}$ als in Matrix S_{Pool} hin, die sich in Abwesenheit von Weizenkleie etabliert. Das rudimentäre Umkehrexperiment zeigt ebenso die Wichtigkeit dieser Kohlenstoffquelle, obgleich der hohe Einsatz von Weizenkleie, um im vergleichbaren Trockensubstanzbereich zu bleiben, im Verhältnis zur Fäkalmenge absolut utopisch ist. Generell gilt es in Zukunft, Weizenkleie als

Lebens-/Futtermittel mit Abfallstoffen, wie z. B. Grünschnitt oder verdorbene Futtermitteln, zu substituieren. Weizenkleie wurde für die Versuche im Labormaßstab gewählt, da sie im Vergleich zu Grünschnitt leichter homogenisierbar ist. Zudem ist Weizenkleie im Gegensatz zum Grünschnitt auch standardisiert. Auch das gesamte Mengenverhältnis ist noch optimierbar. Festzuhalten bleibt jedoch, dass das Vorhandensein eines Substrates, das für die Fermentationsflora besser zu verwerten ist als für die Fäkalflora, essentiell für die Hygienisierung ist.

5.8.2. Qualitative bakterielle Untersuchung

Die in **Tabelle 26** (S. 142) dargestellten Ergebnisse unterstreichen die quantitativen Ergebnisse. So wurde der in der Trinkwasserverordnung als Indikatorkeim genutzte *E. coli* (134) in allen Matrizes ohne Weizenkleie zu jedem Zeitpunkt gefunden. Nicht so in Matrix S_{Pool} . Dort fand der sehr ähnliche und bereits in aller Ausführlichkeit in 5.2.2.2 diskutierte Florawechsel statt. In den Matrizes $S_{Pool-Wk}$ und $S_{Pool-Wk+Sp}$ hingegen konnte ein ganz anderer Florawechsel beschrieben werden, wie besonders an dem Beispiel von *Eggerthella lenta*, welche als pathogen beschrieben ist (278, 455), deutlich wird. Auch die zuvor ähnlichen quantitativen Daten der *Lactobacillaceae* an Fermentationstag 3 unterscheiden sich bei qualitativer Analyse sehr deutlich. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass ggf. die jeweilige Spezies eine wichtige Rolle während der Hygienisierung spielt, was die Bakteriozinese weiter unterstreicht. Darüber hinaus wird auch nahegelegt, dass die verwertbare Kohlenstoffquelle, in diesem Falle die Weizenkleie, für die Spezieszusammensetzung essentiell ist. Zusammenfassend kann man feststellen, dass nach 7-tägiger Fermentation die Risikopotentiale der Matrizes $S_{Pool-Wk}$ und $S_{Pool-Wk+Sp}$ höher lagen als das von Matrix S_{Pool} . Dies lässt sich vorrangig an den sich entwickelnden bzw. persistierenden Gram-negativen Spezies festmachen, aber auch an den Staphylokokken sowie Enterokokken.

5.9. Molekularbiologische Untersuchungen

5.9.1. Erstellung eines Standards für die TGGE

Das Agarosegel in **Abbildung 28** (S. 53) demonstriert vordergründig die Funktionalität des Universalprimerpaars. Die negative Kontrolle macht deutlich, dass es zu keiner nennenswerten Verunreinigung kam. Die unterschiedliche Stärke der Banden könnte bereits auf eine Selektivität des Primers hinweisen, die auch Watanabe (488) als schwach, aber vorhanden beschrieb, oder auf eine grob unterschiedliche Templatmenge zu Beginn der PCR. Letztere könnte aus unterschiedlicher Ausgangskonzentration der MO oder unterschiedlicher Aufschlussausbeute resultieren aufgrund speziesspezifischer

Widerstandsfähigkeit gegenüber der DNS-Gewinnung. Die Auftrennung der kräftigsten Einzelbanden aus dem Agarosegel im Acrylamidgel ist in **Abbildung 29** (S. 53) dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass es in dem Gemisch der 3 Stämme zu Kontrastverlusten und, was wesentlich schwerer wiegt, zu sehr engliegenden und damit schwer differenzierbare Banden kommt. Aus diesem Grunde und den zahlreichen gut differenzierbaren Banden wurde das Bandenmuster von *C. perfringens* als Standard gewählt, um zukünftig die unterschiedlichen Gelläufe miteinander vergleichen zu können.

5.9.2. TGGE-Bandenmuster (Fingerprints) der unterschiedlichen Klärschlämme

Anhand **Abbildung 32** (S. 55) können stellvertretend Stärken und Schwächen der Methode bzw. der Kontrollbanden diskutiert werden: Zum einen ist die Inter- und Intraassayvarianz sehr gering. Die Abweichung der Kontroll-Bandenmuster betrug $< 1\%$ über alle Gele hinweg. Die Intraassayvarianz war ebenso gering. Bei Verzerrungen konnten die Banden durch Extrapolationen (GelCompare II, Applied Math NV, Sint-Martens-Latem, Belgien) anhand der Kontrollbanden entzerrt werden. Varianzverringern wirkte zudem der äußerst präzise regulierte Thermogradient des TGGEs. Lediglich an den Randbereichen des Gels (siehe **Abbildung 32**: Standard, links) kam es zu erhöhten Temperaturen, was zum einen die Schräglage und zum anderen die kürzere Laufstrecke deutlich zeigt. Die Schwäche der sonst sehr unkomplizierten Kontrollbande lag vor allem darin, dass sie nur einen bestimmten Gelbereich abdeckte und dementsprechend nur in diesem Bereich Verzerrungen des Gels extrapoliert werden konnten. Geschickter wäre es wohl gewesen, die beiden spät schmelzenden Banden aus *E.coli* Nissle (schwach auf **Abbildung 29** (S.53) erkennbar, kurz vor der einzelsträngigen 16S-rDNS Bande [oberster Pfeil]) zusätzlich mit in den Standard aufzunehmen. Ggf. hätte man zudem mit Hilfe einer erneuten PCR die DNS-Konzentration variieren und somit die Kontraststärke verbessern sollen. Außerdem hätten mehr Kontrollbanden pro Gel, z. B. jede 5. Tasche, zu einer noch präziseren Extrapolation führen können. So scheinen in **Abbildung 56**, (S. 148) einige Stauchungs- und Streckungseffekte vorzuliegen, die nur schlecht extrapoliert wurden, so dass die Banden recht unähnlich erscheinen. Trotz dieser Schwächen, der Kontrollbandendichte und der Kontrollbanden an sich, war die Übereinstimmung der Banden in den überwiegenden Fällen sehr hoch, obgleich nur eine Abweichung von $0,9\%$ als Toleranz der Dice-Analyse akzeptiert wurde. Bei einer Verbesserung der Abdeckung (Migrationsspanne) der Kontrollbanden sowie der Kontrollbandendichte hätte diese Toleranz vermutlich noch weiter verringert werden können bzw. gäbe es höhere Übereinstimmungen. Dass es während der Fermentation zu einer starken Veränderung der kultivierbaren MO kam, machten bereits die bisherigen Ergebnisse deutlich.

Daher wurde auch davon ausgegangen, dass die Floraveränderung im Acrylamidgel offensichtlich werden würde, was sich als korrekt herausstellte. Die Unterschiede vor und nach der Fermentation waren erheblich. So ähnelten sich die Bandenmuster nach der Fermentation stärker als zuvor, wie in **Abbildung 30** und **Abbildung 31** (S. 54) sowie im Anhang in **Abbildung 60** und **Abbildung 61** (S. 149 f.) auch im Detail deutlich wird. Mit dem relativ ähnlichen Cluster, welcher in **Abbildung 62** (S. 151) grün umrandet ist, wird die Frage nach einer sich einstellenden ähnlichen Fermentationsflora nicht ausreichend beantwortet. Es ist zwar naheliegend, dass sich bei gleichen Zuschlagsstoffen sowie einigen identischen physikalischen Umweltbedingungen (Sauerstoffgehalt, Temperatur etc.) ähnliche MO-Floren ausbilden, jedoch beinhaltet der Cluster nur 6 von 10 fermentierten Schlämmen. Insofern bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um dieser Fragestellung nachzugehen. Die oben angesprochenen Verbesserungen des Standards und dessen Anordnung sowie die in **5.9.5** (S. 99) diskutierten alternativen Methoden sollten dabei berücksichtigt werden. Bei der Zusammenfassung aller Daten in **Abbildung 62**, (S. 151) wird zudem offensichtlich, dass gerade die Bandenmuster mit nur einer oder zwei Banden die Ähnlichkeit stark beeinflussen, was mit Sicherheit auch der Informationsarmut dieser Muster geschuldet ist. Dabei sind hier wohl hauptsächlich die Matrix-, weniger die Verdünnungseffekte als ursächlich anzusehen. In einer beispielhaften Untersuchung anhand einiger reiner Klärschlämme konnten deutlich feingliedrigere Bandenmuster ermittelt werden, wie **Abbildung 63** (S. 152) zeigt. Verdünnungseffekte erscheinen auf Grund der hohen PCR-Zyklenzahl eher unerheblich, wie auch noch nachfolgend diskutiert wird. Das Auftauchen zusätzlicher Banden durch andere Zuschlagstoffe nebst des KS kann ebenso als äußerst unwahrscheinlich betrachtet werden, da zumindest die Konzentration der kultivierbaren MO auf den Zuschlagstoffen um ca. 5 \log_{10} -Stufen geringer war als die des KS. Heuer beschreibt eine Abnahme der Komplexität der Bandenmuster, sofern wenige Spezies sehr abundant sind (219). In diesem Falle würden kompetitive Effekte während der PCR eine spätere Auflösung auf dem Gradientengel erschweren. Boon beschreibt zwar eine zumindest semiquantitative Darstellung der Template-DNS durch die Bandenstärke im TGGE, stellt aber darüber hinaus eine Maskierung der weniger abundanten Spezies bei großen Konzentrationsunterschieden der Templates fest (67). Dies könnte eine mögliche Ursache sein, jedoch gaben die kulturell ermittelten Daten keinerlei Hinweise darauf. Umso mehr scheinen Matrixeffekte in Betracht zu kommen. Zwar ist auf Grund der Komplexität der Matrizes und dem Versuchsaufbau keine Klärung dieser Effekte möglich, jedoch fußt eine Erklärung auf einer hohen Konzentration von zweifach geladenen Kationen während der Template-DNS-Aufreinigung. Die Konzentration des

kalkhaltigen und somit potentiell Schwarzerde begünstigenden (404) Gesteinsmehls beträgt 8,02 % (m/m), was eine zusätzliche Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} Konzentration von 0,31 % bzw. 0,69 % bedeutet. Hartes Wasser erhöht zudem klärschlammsspezifisch den Ionengehalt. Beide Ionen sind in der Lage, DNasen vor einer Verdauung durch Proteinkinasen zu schützen (298, 465). Somit bestünde die Möglichkeit, dass vorhandene DNasen verstärkt die Template-DNS zerstören. Zwar enthalten die DNS-Aufreinigungskits zuweilen Chelatoren wie EDTA, sodass Ca^{2+} und Mg^{2+} chelatiert werden könnten, jedoch sind diese ab einer bestimmten Konzentration gesättigt. Auch schaffen Wasserenthärter (Zeolithe) in den Klärschlämmen ein „Maskierungs“-Reservoir, was ebenfalls klärschlammsspezifisch ist. Unwahrscheinlicher erscheinen methodische Fehler in der Färbung bzw. während der TGGE, da benachbarte Banden sowie Kontrollbanden gut sichtbar waren. Auch sind methodische Fehler während der PCR unwahrscheinlich, da eine bzw. zwei Banden mittels TGGE nachgewiesen werden konnten und die vorhergehenden Agarose-Gel-Banden unauffällig waren. Gegebenenfalls hätte eine hot-start PCR vorhandene DNAsen denaturieren können und zu mehreren Banden geführt. Erwähnenswert scheint zudem auch die theoretische, wenn auch unwahrscheinliche Möglichkeit einer besonders hohen Konzentration der Template-DNS dieser nachgewiesenen Banden durch eine inhomogene Verteilung in der Matrix, sodass alle anderen Banden aufgrund der Abundanz eines bis zweier Templates nicht ausreichend in der PCR amplifiziert wurden und somit nicht nachweisbar waren. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt somit die Genauigkeit ab. Diese Möglichkeit wurde in der Literatur mehrfach beschrieben, u. a. bei Zhang und Brüggemann (77, 506). Brüggemann konnte zwischen 20 und 35 Zyklen speziesabhängig die besten Kontraste ermitteln. Die Wahl fiel in dieser Arbeit auf 35 Zyklen, da diese auch in der Literatur für Stuhlproben genutzt wurden (153, 342) und somit ebenso als passend für Klärschlämme gelten könnten. Auffällig ist zudem, dass 15 der 18 Banden mit jeweils nur 1 bis 2 Banden von den Proben vor der Fermentation stammen. Dies könnte am pH-Wert liegen, da z. B. die extrazelluläre Nukleaseaktivität von *S. aureus* stark vom pH-Wert abhängig ist (111). Zudem könnten auch andere Proteasen die DNasen verdaut haben sowie protektive Erdalkalitionen anderweitig gebunden worden sein. Dies alles bleibt jedoch auf Grund der Komplexität der Matrix reine Spekulation.

5.9.3. Detailvergleich der Bandenmuster von Matrix S_{Pool}

Um das Probenvolumen weiter zu reduzieren, wurde ein Klärschlamm gepoolt und als Matrix S_{Pool} zusammengefasst. Von dieser ausgehend sollten nun unterschiedliche Banden sequenziert werden. Die Schwächen des Standards wurden bereits zuvor diskutiert, jedoch wird trotz der unterschiedlichen Kontraststärke entlang des Gels deutlich, wie wesentlich sich

die Bandenmuster in BvF 1 – 3 durch das Verschwinden unterscheiden bzw. die BnF 1 – 4 an Kontrast stark zunehmen. Zudem tauchten auch keine Banden spontan auf, was für eine Vermehrung von vorher kaum detektierbaren DNS-Konzentrationen gesprochen hätte, sondern es kam zu einem Wegfall von Banden und einer Verstärkung vorhandener. Dies ließ sich so nicht aus den klassischen kulturellen Ergebnissen herauslesen. Zwar konnten bei den qualitativen kulturellen Erhebungen auch Spezies vor der Fermentation nachgewiesen werden, die mit der Fermentation verschwanden (z. B. Enterobakterien), und auch Spezies, die die Fermentation überdauerten (z. B. Sporenbildner), jedoch keine Spezies, die in nennenswerter Konzentration zu Beginn der Fermentation und in deutlich höherer Menge nach der Fermentation gefunden werden konnten. Mit Sicherheit lassen sich mit Hilfe der klassischen PCR in Verbindung mit der TGGE keine quantitativen Aussagen treffen, jedoch könnte es sich um eine tendenzielle Aussage handeln. Relativierend können auch unterschiedliche Sequenzen einen ähnlichen Schmelzpunkt besitzen und somit zur Überlappungen von Banden führen, was als Kontrastverstärkung wahrgenommen werden würde. Zudem stellte sich das Ausschneiden der Banden mitunter als sehr schwierig dar. So konnte folgende Beobachtung gemacht werden: Wie in **Abbildung 64** (S. 152) zu sehen, konnte trotz vielfachen Ausschneidens keine Einzelbande von dem Kontrollbandenmuster isoliert werden. Beim Ausschneiden von Bande 1 und 2 konnte zwar eine Abschwächung des Kontrastes der Bande 5 und 7 und das Auftauchen von Bande „3,5“ beobachtet werden, jedoch wurde keine Einzelbande wie z. B. bei SekB1 produziert. Es könnten sich natürlich bei den unteren Banden noch Spuren der anderen Banden befinden, die bei einer weiteren PCR erneut auftraten. Ein ähnliches Phänomen trat jedoch auch bei Bande 7 auf. Obgleich dort alle anderen Banden bis auf Bande 5 verschwanden, ist eine „Verunreinigung“ der 7. Bande durch andere Banden eher unwahrscheinlich. Interessanterweise erhielt man dasselbe Muster beim Ausschneiden von Bande 5. Eine „Verunreinigung“ durch Einzelstrang DNS wird ebenso möglich sein, da diese in der gesamten Laufstrecke in Spuren vorhanden sein kann, dennoch sollte die Aufkonzentrierung einer Einzelbande theoretisch möglich sein. Eine Erklärung könnte sein, dass es sich hierbei um zwei Cistrons handelt, die verschiedene Sekundärstrukturen, s. g. Hairpins einnehmen. Ein Cistron wäre demnach für Bande 7 und 5 verantwortlich gewesen, wohingegen die Banden 6, 4, 3, 2 und 1 vom zweiten Cistron verursacht worden wären. Mehrere GGE-Banden durch Cistrons sind bereits durch Nübel beschrieben (343). Unterschiede in der Gel-Migration von Nukleinsäuren, verursacht durch Hairpins, wurden von Chadalavada (90) veröffentlicht. Unter anderem aufgrund dieser zusätzlichen Banden, die zwar die Genauigkeit der Methode unterstreichen, jedoch die

qualitative Populationsanalyse erschweren, wird in **5.9.5** (S. 99) auf Alternativen eingegangen.

5.9.4. Sequenzierung ausgewählter Banden.

Die Bandenbestimmung besaß Vorversuchscharakter und sollte lediglich einen Ausblick darauf erlauben, ob diese Methode sich für eine Analyse der nicht kultivierbaren Bakterien in dieser Matrix anbietet.

Nach der Sequenzierung erwiesen sich mit der Analyse durch Chromas (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia) lediglich 5 der 7 Sequenzen als auswertbar. Die weiteren 2 Sequenzen variierten dabei so stark, dass eine weitere Auftrennung dieser mutmaßlich überlappenden Banden notwendig erscheint. Dies könnte zukünftig mittels einer feineren Temperaturgradientenabstufung im entsprechenden Bereich gelingen oder mittels Klonierung durch Vektoren.

Bei dem Vergleich der isolierten DNS aus den Kontrollbanden konnten drei unterschiedliche Basenpaare ermittelt werden, wie in **Abbildung 65** (S. 121) zu sehen ist, was ein Indiz für ein Cistron sein könnte. Analysen, inwieweit sich diese Unterschiede auf die Sekundärstruktur auswirken, könnten mit Oilgo Calc (258) vorgenommen werden. Jedoch müssten dafür verlässliche Daten für das gesamte Fragment vorliegen, was im Rahmen der Versuche mit dem Stichprobencharakter nicht weiter verfolgt wurde. Die Fragmentlänge reicht zwar bei > 350 BP für eine verlässliche Speziesidentifikation, jedoch nimmt die Verlässlichkeit mit zunehmender Kürze der Fragmente ab (vgl. BvF1 bzw. BnF4, **Tabelle 4**, (S. 56) (325, 507)). Trotz alledem ist der Aussagewert der Sequenzierung als gering einzuschätzen, da die Datenbankeinträge nur wenig verwertbare Ergebnisse lieferten. Somit gelang eine Speziesidentifikation lediglich bei den Kontrollbanden, was zwar das Funktionieren der Methodik bestätigt, jedoch keinen Aufschluss über sich etablierenden Spezies ermöglicht. Die Information darüber, dass es sich bei den Spezies um *nicht kultivierte* Umwelt-Spezies handelt, bestärkt jedoch die Hypothese, dass *nicht kultivierbare* Spezies eine wichtige Rolle spielen könnten, soweit ihre Abundanz mit dem Vorhandensein ihrer Banden korreliert (506). Bei der Betrachtung der in der Datenbank nächstgenannten taxonomischen Einheiten überrascht, dass, sofern man lediglich eine Sequenz vor und nach der Fermentation als Anhaltspunkt in Betracht ziehen will, die Ordnung der *Clostridiales* eine nicht unerhebliche Rolle spielt. Auch *Lachnospiraceae* antagonisieren mitunter pathogene Erreger, wie von Reeves festgestellt werden konnte (381). Der Fund von *Lachnospiraceae* mag ob der anaeroben Fermentationsbedingungen nicht verwundern, jedoch widerspricht dies unter den

eben genannten Einschränkungen der Einzelwerte den kulturell ermittelten Spezies. Heuer betont jedoch in seiner Arbeit, dass die abundanten Spezies nicht automatisch die ausschlaggebenden eines Ökosystems sein müssen und Boon weist auf Maskierungseffekte von abundanten Spezies gegenüber weniger dominanten hin (67, 218).

Auf Grund der scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der kulturellen und genetischen Versuche wurden die Sequenzen des Primerpaares mit allen Sequenzen verglichen, die in der Datenbank des ribosomalen Databankprojektes RDP hinterlegt sind (99). (Suchmodus: „Probe Match“, [Parameter: Strain: Both, Source: Both, Size: Both; Quality: Good] Stand: 28.08.2014)

Tabelle 5: Datenbankeinträge mit gleichen oder sehr ähnlichen Sequenzen des Universalprimerpaares

Taxonomische Einheit	Datenbank-einträge	0 BP Toleranz		1 BP Toleranz		2 BP Toleranz	
		Treffer	in %	Treffer	in %	Treffer	in %
Lactobacillales	175844	4172	2,37	37876	21,54	43594	24,79
<i>Lactobacillaceae</i>	38839	19	0,05	12823	33,02	14448	37,20
<i>Lactobacillus</i>	37392	19	0,05	12270	32,81	13877	37,11
<i>Pediococcus</i>	1035	0	0,00	468	45,22	485	46,86
Clostridiales	256406	42074	16,41	86063	33,57	98886	38,57
<i>Lachnospiraceae</i>	120127	30516	25,40	41324	34,40	46959	39,09

Anhand des Datenbankabgleiches, der in

Tabelle 5 dargestellt ist, konnte festgestellt werden, dass der Primer eine bessere Übereinstimmung mit den einzelnen, molekularbiologisch nachgewiesenen Spezies aufweist als mit den kulturell ermittelten. Daraus könnte eine geringere Affinität der Primer zu der Ziel-DNS der Lactobacillales, insbesondere der Spezies *Lactobacillus* und *Pediococcus*, im Vergleich zu den Clostridiales und *Lachnospiraceae* interpretiert werden, jedoch lässt dies die Datenlage nicht sicher zu. Dass eine ungleichmäßige Affinität eines Universalprimers zu einer ungleichmäßigen und somit weniger repräsentativen Speziesaufschlüsselung führen kann, stellten auch von Wintzingerode sowie Watanabe dar (488, 495). Die Mitführung eines Standard-Primers für die jeweiligen ermittelten taxonomischen Gruppen erscheint bei

zukünftigen Untersuchungen als sinnvoll, um auch deren potentielle Relevanz zumindest semiquantitativ darstellen zu können (67, 330).

5.9.5. Alternative molekularbiologische Methoden

Die Methoden der Kultivierung haben für die Darmflora eine Speziesabdeckung von 20 – 40 % (444) und damit im Vergleich zu anderen Habitaten wie Meereswasser oder Erdboden (27) eine relativ hohe Aussagekraft. Dennoch kann der größte Teil der MO lediglich mit molekularbiologischen Methoden erfasst werden und macht es erforderlich, bei zukünftigen Untersuchungen dies zu vertiefen.

In diesen Untersuchungen sollten weitere Primer verwendet werden, die die Gattungen *Pediococcus* sowie *Lactobacillus* spezifischer erfassen. In Kombination mit einer Realtime-PCR könnten im Anschluss an TGGE und/oder Metagenomanalyse auch quantitative Aussagen zu ggf. nicht kultivierbaren MO möglich sein. Zudem könnten die immer günstiger werdende Metagenomanalyse und „next generation sequencing“-Technologie effektivere Communityanalysen ermöglichen (352, 443). Der entscheidende Nachteil bei der Arbeit mit Nukleinsäuren liegt jedoch in der Bewertung der Hygienisierungsleistung, da der Nachweis von DNS allein keine Aussage über das infektiöse Potential ermöglicht. So erscheint bei einer Zugabe von pathogenen Bakterien mit einer Konzentration von $8 \log_{10}$ KbE/g ein Nachweis derer DNS auch nach 3-tägiger Fermentation als wahrscheinlich, obgleich keine anzuchtfähigen Erreger nachgewiesen werden konnten. Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) mag dahingehend eine Alternative darstellen (27), jedoch liegt die Nachweisgrenze mit 4 bis $5 \log_{10}$ KbE/g relativ hoch, und auf Grund der tonmineralischen Anteile der Matrix ist die Sonden-Farbstoff-Auswahl eingeschränkt (261, 406).

6. Fazit

Die Inaktivierung von unversporteten pathogenen Bakterien mittels der hier vorgestellten milchsauen Fermentation konnte nachgewiesen werden. Sie ist beim Vergleich mit der entsprechenden Literatur zudem deutlich effektiver als die beiden anderen derzeitigen Abfallbehandlungsmethoden (Kompostierung, Biogasgewinnung). Im Hinblick auf die von Scheinmann getestete Fermentation bei 27°C (406) sowie die traditionelle Herstellung von milchsauer vergorenen Lebens- sowie Futtermitteln scheint eine Inaktivierung bei Temperaturen unter Feldbedingungen als sehr wahrscheinlich. Eine Inaktivierung von Viren kann anhand der Datenlage als tendenziell möglich, jedoch nicht gesichert angesehen werden. Die Inaktivierung von Parasiten-Dauerstadien scheint unter Feldbedingungen unwahrscheinlich. Folglich ist diese Methode vorerst nur für die Unterbrechung von Infektionszyklen bakteriellen und viralen Ursprungs interessant. Zudem ist der technische Aufwand der Fermentation im Vergleich zur professionellen Kompostierung bzw. der Installation und dem Betrieb einer Biogasanlage z. T. deutlich geringer. So wäre theoretisch jeder Landwirt, der Silage selbst herstellt, auch in der Lage, seine fäkalen Abfälle zu fermentieren. Ein Kompostwender, der für eine sachgerechte Kompostierung notwendig ist, bzw. eine Biogasanlage müssten weder beschafft noch installiert und betrieben werden. Ebenso ist der Masseverlust gegenüber der Kompostierung sehr viel geringer und die potenzielle Düngewirkung mutmaßlich höher.

6.1. Zukünftige Forschung und Verbesserungen des Verfahrens

Als Nebenbefund konnte eine thermische Inaktivierung der Parasitendauerstadien bei 37°C festgestellt werden - eine Temperatur, die im Vergleich zu Pasteurisationstemperatur unter mäßigem technischen Aufwand erreichbar ist (Sonneneinstrahlung auf schwarze Behälter, Wärmepumpen etc.). Insofern scheint eine bakterielle Hygienisierung bei gleichzeitiger Konservierung und einem anschließendem Erwärmen auf z. B. 45°C als realisierbar. Die sofortige Erwärmung auf 45°C bei Umgehung der milchsauen Fermentation würde vermutlich zu einer methanogenen Fermentation führen.

7. Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Krüger für die Förderung und enthusiastische Unterstützung meiner Dissertation. Zudem bin ich ihr sehr dankbar für das äußerst interessante und faszinierende Thema.

Frau Prof. Dr. Dittmann-Thünemann danke ich für die Möglichkeit zur Promotion, sowie die Unterstützung zur Methodenwahl, insbesondere der TGGE sowie den Diskussionen insbesondere zum molekularbiologischen Teil.

Ich danke allen Kollegen des Institutes für die freundliche und professionelle Zusammenarbeit, Hilfe und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Linde danke ich für die umfangreichen Diskussionen und die wissenschaftliche Unterstützung.

Herrn Petri sei gedankt für die technische Unterstützung während des Substitutionsexperimentes.

Dem Institut für Virologie und dem Institut für Parasitologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig danke ich, insbesondere Herrn Dr. Stöckel, Frau Dr. Dittmar, Frau Erfurt sowie der jeweiligen Institutsleitung, den Professoren Dr. Alber, Dr. Müller und Dr. Vahlenkamp für die kostenlose Bereitstellung der Parasiten bzw. Viren sowie deren Quantifizierung und die freundliche Unterstützung.

Ich danke dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rodloff für die freundliche Bereitstellung der Mykobakterien.

Der Firma Applied Math NV, Sint-Martens-Latem, Belgien, danke ich für die freundliche Genehmigung der Veröffentlichung der mit der Trial-Version von GelCompare II erstellten Dendrogramme.

Zudem danke ich für die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt, die große Teile der Forschung finanziell unterstützt hat (DBU AZ 27937 1/2), sowie für die finanzielle Unterstützung durch das Sächsische Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft.

Frau Dr. Uta Demus danke ich für die fruchtbaren Diskussionen über das Primerpaar.

Herrn Dr. Klaus Krüger sei gedankt für die zusätzliche Zeit zum Vervollständigen der Dissertation in der GMBU e.V..

Ich danke Anne Seyffert und Marianne Schneider für ihre sehr gewissenhafte Durchsicht der Rechtschreibung und Grammatik.

Zu guter Letzt danke ich meinen Skatbrüdern Herrn Heiko Herrmann und Herrn Dr. Norman Martin Ständer für notwendige Anregungen und Zerstreuungen.

Ich habe gepflanzt, Apollos hat begossen; aber Gott hat das Gedeihen gegeben. 1.Kor 3,6

8. Anhang

8.1. Matrices

Tabelle 6: Inhaltsangaben der genutzten Matrices 1 bis 11

Nr.	Kürzel	Zusammensetzung	Kurzbeschreibung
1	K	500 g Rindergülle 94 g Weizenkleie, 38,5 g Holzkohle, 12 g Sägespäne, 61 g Bentonit, und 61,5 g Basaltgesteinsmehl	Ausgangsmatrix auf Rindergüllebasis
2	S	500 g Filterkuchen von jeweils 10 Schlämmen verschiedener Kleinkläranlagen 94 g Weizenkleie, 38,5 g Holzkohle, 12 g Sägespäne, 61 g Bentonit, and 61,5 g Basaltgesteinsmehl	Ausgangsmatrix auf Klärschlammbasis
3	KEM	384 g von Matrix K 125 ml EM = „Effektive Mikroorganismen“	Rindergüllematrix mit zusätzlichen <i>Lactobacillaceae</i>
4	K(EM)_a	384 g von Matrix K 125 ml autoklavierte EM	Kontrolle zu Matrix KEM , um den Einfluss der zusätzlichen <i>Lactobacillaceae</i> zu testen
5	(KEM)_a	Matrix KEM autoklaviert	Kontrolle zu Matrix KEM , um den Einfluss der Gesamtflora zu testen
6	(K(EM)_a)_a	Matrix K(EM)_a autoklaviert	Kontrolle zu Matrix K(EM)_a , um den Einfluss der Gesamtflora zu testen
7	S_{Pool}	Matrix S , gepoolter Filterkuchen von 5 Anlagen	gepoolte Probe aus Matrix S , um die Probenzahl zu reduzieren
8	(S_{Pool})_a	Matrix S_{Pool} autoklaviert	Vergleichsmatrix zu Matrix S_{Pool} , um den Einfluss der Gesamtflora zu testen
9	S_{Pool}-Wk	Matrix S ohne Weizenkleie	Ausgangsmatrix S_{Pool} , auf Klärschlammbasis ohne Weizenkleie zum Test deren Einflusses
10	S_{Pool}-Wk+Sp	Matrix S_{Pool} ohne Weizenkleie jedoch mit 36 g zusätzlichen Sägespänen	Ausgangsmatrix S_{Pool} , Weizenkleie wurde mit Sägespänen substituiert (v/v), um eine vergleichbare Trockensubstanz zu erhalten.
11	Fä+Wk	500 g Fäkalien plus 190g Weizenkleie	Substitution aller Zusätze durch Weizenkleie

Chemische Feststoffanalyse
der Basalt und Diabas Gesteinsmehle der NHW

Produktionsstandort	Nesselgrund 98593 Schnellbach	Seifersdorf 09603 Großschirma	Oelberg 37235 Hessisch-Lichtenau
Gesteinsart	Diabas	Diabas	Basalt
Hauptelemente	Ma. %		
SiO ₂ Silicium	49,77	37,10	40,38
Al ₂ O ₃ Tonerde	13,89	11,90	12,00
CaO Calcium	7,10	17,20	12,10
MgO Magnesium	4,44	4,20	6,35
Fe ₂ O ₃ Eisen	16,13	12,90	17,52
Na ₂ O Natrium	3,47	2,14	2,83
P ₂ O ₅ Phosphor	1,08	0,08	3,20
MnO Mangan	0,26	0,30	0,20
K ₂ O Kalium	1,74	0,90	2,80
SO ₃ Schwefel	0,15	0,10	0,00
TiO ₂ Titan	1,95	2,30	2,73

Durchschnittliche Korngröße: 95% kleiner 0,09 mm

Allgemeine Baustoff-Handels-Contor GmbH

Thomas Hörner

Abbildung 34: Zusammensetzung des Gesteinsmehls

8.1. Molekularbiologie: Protokolle, Puffer, Lösungen

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die PCR

Reagenzien	Mastermix, einfach	Menge in μl
Forward Primer U968-GC-f (30 pmol/ μ l TIB MolBiol, Berlin, Deutschland)		0,75
Reverse Primer L1401-r (30 pmol/ μ l TIB MolBiol)		0,75
NH ₄ -Puffer (10x, Invitek, STRATEC, Berlin, Deutschland)		5
MgCl ₂ -Puffer (50 mM, Invitek)		5
BSA(0,5 mg/ml Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) - Aqua dest.		36,5
dNTPs (10 mM/ml)		0,75
Taq-Polymerase (5 U/ μ l, Invitek)		0,75
Gesamt		49,5
Template rDNS	2,5	

Tabelle 8: PCR-Protokoll (153, 342)

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

Tabelle 9: Zusammensetzung der Stopplösung

Reagenzien	Menge
Glyzerin (Roth)	5 ml 98 %ig
Bromphenolblau (Roth)	15 mg
EDTA pH 8 (Roth)	2 ml 0,5 M
1 M TrisHCL pH 8 (Serva, Heidelberg, Deutschland)	0,1 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung der 10-fach konzentrierten Stammlösung, TBE-Puffer

Reagenzien	Menge
TRIS Base (Roth)	108 g
Borsäure (Roth)	55 g
EDTA (Roth)	7,4 g
mit Aq _{dest} auffüllen	auf 1 l

Tabelle 11: Silberfärbeprotokoll (54), *modifiziert* nach (407)

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 _{dest}
Silberbindung	30 min	500 ml Aq _{dest} 0,8 g AgNO ₃ (VEB Feinchemie Sebnitz, Sebnitz, Deutschland) 500 µl Formaldehyd (37% Roth)
<i>Waschen</i>	<i>10 s Gel abspülen</i> <i>30 s Wasserbad</i> <i>10 s Gel abspülen</i>	frisches Aq _{dest}
Entwicklung	Bis zum Erscheinen der Banden. <i>Lösung 2 auf 45°C</i> <i>erhitzt</i>	Lösung 1: 2 g Na ₂ S ₂ O ₃ (Merck) in 10ml Aq _{dest} Lösung 2: 12g Na ₂ CO ₃ (Merck) in 500 ml Aq _{dest} 500 µl von Lösung 1 in 2 geben sowie 500 µl Formaldehyd(37%)
Entwicklungsstopp	30 min <i>Lösung auf 45°C</i> <i>erhitzt</i>	7,3 g EDTA (Natriumsalz, Roth) und 10 g Glyzin in 500 ml Aq _{dest}

Tabelle 12: Gelzusammensetzung (54) *modifiziert* nach (407)

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

* ursprüngliches Verhältnis 37,5:1

8.2. Konzentrationen pathogener Animpfkulturen

Tabelle 13: Stämme und Animpfkonzentrationen für 3.2.6

Mix	Spezies (* = auf Antibiotika-resistenz selektierte MO)	Konzentration in log ₁₀ KbE/g	Herkunft
Mix 1	<i>Salmonella</i> Anatum*	6,78	Lab Nr. 12602/2
	<i>Listeria monocytogenes</i> *	6,88	Lab Nr. 12602/5
	<i>E. coli</i> O:157*	6,89	Lab Nr. 12602/3
	<i>Clostridium perfringens</i>	6,74	Wildstamm
Mix 2	<i>Salmonella</i> Senftenberg	7,82	DSMZ Nr. 10062
	<i>Staphylococcus aureus</i> *	6,96	Lab Nr. 12602/4
	<i>Clostridium sporogenes</i>	7,39	ATCC3584
Mix 3	<i>Salmonella</i> Senftenberg	7,52	DSMZ Nr. 10062
	<i>Listeria monocytogenes</i> *	6,71	Lab Nr. 12602/5
	<i>Staphylococcus aureus</i> *	6,66	Lab Nr. 12602/4
	<i>E.coli</i> O:157 *	6,71	Lab Nr. 12602/3
	<i>Clostridium perfringens</i>	6,56	Wildstamm
	<i>Clostridium sporogenes</i>	7,09	ATCC3584

8.3. Konzentrationen flüchtiger Fettsäuren (VFAs)

Tabelle 14: Milchsäure- und Gärsäurenkonzentrationen

n-Buttersäure (Roth)	Essigsäure (Roth)	Milchsäure (Roth)	Propionsäure (Merck)	Säuregemisch (VFA)	Kontrolle (NB1)
i-Buttersäure (Alfa Aesar*)					
0,12 %	0,46 %	1 %	0,1 %	(Alle Säuren in den links angegebenen Konzentrationen)	(ohne Säuren)
0,01 %					

*(USA, WardHill, MA)

Tabelle 15: Umrechnung von Tabelle 3 in mmol, Mittelwerte der Milch- und Gärsäurenanalytik in Matrix 7 im Verlauf der Zeit

Einheit: mmol	0 h	20 h	47 h, 15 min	88 h
Essigsäure	14,32	63,66	69,44	76,65
Propionsäure	17,82	15,12	14,62	13,94
i-Buttersäure	0,81	0,76	0,75	0,73
n-Buttersäure	1,19	14,19	13,47	13,31
i-Valeriansäure	0,89	0,81	0,81	0,76
n-Valeriansäure	0,71	0,72	0,67	0,63
n-Caprinsäure	< 0,43	< 0,43	< 0,43	< 0,43
Milchsäure	54,40	109,16	135,07	138,40

8.4. Nährböden

**CATC-Agar (Basis)
(Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar)**

TN1273 500g

**Zweckbestimmung und Anwendungsgebiet**

Zur Isolierung von Enterokokken aus Lebensmitteln.

Form

Pulver

Farbe

Beige

Lagerung

Trocken, verschlossen, bei 10...25 °C.

Haltbarkeit

3 Jahre

Zubereitung

54,5 g in 1 Liter Aqua dest. suspendieren und 1 ml Tween 80 pro Liter Nährboden zufügen. Vorsichtig unter Rühren bis zum vollständigen Lösen erhitzen und sofort rasch abkühlen. Nicht autoklavieren! Gut mischen und Platten gießen.

Typische Zusammensetzung in g pro 1 Liter Nährmedium

Caseinpepton	15,0
Hefeextrakt	5,0
Kaliumdihydrogenphosphat	5,0
Natriumcitrat	15,0
Natriumcarbonat	2,0
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	0,1
Natriumazid	0,4
Agar	12,0
Gesamtmenge	54,5

pH-Wert

des fertigen Mediums bei 25 °C: 7,0 ± 0,2

Mikrobiologische Qualitätskontrolle

CATC-Agar (Basis) (Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar) wird aerob 22-48 Stunden bei 36 ± 1 °C inkubiert.

Teststamm	ATCC-Nr.	KBE/Platte	Wachstum, Koloniemorphologie
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	10-100	gutes Wachstum, mittelgrosse rote Kolonien
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	10-100	gutes Wachstum, mittelgrosse rote Kolonien
<i>Enterococcus faecalis</i>	49542	10-100	gutes Wachstum, mittelgrosse rote Kolonien
<i>Enterococcus hirae</i>	8043	10-100	teilweise gehemmtes Wachstum, kleine, rosa bis rote Kolonien
<i>Enterococcus faecium</i>	27270	10-100	teilweise gehemmtes Wachstum, kleine farblose bis rosa Kolonien mit rotem Zentrum
<i>Enterococcus faecium</i>	35667	10-100	teilweise gehemmtes Wachstum, kleine farblose bis rosa Kolonien mit rotem Zentrum
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	10-100	teilweise gehemmtes Wachstum, kleine farblose bis rosa Kolonien mit rotem Zentrum
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	ca. 1000	kein Wachstum
<i>Escherichia coli</i>	25922	ca. 1000	kein Wachstum
<i>Lactobacillus lactis</i>	Laborstamm	ca. 1000	kein Wachstum

Hersteller: SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin · Berliner Allee 317-321 · 13088 Berlin · Deutschland · Fon +49-30-92 70 30-0 · Fax +49-30-92 70 30-30 · info@sifin.de · www.sifin.de

Abbildung 35: Datenblatt CATC-Agar



PRODUKT SPEZIFIKATION

CE

Artikel-Bezeichnung	Columbia Agar mit Schafblut ^{PLUS}
Artikel-Nummer	PB5039A

Produktaufmachung	Fertigplatte
Lagerung	6 – 12°C
Füllgewicht	17 g ± 5 %
Abpackung	10 Platten verpackt in Folie
pH	7,3 ± 0,2
Farbe	Verkehrsrot, opak
Haltbarkeit	8 Wochen
Verwendungszweck	Hochwertiges, universelles Medium zum Wachstum anspruchsvoller Keime mit deutlich ausgeprägten Hämolyseformen. Nur für den Laborgebrauch bestimmt und von erfahrenem Personal einzusetzen.

Typische Zusammensetzung	g/l
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	10,0
Defibriniertes Schafblut	50,0 ml

Anwendung	Abhängig von unterschiedlichen Untersuchungsmethoden. Zur Information siehe Oxoid CM331 .
-----------	--

Qualitätskontrolle

1. Prüfung der allgemeinen Produktmerkmale
Etikettierung und Schalendruck
2. Sterilitätskontrolle
≥ 72 h bei 25 ± 1°C, aerob
≥ 72 h bei 36 ± 1°C, aerob
3. Biologische Prüfung
Inokulum für Produktivität: 10 – 100 KBE
Inokulum für Spezifität: < 10 000 KBE

Inkubationsbedingungen: 18 – 24 h bei 36 ± 1°C, aerob

Kontrollstamm	Wachstum
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC [®] 12344	1 – 2 mm, hellgraue Kolonien mit β-Hämolyse.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC [®] 25923	Gutes Wachstum, weiße Kolonien.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC [®] 6538	Gutes Wachstum, gelbe glänzende Kolonien mit Hämolyse.
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC [®] 6305	Gutes Wachstum, dunkelgraue Kolonien mit α-Hämolyse.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC [®] 9027	Gutes Wachstum, graue glänzende Kolonien.
<i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 8739	Gutes Wachstum, dunkelgraue Kolonien.

ATCC[®] is a registered trademark of American Type Culture Collection.

27.01.09

PB5039Adev07

Abbildung 36: Datenblatt Columbia Agar

Nährböden

DRCM-Bouillon

(Differential Reinforced Clostridial Medium)

Art.-Nr. CM 927

Zum Nachweis Sulfid-reduzierender, sporenbildender Anaerobier (Clostridien) nach DIN 38411 (DEV)¹ und dem § 35 LMBG² sowie zur Koloniezahlbestimmung nach der MPN-Methode.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pepton	10,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	10,0
Hefeextrakt	1,5
Stärke	1,0
Glucose	1,0
L-Cystein	0,5
Natriumacetat	5,0
Natriumdisulfit	0,4
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,7
Resazurin	0,002
pH 7,1 ± 0,1	

Zubereitung

30,1 g DRCM-Bouillon in 1 l Aqua dest. lösen und in Röhrcchen abfüllen. 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren.

Beschreibung

DRCM-Bouillon wurde von Freame und Fitzpatrick³ sowie von Gibbs⁴ zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von Clostridien eingesetzt. Das Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung der Fraunhofer-Gesellschaft⁵ empfiehlt den Nährboden zur Untersuchung von Verpackungsmaterialien. Die DRCM-Bouillon ist als Weiterentwicklung nach Hirsch und Grinstead⁶ sowie nach Gibbs und Hirsch⁷ aus dem Clostridien-Nährboden (RCM) hervorgegangen.

Im Gegensatz zum Clostridien-Agar bzw. -Nährboden, halbfest (RCM) sind Clostridien in der DRCM-Bouillon anhand einer Schwarzfärbung direkt feststellbar. Clostridien reduzieren das in der Bouillon enthaltene Sulfid zu Sulfid, das als Eisensulfid den Nährboden schwarz färbt. Da auch andere Bakterien Sulfid bilden können, sollte das Untersuchungsmaterial entsprechend vorbehandelt (z.B. pasteurisiert) werden, so daß vegetative Formen abgetötet werden. Danach wird der Nachweis anaerober Sporenbildner durchgeführt. Der Redoxindikator Resazurin dient zur Kontrolle der Anaerobiose.

Gibbs und Freame⁸ konnten durch den Zusatz von Polymyxin B (70 IE/ml) zur DRCM-Bouillon das Wachstum der meisten Nicht-Sporenbildner verhindern.





PRODUKT SPEZIFIKATION



Artikel-Bezeichnung	M.R.S. Agar
Artikel-Nummer	PO5047A

Produktaufmachung	Fertigplatte
Lagerung	6 – 12°C
Füllgewicht	17 g ± 5 %
Abpackung	10 Platten verpackt in Folie
pH	5,7 ± 0,2
Farbe	Elfenbeinfarben, transparent
Haltbarkeit	26 Wochen
Verwendungszweck	Ein Nährboden zur Anzucht, Isolierung und Koloniezahlbestimmung von Lactobazillen. Nur für den Laborgebrauch bestimmt und von erfahrenem Personal einzusetzen.

Typische Zusammensetzung	g/l
Pepton	10,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	8,0
Hefeextrakt	4,0
Glucose	20,0
Sorbitolmonooleat	1,0 ml
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Natriumacetat	5,0
Triammoniumcitrat	2,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangan (II) – sulfat	0,05
Agar	10,0

Anwendung	Abhängig von unterschiedlichen Untersuchungsmethoden. Zur Information siehe Oxoid CM361 .
-----------	--

Qualitätskontrolle

- Prüfung der allgemeinen Produktmerkmale
Etikettierung und Schalendruck
- Sterilitätskontrolle
≥ 72 h bei 25 ± 1°C, aerob
≥ 72 h bei 36 ± 1°C, aerob
- Biologische Prüfung
Inokulum für Produktivität: 10 – 100 KBE
Inokulum für Selektivität: 10⁴ – 10⁵ KBE

Inkubationsbedingungen: 72 h bei 30 ± 1°C, aerob

Kontrollstamm	Wachstum
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	0.5 – 2 mm, weiß glänzende Kolonien.
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	1 – 3 mm, cremefarben glänzende Kolonien.
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 33316	0.5 – 2 mm, weiß glänzende Kolonien.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Kein Wachstum.
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Kein Wachstum.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibiertes bis kein Wachstum.

Getestet gemäß CEN ISO/TS 11133-2.



PRODUKT SPEZIFIKATION

CE

Artikel-Bezeichnung	Sabouraud Glucose Selektivagar mit Chloramphenicol
Artikel-Nummer	PO5070A

Produktaufmachung	Fertigplatte
Lagerung	6 – 12°C
Füllgewicht	17 g ± 5 %
Abpackung	10 Platten verpackt in Folie
pH	5,6 ± 0,2
Farbe	Elfenbein, transparent
Haltbarkeit	26 Wochen
Verwendungszweck	Ein Medium zur Isolierung von Pilzen. Nur für den Laborgebrauch bestimmt und von erfahrenem Personal einzusetzen.
Anwendung	Abhängig von unterschiedlichen Untersuchungsmethoden. Für Informationen siehe Oxoid CM41 .

Typische Zusammensetzung	g/l
Mykologisches Pepton	10,0
Glucose	40,0
Chloramphenicol	0,1
Agar	20,0

Qualitätskontrolle

1. Prüfung der allgemeinen Produktmerkmale
Etikettierung und Schalendruck
2. Sterilitätskontrolle
≥ 72 h bei 25 ± 1°C, aerob
≥ 72 h bei 36 ± 1°C, aerob
3. Biologische Prüfung
Inokulum für Produktivität: 10 – 100 KBE
Inokulum für Selektivität: 10⁴ – 10⁵ KBE

Inkubationsbedingungen:
Bis zu 5 Tagen bei 20-25°C, aerob

Kontrollstamm	Wachstum
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	2 – 3 mm, weiße Kolonien. Komplette Hemmung (≤10 Kolonien). 10 – 20 mm, weißes Myzel, schwarze Sporen.

In Übereinstimmung mit der Europäischen Pharmacopoeia, 4. Ausgabe 2002 und der US Pharmacopoeia 25 NF 20, 2002 getestet. Geprüft wird auf deutlich sichtbares Wachstum in parallelen Tests.

13.06.07

OXOID GmbH · Am Lippeglacis 4-8 · D-46483 Wesel

PS-PO5070Adev06

Abbildung 39: Datenblatt Sabouraud Agar

Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner, modifiziert

TN1194 500g
TN1195 5kg

**Zweckbestimmung und Anwendungsgebiet**

Zum Nachweis und zur Isolierung von Enterobacteriaceae aus Lebensmitteln (besonders Fleisch) und anderen Untersuchungsmaterialien.

Form

Pulver

Farbe

Grün

Lagerung

Trocken, verschlossen, bei 10...25 °C.

Haltbarkeit

5 Jahre

Zubereitung

47,7 g in 1 Liter Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen aufkochen. Gut mischen und Platten gießen.

Typische Zusammensetzung in g pro 1 Liter Nährmedium

Fleischpepton	4,4
Caseinpepton	4,4
Hefeextrakt	2,7
Lactose	10,0
Saccharose	10,0
Natriumchlorid	5,0
Metachromgelb	0,8
Wasserblau	0,4
Agar	10,0
Gesamtmenge	47,7

pH-Wert

des fertigen Mediums bei 25 °C: 7,0 ± 0,2

Mikrobiologische Qualitätskontrolle

Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner, mod. wird aerob 18-22 Stunden bei 36 ± 1 °C inkubiert.

Teststamm	ATCC-Nr.	KBE je Platte	Wiederfindung Test zu Inokulum-Kontrolle	Koloniemorphologie
<i>Escherichia coli</i>	25922	10-100	>50%	blau mit blauem Hof
<i>Escherichia coli</i>	10536	10-100	>50%	blau mit blauem Hof
<i>Escherichia coli</i>	8739	10-100	>50%	blau mit blauem Hof
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	10-100	>50%	blau mit blauem Hof
<i>Salmonella Typhimurium</i>	14028	10-100	>50%	gelb mit gelbem Hof
<i>Proteus mirabilis</i>	29906	10-100	>50%	gelb mit gelbem Hof, schwärmend
<i>Shigella flexneri</i>	29929	10-100	>50%	gelb mit gelbem Hof
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	100-1000	<0,1%	entfällt
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	100-1000	<0,1%	entfällt

Hersteller: SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin · Berliner Allee 317-321 · 13088 Berlin · Deutschland · Fon +49-30-92 70 30-0 · Fax +49-30-92 70 30-30 · info@sifin.de · www.sifin.de

Abbildung 40: Datenblatt Gassner Agar

Tabelle 16: Mykobakterien-Agar (pro l)

Nähragar 1 (Sifin)	35 g
Schafblut (Oxoid)	5-10 %ig
Glukose (Sifin)	5 g
<i>Glycerol</i> (Roth)	20 g
Polymyxin B (Fluka)	100 mg
<i>Amphotericin B</i> (Roth)	5 mg
<i>Carbenicillin</i> (Roth)	25 mg
<i>Trimethoprim</i> (Fluka)	2,5 mg

Schräggedruckt in Anlehnung an MB REDOX (heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland)

8.5. Quantitative Daten, Matrix S

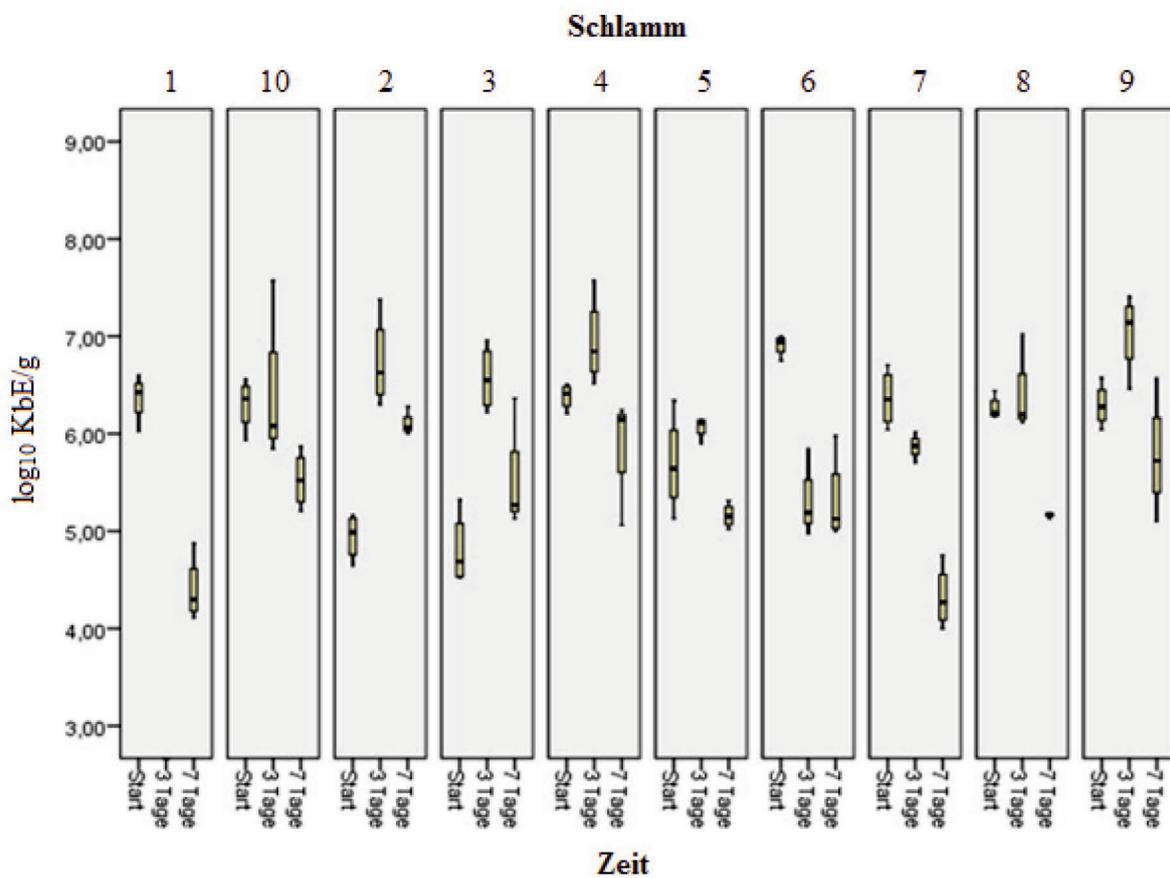


Abbildung 41: Mediane der aeroben Gesamtkeimzahl der verschiedenen Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

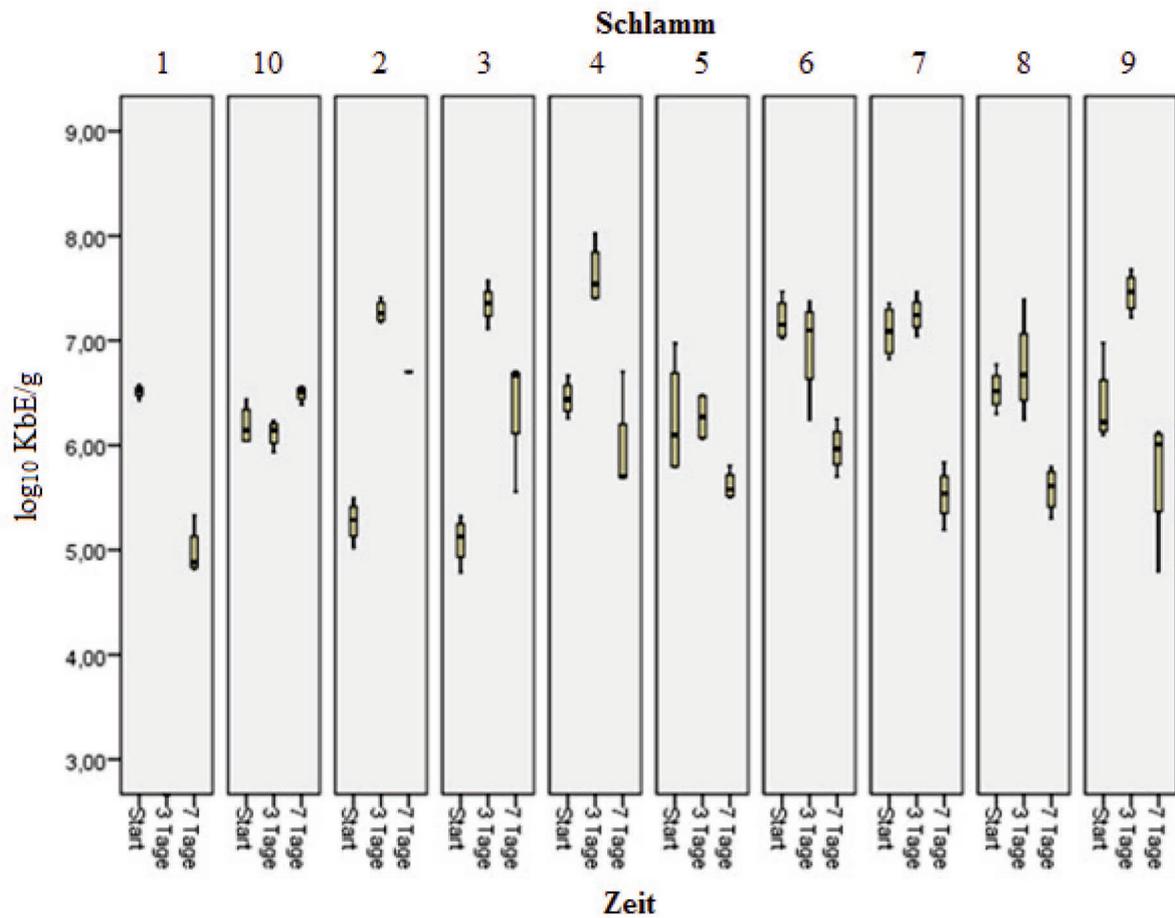


Abbildung 42: Mediane der anaeroben Gesamtkeimzahl der verschiedenen Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

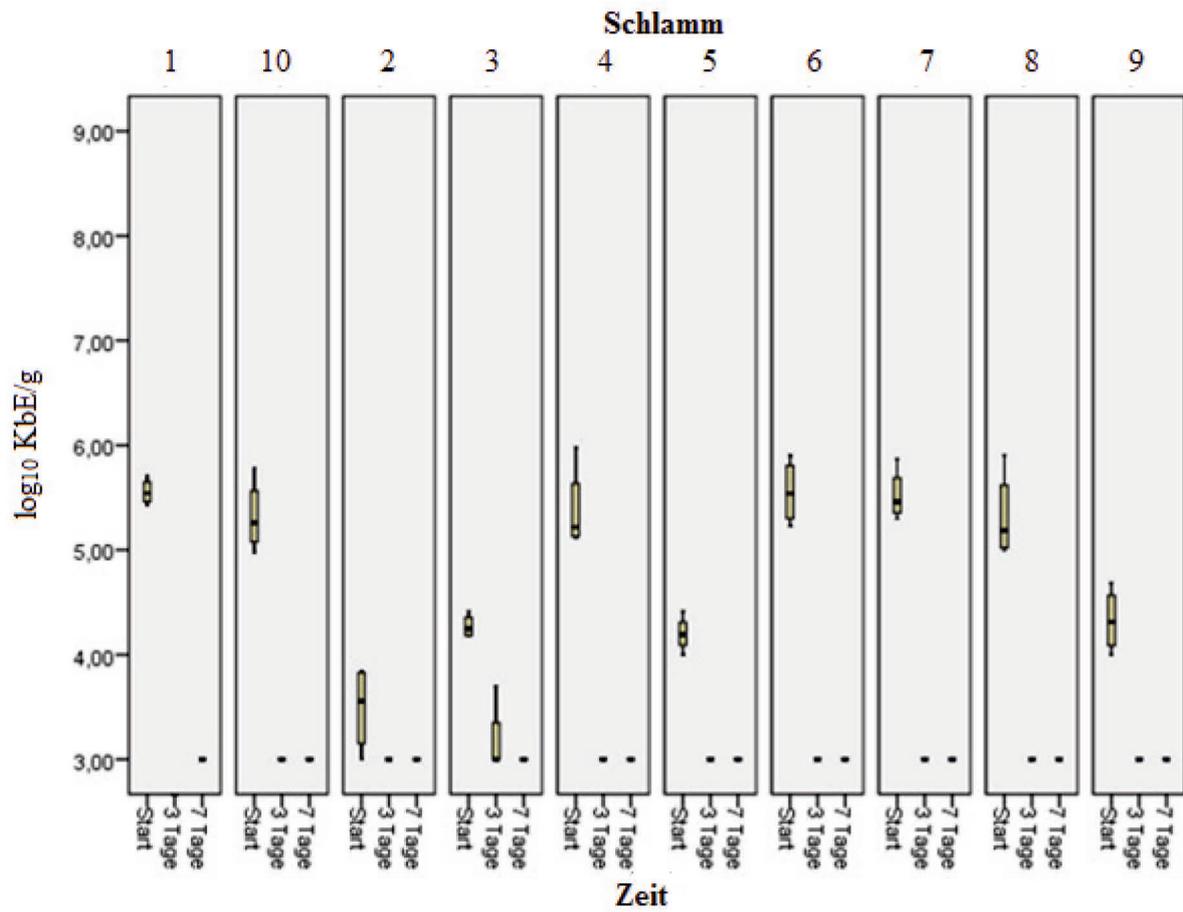


Abbildung 43: Mediane der Gram-negativen Gesamtkeimzahl der verschiedenen Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

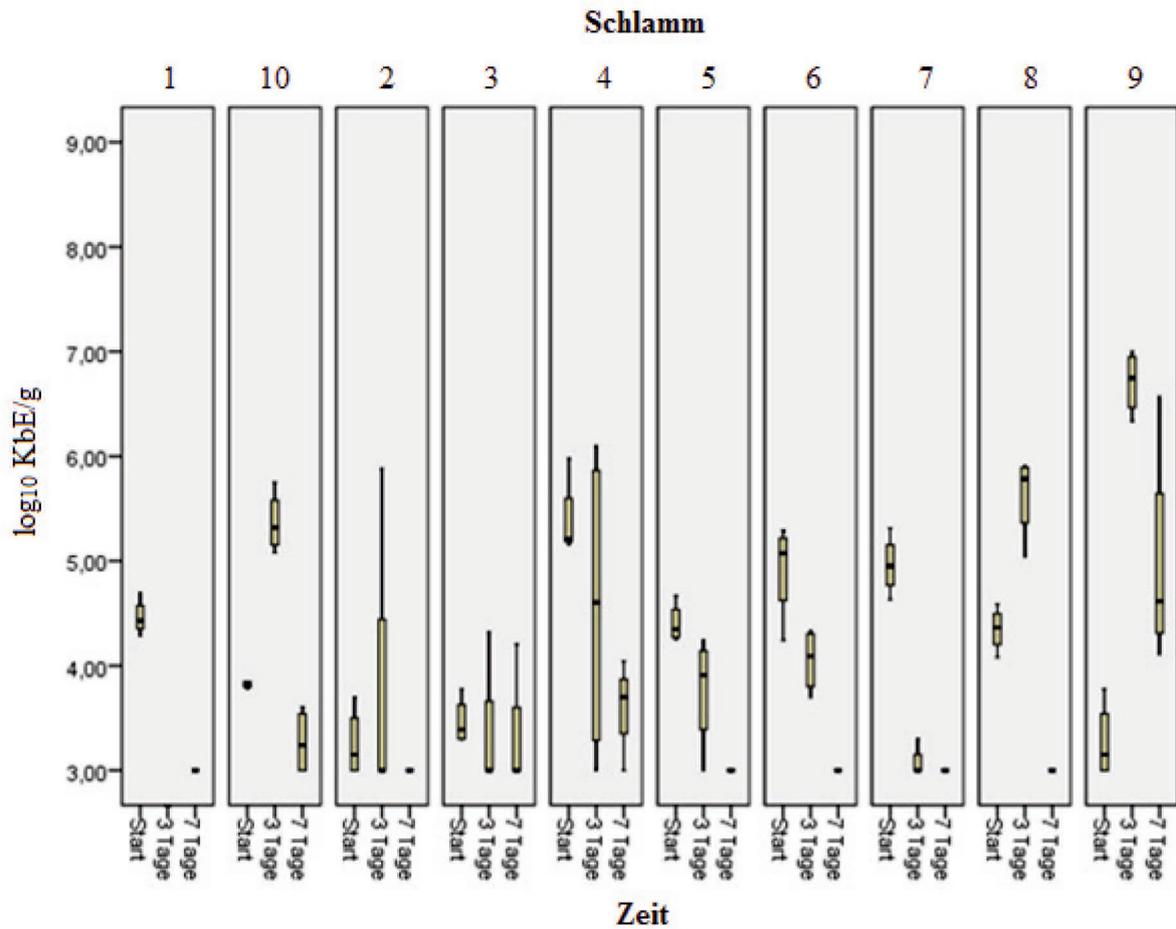


Abbildung 44: Mediane der Konzentration der Enterokokken verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

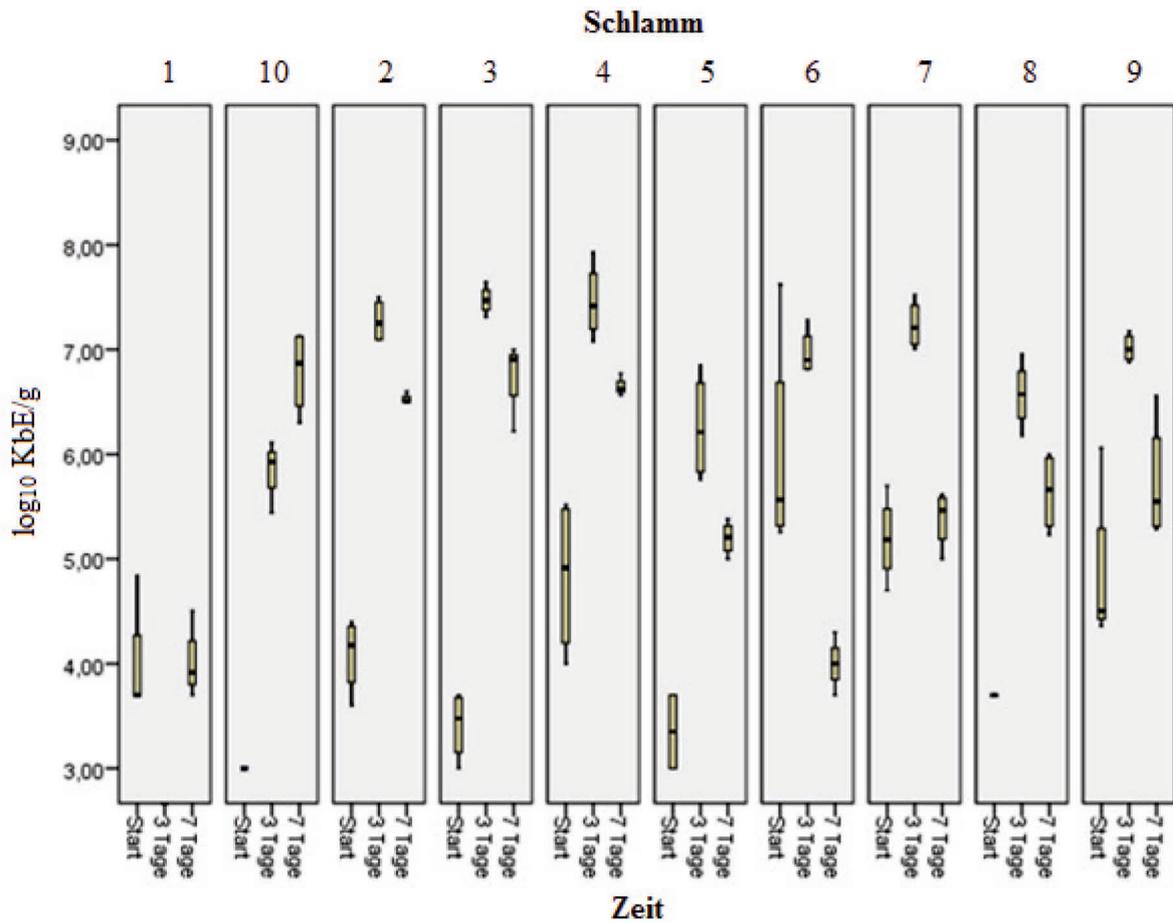


Abbildung 45: Mediane der Konzentration der *Lactobacillaceae* verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

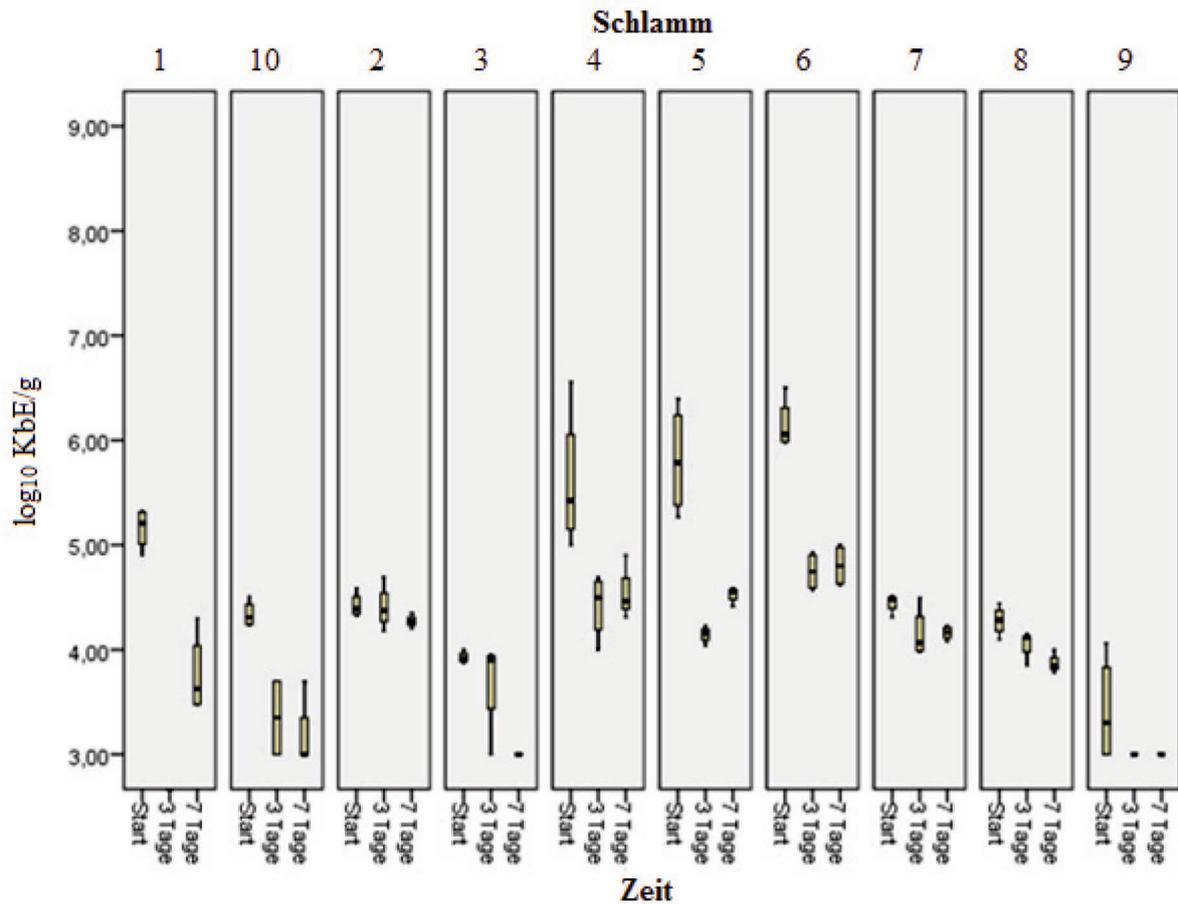


Abbildung 46: Mediane der Konzentration der Clostridien verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

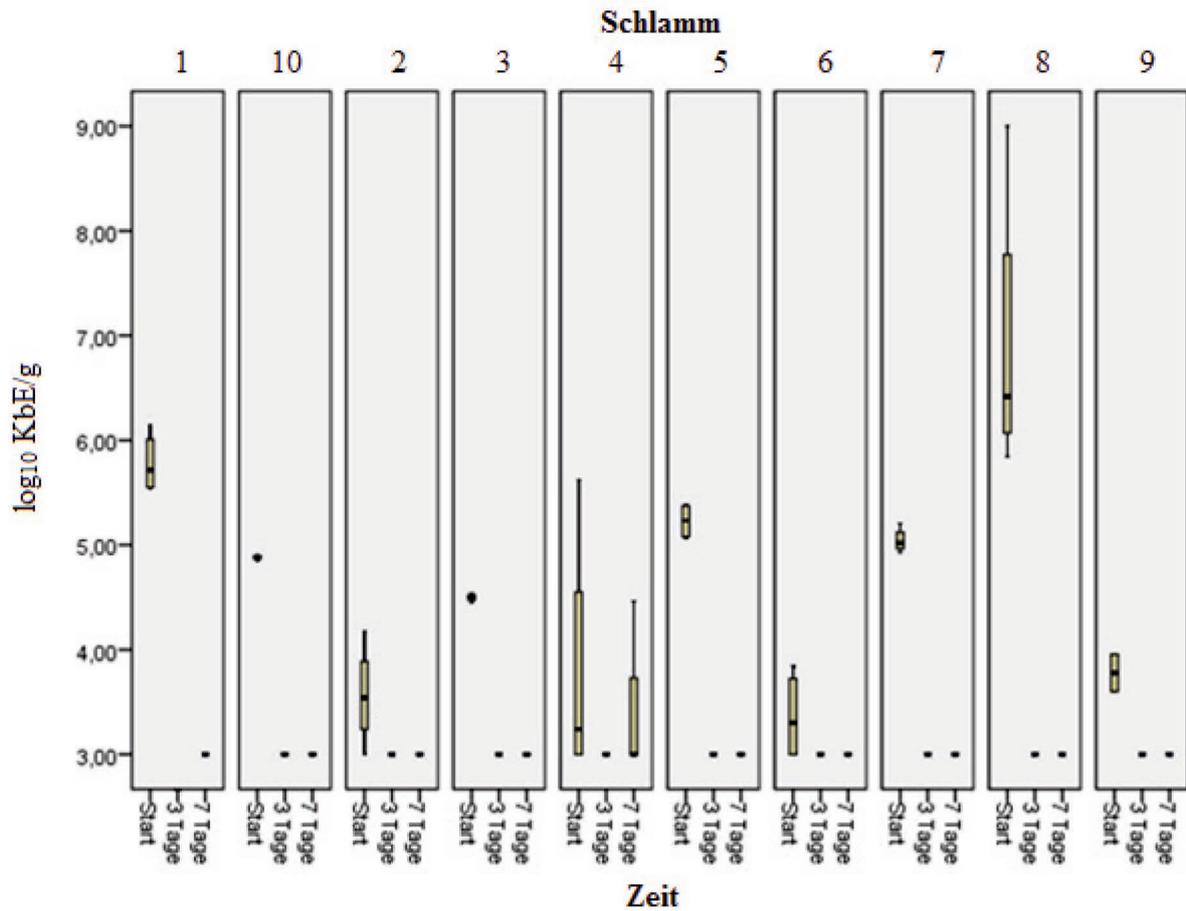


Abbildung 47: Mediane der Konzentration der Hefe- und Schimmelpilze verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

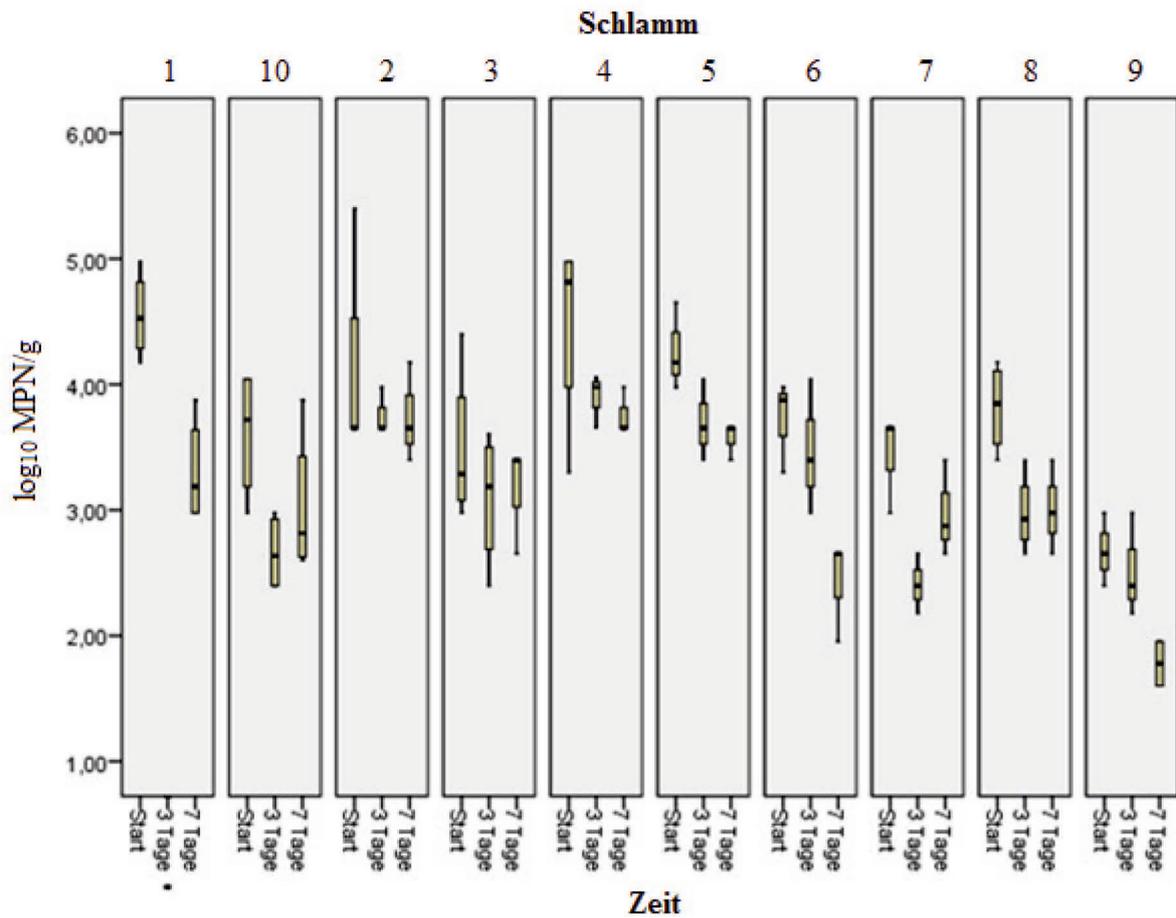


Abbildung 48: Mediane der Konzentration der sporenbildenden Sulfitreduzierer verschiedener Klärschlämme 1 bis 10 (Matrix S) im Verlauf der 7-tägigen Fermentation

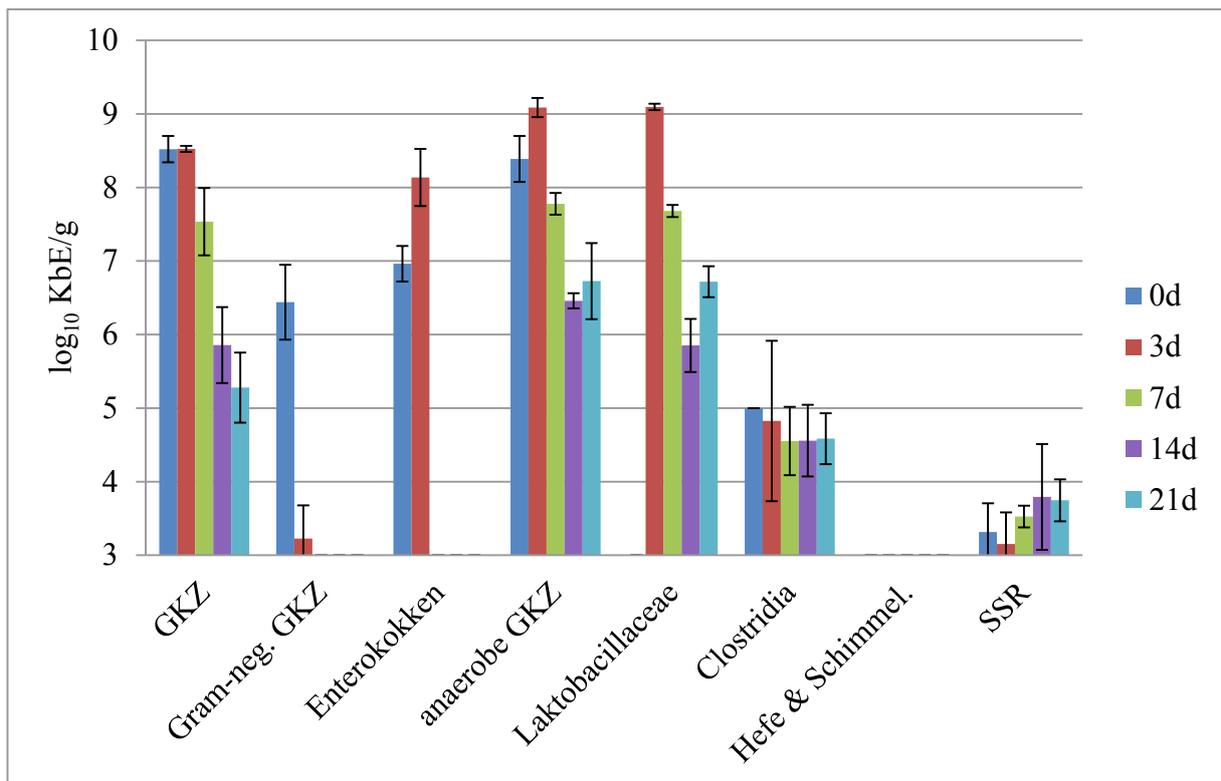


Abbildung 49: Mittelwerte der quantitativen mikrobiologischen Parameter von einer Klärschlammatrix (ähnlich Matrix S, jedoch kam der Schlamm aus einer technisch sehr unterschiedlichen Kleinkläranlage) im Verlauf von 21 Tagen Fermentation

8.6. Qualitative Daten

8.6.1. Qualitative Daten Matrix K

Legende:

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

Tabelle 17: Mikroflora von Matrix **K**, vor und nach dreiwöchiger Fermentation

Vor der Fermentation	Nach 3 Wochen Fermentation
<i>Aerococcus viridians</i> (+) (10^6 KbE/g)	<i>Bacillus licheniformis</i> (+) ($10^4 - 10^5$ KbE/g)
<i>Bacillus licheniformis</i> (+) (10^4 KbE/g)	<i>Bacillus pumilus</i> (++) (10^4 KbE/g)
<i>Bacillus pumilus</i> (++) (10^5 KbE/g)	<i>Brevibacillus agri</i> (++) ($10^4 - 10^5$ KbE/g)
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> (+) ($10^5 - 10^6$ KbE/g)	<i>Lactobacillus buchneri</i> (+) ($10^4 - 10^5$ KbE/g)
<i>Corynebacterium casei</i> (++) ($10^5 - 10^6$ KbE/g)	<i>Lactobacillus harbinensis</i> (+++) (10^5 KbE/g)
<i>E. coli</i> (++) ($10^4 - 10^5$ KbE/g)	<i>Lactobacillus paracasei</i> (+++) ($10^5 - 10^6$ KbE/g)
<i>Enterobacter amnigenus</i> (+++) (10^4 KbE/g)	<i>Pediococcus acidilactici</i> (++) (10^4 KbE/g)
<i>Enterococcus faecium</i> (+++) (10^4 KbE/g)	
<i>Enterococcus hirae</i> (++) (10^3 KbE/g)	
<i>Lactobacillus plantarum</i> (++) (10^3 KbE/g)	
<i>Lactobacillus salivarius</i> (+++) ($10^3 - 10^4$ KbE/g)	
<i>Pantoea agglomerans</i> (+++) (10^3 KbE/g)	
<i>Providencia rettgeri</i> (+++) (10^3 KbE/g)	
<i>Pseudomonas flavescens</i> (+) (10^3 KbE/g)	
<i>Staphylococcus fleuretii</i> (+) (10^3 KbE/g)	
<i>Streptococcus lutetiensis</i> (+) (10^3 KbE/g)	

Tabelle 18: Charakterisierung der Klärschlämme nach Einleitern

Einwohnerzahl bzw. Einwohnergewichte	Bemerkung	Abkürzung
64	Seniorenheim	KS1
144	Anwohner	KS2
35 EGW	Anwohner, Krippe, Kita	KS3
31	Seniorenheim	KS4
16	Anwohner	KS5
20 EGW	Anwohner + Sporthallennutzung	KS6
50 EGW	Anwohner + Schulungsteilnehmer	KS7
8	Anwohner	KS8
4	Anwohner	KS9
2	Gewerbe	KS10

8.6.2. Qualitative Daten Matrix S

Tabelle 19: Mikroflorenveränderung der verschiedenen Klärschlämme der Matrix S, zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten

	Vor der Fermentation	Nach 3 Tagen Fermentation	Nach 7 Tagen Fermentation
Bakterienart	Gefunden in	Gefunden in	Gefunden in
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (++)	KS3/1,2 (10 ³) KS6/1 (10 ⁴) KS7/3,4 (10 ⁴ -10 ⁵)		
<i>Acinetobacter junii</i> (++)	KS1/1,3 (10 ⁵ -10 ⁶)		
<i>Acinetobacter parvus</i> (++)	KS5/3 (10 ⁴)		
<i>Acinetobacter tandoii</i> (+)	KS4/2,4 (10 ⁵ -10 ⁶)		
<i>Acinetobacter townneri</i> (+)	KS1/1,2 (10 ⁵) KS4/1,2,3,4(10 ⁵ -10 ⁶)		
<i>Aeromonas caviae</i> (+)	KS5/2 (10 ³)		
<i>Aeromonas salmonicida</i> (++)	KS7/1,4 (10 ⁵ -10 ⁶)		
<i>Aeromonas veronii</i> (+)	KS10/1,2,3,4 (10 ⁴)		
<i>Bacillus arsenicus</i> (+)		KS4/1,2,3 (10 ⁵ -10 ⁶)	
<i>Bacillus cereus</i> (++)	KS1/1,2,3,4 (10 ⁴) KS2/1,2,3,4 (10 ⁴) KS3/2,3,4 (10 ³) KS4/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS5/1,2,3,4 (10 ⁵) KS7/3,4 (10 ⁴) KS8/1,2,3 (10 ⁴) KS9/1,2,3,4 (10 ⁴) KS10/1,3 (10 ³ -10 ⁴)	KS2/1,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS3/2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS4/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS5/1,3,4 (10 ⁴) KS6/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS7/2,3,4 (10 ³) KS8/1,3,4 (10 ⁴) KS9/1 (10 ⁴) KS10/3,4 (10 ⁴ -10 ⁵)	KS1/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS2/1,4 (10 ⁴) KS3/1,3,4(10 ³ -10 ⁴) KS4/1,3,4 (10 ⁴) KS5/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS6/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS7/1,2,3,4(10 ³) KS8/1,2,3,4 (10 ⁴) KS9/1,2,4(10 ³ -10 ⁴) KS10/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵)
<i>Bacillus flexus</i> (+++)		KS6/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁶) KS7/4 (10 ⁴)	KS5/2 (10 ⁴) KS6/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS7/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS9/4 (10 ³)

<i>B. licheniformis</i> (+)	KS2/3 (10 ⁴) KS3/1,3 (10 ³) KS4/4 (10 ⁴) KS10/1,3 (10 ⁴)	KS2/1(10 ³) KS5/2 (10 ⁴) KS7/3,4 (10 ³) KS8/1,3,4 (10 ⁵) KS10/2(10 ⁴)	KS1/1,3 (10 ³ -10 ⁴) KS4/1,3,4 (10 ⁴) KS6/3(10 ³) KS7/1,2 (10 ³) KS8/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS10/2,3,4 (10 ⁴)
<i>Bacillus megaterium</i> (+)	KS2/1,2,3,4 (10 ⁴)	KS7/4 (10 ⁴)	
<i>Bacillus muralis</i> (+)	KS3/3,4 (10 ³ -10 ⁴)		KS2/3(10 ⁴)
<i>Bacillus mycoides</i> (++)	KS6/2 (10 ⁶) KS9/3 (>10 ³)		KS3/1 (10 ⁴) KS4/4 (10 ³) KS8/1,2,3,4 (10 ⁵) KS10/2 (10 ⁴)
<i>Bacillus pseudomycooides</i> (++)	KS2/1,2,4 (10 ³ -10 ⁴) KS4/3 (10 ⁴)	KS2/2,3,4 (10 ⁴) KS4/1,3 (10 ³ -10 ⁴)	KS2/1,4(10 ³ -10 ⁴)
<i>Bacillus pumilus</i> (+)	KS2/1,3 (10 ⁴)		
<i>Bacillus simplex</i> (+)		KS7/1,4 (10 ³)	
<i>Bacillus subtilis</i> (++)	KS5/1,2,3,4(10 ⁵) KS7 1,2,3,4 (10 ³) KS8 1,2,3,4 (10 ⁴) KS9 1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴)	KS7/2,3,4 (10 ³) KS8/1,2, (10 ⁴ -10 ⁵) KS10/1,3,4 (10 ⁴)	KS4/1,3,4 (10 ⁴) KS5/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS6/4 (10 ⁴)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (++)	KS2/3 (10 ⁵)		KS10/3,4 (10 ⁴ -10 ⁵)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (++)	KS3/1,2,4 (10 ³ -10 ⁴)		KS6/1,2,3,4(10 ⁴)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (+)	KS3/1 (10 ⁴)		
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> (+++)			KS7/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS9/1,3,4(10 ⁴ -10 ⁵)
<i>Candida glabrata</i> (+++)	KS3/3(10 ³) KS4/1(10 ³) KS6/2,4 (10 ³)		
<i>Candida parapsilosis</i> (++)	KS2/1 (10 ³)		
<i>Comamonas testosteroni</i> (++)	KS1/1 (10 ⁶)		
<i>Citrobacter braakii</i> (+++)	KS5/2 (>10 ³) KS6/2 (10 ⁴)		

<i>Citrobacter freundii</i> (++)	KS1/1,3,4 (10 ³) KS5/1,2,3,4 (10 ⁵) KS7/2,3,4 (10 ⁴) KS9/2,3,4 (10 ³ -10 ⁴)		
<i>Citrobacter gillenii</i> (+++)	KS3/4 (10 ⁴)		
<i>Clostridium baratii</i> (++)	KS7/2,3,4 (10 ⁴)		
<i>Clostridium bifermentans</i> (+)	KS7/1 (10 ⁴)	KS10/4 (10 ⁵)	KS10/4 (10 ⁶)
<i>Clostridium bolteae</i> (+++)	KS10/3 (10 ⁵)		
<i>Clostridium butyricum</i> (+++)	KS1/1,2 (10 ⁴) KS3/3 (10 ⁵)	KS4/4 (10 ³)	
<i>Clostridium celerecrescens</i> (+)	KS8 (>1*10 ³)		KS5/2,3,4 (10 ⁵)
<i>Clostridium clostridioforme</i> (++)			KS6/1,4 (10 ⁵ -10 ⁶)
<i>Clostridium cochlearium</i> (+++)	KS10/1 (10 ³)		
<i>Clostridium colicanis</i> (++)	KS5/1,2,4 (10 ⁵)	KS5/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴)	KS5/1,2,3,4(10 ⁴)
<i>Clostridium disporicum</i> (+)	KS2/2(10 ⁵)	KS3/3 (10 ⁴)	
<i>Clostridium paraputrificum</i> (++)	KS10/2 (10 ³)	KS2/3 (10 ³) KS3/3(10 ³) KS4/1(10 ³) KS5/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS7/1,2,3,4 (10 ⁴) KS10/1,2 (10 ³ -10 ⁴)	KS5/2,4 (10 ⁴) KS7/1,2,3,4 (10 ⁴) KS8/1,2,4(10 ³ -10 ⁴)
<i>Clostridium perfringens</i> (+++)	KS1/1,2,3,4 (10 ⁵) KS2/1,2,3,4 (10 ⁴) KS3/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS4/1,2,3,4 (10 ⁵) KS5/1,2,3,4 (10 ⁵) KS6/1,2,3,4(10 ⁶) KS7/1,2,3,4 (10 ⁴) KS8/1,2,3,4 (10 ⁴) KS9/1,2,3 (10 ³ -10 ⁴) KS10/1,2,3,4 (10 ⁴)	KS2/1,2,3,4 (10 ⁴) KS3/1,2,4 (10 ³) KS4/1,2,3,4 (10 ⁴) KS5/1,2,3 (10 ³) KS6/1,2,3,4(10 ⁴) KS7/1,2,3,4 (10 ³) KS8/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS10/1,4 (10 ³)	KS1/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS2/1,3,4(10 ⁴) KS4/1,3,4 (10 ⁴) KS5/1,2,3,4(10 ³ -10 ⁴) KS6/1,2,3,4(10 ⁴ -10 ⁵) KS7/1,2,3,4(10 ³) KS8/1,2,3,4 (10 ³) KS10/3 (10 ³)
<i>Clostridium sordellii</i> (+++)	KS9/2 (10 ⁵)	KS5/1 (10 ⁵) KS10/4 (10 ⁴)	KS6/3 (10 ⁴)
<i>Clostridium sporogenes</i> (++)	KS10/2 (10 ³)		
<i>Enterobacter cloacae</i> (++)	KS4/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵)		
<i>Enterobacter ludwigii</i> (+)	KS6/1,2,3,4 (10 ³)		

<i>Enterococcus aquimarinus</i> (+)	KS4/2 (10 ⁶)		
<i>Enterococcus avium</i> (++)	KS4/1,2,3,4 (10 ⁵)	KS4/3 (10 ⁵)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (++)	KS1/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS2/4 (10 ⁴) KS4/1,2,3,4(10 ⁴) KS6/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS7/3(10 ⁵) KS10/1,2,3,4(10 ³)	KS6/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS7/1,2,3 (10 ³)	
<i>Enterococcus faecium</i> (++)	KS1/1,2,3,4 (10 ⁴) KS3/4 (10 ³) KS4/2,3,4 (10 ⁵) KS5/1,2,3,4(10 ⁴) KS7/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS8/1,2,3,4 (10 ⁴) KS9/1,2,4 (10 ³) KS10/2,3,4 (10 ³)	KS2/1,3(10 ⁵) KS3/1,2,3 (10 ⁴ -10 ⁵) KS4/2,3,4 (10 ⁵ -10 ⁶) KS5/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS6/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS8/1,2,3,4 (10 ⁵ -10 ⁶) KS9/1,2,3,4 (10 ⁵ -10 ⁶) KS10/1,2,3,4(10 ⁵ -10 ⁶)	KS2/1(10 ³) KS3/4(10 ⁴) KS4/1,3 (10 ³) KS8/1,3,4 (10 ³) KS9/1,2,3,4(10 ⁴) KS10/1,2,3(10 ³)
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (+)	KS8 (10 ⁵ -10 ⁶)		
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i> (+)	KS1/1,4 (10 ³ -10 ⁴)		
<i>Enterococcus hirae</i> (+++)	KS2/1,2,4 (10 ³) KS3/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS4/1,2 (10 ⁴ -10 ⁵)		
<i>Enterococcus thailandicus</i> (+)	KS1 (10 ⁴) KS2/3 (10 ³) KS3/1,2,3,4 (10 ³) KS4/3 (10 ⁴) KS6/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴) KS7/1,2,3,4 (10 ⁴) KS8/1,2,3,4 (10 ⁴)	KS6/1,2,3,4 (10 ³ -10 ⁴)	
<i>E.coli</i> (+++)	KS1/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁵) KS2/1,2,4 (10 ³ -10 ⁴) KS3/1,2,3,4 (10 ³) KS4/1,2,3,4(10 ⁴) KS6/1,2,3,4 (10 ⁴ -10 ⁶) KS7/(10 ⁴ -10 ⁵)	KS3/3 (10 ⁴)	

<i>Klebsiella oxytoca</i> (++)	KS1/4 (10^3) KS4/1,2,3,4 (10^4) KS7/1,2,3,4 (10^4 - 10^5) KS10/1,2,3 (10^3)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (+++)	KS1/1,3 (10^4)		
<i>Lactobacillus amylovorus</i> (+)		KS2/1,2 (10^7) KS3/1,2,3,4 (10^6 - 10^7) KS4/2,3,4 (10^7) KS7/1,2,3,4 (10^6 - 10^7)	KS2/1,3,4 (10^6) KS7/2,3,4(10^4 - 10^5)
<i>Lactobacillus brevis</i> (++)		KS8/1,2,3,4 (10^5 - 10^6) KS9/2(10^5)	KS5/2,3 (10^5) KS8/1,2,3,4 (10^4 - 10^5)
<i>Lactobacillus casei</i> (+)		KS4/2,4 (10^3)	
<i>Lactobacillus crispatus</i> (+++)		KS6/1,2,3 (10^6)	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (+++)			KS1/4(10^3)
<i>Lactobacillus fermentum</i> (+)	KS4/1,3 (10^4) KS7/3 (10^4)	KS10/1,2,4 (10^5)	KS10/1,2,4(10^6 - 10^7)
<i>Lactobacillus gasseri</i> (++)	KS1/2,3,4 (10^3 - 10^4) KS7/1,2,3,4 (10^4 - 10^5) KS8/1,2,3 (10^3)	KS7/1,2,3,4(10^6 - 10^7)	KS1/3(10^4) KS3/1,3,4(10^5 - 10^6) KS4/1,3,4 (10^4) KS7/1,2,3,4(10^4 - 10^5) KS8/1(10^4)
<i>Lactobacillus kitasatonis</i> (++)		KS6/1,2,3,4 (10^6 - 10^7)	KS3/1,3,4(10^6 - 10^7) KS6/1,2,3,4 (10^3 - 10^4)
<i>Lactococcus lactis</i> (++)	KS9/1,2,3,4 (10^4)		
<i>Lactobacillus mucosae</i> (++)	KS3/1,2,3 (10^3)	KS2/2 (10^5) KS3/1,4(10^6) KS4/1,4 (10^6)	
<i>Lactobacillus oris</i> (++)		KS6/4 (10^7)	
<i>Lactobacillus paracasei</i> (+++)	KS2/1,2,3 (10^3 - 10^4) KS7/1,2,3,4 (10^4) KS8/3,4 (10^3) KS10/2,3 (10^3)	KS7/1,2,3,4 (10^5 - 10^6) KS9/3 (10^6)	KS6/1,3,4(10^3) KS8/1,2,3,4 (10^5 - 10^6) KS9/1,2,3 (10^4 - 10^5) KS10/1,2,3,4 (10^6)
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> i(+)			KS8/1 (10^5)

<i>Lactobacillus plantarum</i> (+++)	KS1/1,2,3,4 (10^3 - 10^4) KS2/1,2,3,4 (10^3) KS4/1,2,3,4 (10^3)		KS2/4 (10^5)
<i>Lactobacillus reuteri</i> (++)	KS2/1,2,3,4 (10^3) KS4/1,2,3,4(10^3) KS6/1,2,3,4(10^5)	KS2/3,4 (10^6 - 10^7) KS4/1,2,3 (10^5 - 10^7) KS6/1,2,3,4 (10^6) KS9/1,2,3,4(10^6 - 10^7)	KS9/1,2 (10^5)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (++)	KS1/1,2,4 (10^4)		KS4/3,4 (10^5 - 10^6) KS6/1,2,3,4 (10^3)
<i>Lactobacillus zeae</i> (+)			KS7/1,2,3,4 (10^3 - 10^4)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (++)	KS3/1,2 (10^3)		KS3/4(10^4) KS4/3(10^4)
<i>Micrococcus luteus</i> (++)			KS1/1,2 (10^4)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (++)	KS10/1,2,4 (10^5)		
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (+)		KS2/2 (10^5)	
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (++)		KS4/2 (10^4)	KS1/1,2,4 (10^3 - 10^4)
<i>Paenibacillus lactis</i> (++)	KS2/4 (10^3) KS4/1 (10^4)		KS4/1,4 (10^4)
<i>Paenibacillus lautus</i> (+)	KS2/2 (10^4)		
<i>Pandoraea sputorum</i> (+)	KSXX/1,2 (10^3)		
<i>Pediococcus acidilactici</i> (++)		KS2/1,2,3 (10^6 - 10^7) KS3/1,2,3,4 (10^5 - 10^6)	KS3/1,3,4 (10^5 - 10^6) KS8/3,4 (10^5) KS9/3,4(10^5 - 10^6)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (+++)	KS5/2 (10^3)	KS2/3,4 (10^7) KS3/3,4(10^5 - 10^7) KS4/1 (10^6) KS5/1,2,3,4(10^6) KS7/1 (10^5) KS8/1,2,3,4 (10^5 - 10^6) KS10/1,2,3,4 (10^4 - 10^6)	KS2/1,3,4(10^6) KS3/1(10^5) KS5/1,2,3,4 (10^4 - 10^5) KS8/2,4(10^4 - 10^5) KS10/1,2,3 (10^4 - 10^6)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (+)	KS9/1,2,4 (10^3)		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (++)	KS3/1,2 (10^4) KS4/1,2,3,4 (10^5) KS5/2 (10^4)		

<i>Pseudomonas corrugata</i> (+)	KS1/1,2,3,4 (10^4)		
<i>Pseudomonas monteilii</i> (+++)	KS5/2,3 (10^3)		
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> (++)	KS1/3 (10^3)		
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (+)	KS5/1,3,4 (10^4) KS8 (10^4)		
<i>Pseudomonas veronii</i> (++)	KS6/1,2,3,4 (10^4 - 10^5)		
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (++)	KS3/1,3,4 (10^4) KS10/2 (10^4)		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (++)	KS4/4 (10^3)		
<i>Serratia fonticola</i> (++)	KS6/2,3 (10^4 - 10^5) KS9/2,3,4 (10^3)		
<i>Serratia liquefaciens</i> (+)	KS4/2,4(10^5) KS5/1(10^3) KS7/1 (10^4) KS8/1,2,3,4 (10^3 - 10^4)		
<i>Serratia marcescens</i> (+++)	KS1/1,2,4 (10^3)		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	KS7/1,3 (10^6)		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (++)		KS6/2 (10^7)	
<i>Staphylococcus hominis</i> (++)	KS1/2,3 (10^5 - 10^6) KS2/1 (10^5) KS4/1(10^6)		
<i>Yersinia enterocolitica</i> (++)	KS7/1,2,3,4 (10^5)		

Bewertung der einzelnen Spezies aus Matrix K

Tabelle 20: Liste der Gram-negativen Mikroorganismen aus Matrix K, deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. grün: positiver Effekt blau: neutraler Effekt rot: negativer Effekt

Spezies	Bewertung	Bedeutung	während/nach Fermentation
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Potentieller Infektionserreger (85)	Zuweilen klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Escherichia coli</i>	Darmflora, Krankheitserreger (Details siehe 2.2.1.1.5) (375),	Hohe klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Pantoea agglomerans</i>	Human- und pflanzenpathogener Erreger (109)	Klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Providencia rettgeri</i>	Human- und insektenpathogener Erreger (241, 502).	Klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pflanzenassoziiierter Umwelt-MO(224), vgl. pathogene Gattungsvertreter (348)	Unbekannt, apathogen, ggf. als Modellorganismus tauglich	Inaktivierung

Tabelle 21: Liste der Gram-positiven sporenbildenden Mikroorganismen aus Matrix K, deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.

Spezies	Bewertung	Bedeutung	während/nach Fermentation
<i>B. licheniformis</i>	Umwelt-MO , sehr selten Lebensmittelverderber (149, 453), vgl. pathogene Gattungsvertreter (204, 216)	I. d. R. keine klinische Relevanz (477) , ggf. als Modellorganismus tauglich	Überdauerung in Spore
<i>B. pumilus</i>	Boden-MO, fördert Pflanzenwachstum	Antagonisiert: Phytopathogene (306)	Überdauerung in Spore
<i>Brevibacillus agri</i>	Als pathogen diskutiert (296, 399), Umwelt-MO (279, 332, 422)	Unklare medizinische Relevanz, evtl. wirtschaftl. Relevanz (270)	Überdauerung in Spore

Tabelle 22: Liste der Gram-positiven Mikroorganismen aus Matrix K, deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.

Spezies	Bewertung	Bedeutung	während/nach Fermentation
<i>Aerococcus viridans</i>	Potentieller Infektionserreger (14)	Zuweilen klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Probiotika (11, 317)	Wirtschaftliche Relevanz	Inaktivierung
<i>Corynebacterium casei</i>	Käseproduktion (323), vgl. pathogene Gattungsvertreter (189)	Wirtschaftliche Relevanz, apathogen, ggf. als Modellorganismus tauglich	Inaktivierung
<i>Enterococcus faecium</i>	Kommensalfloora und Krankheitserreger (473), weniger virulent als <i>E. faecalis</i> (236, 475), Bakteriozid- und Breitbandbakteriozimbildner (94, 281)	Hohe klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Enterococcus hirae</i>	Sehr seltener Durchfall- und Septikämieerreger (144, 176), meist Kommensalfloora bei Vögeln (122, 151)	Mitunter klinisch Relevanz	Inaktivierung
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Futtermittelherstellung (129, 378), Bakteriozimbildner gegen Gram-positive u.a. Enterokokken (501), jedoch nicht gegen Pediokokken	Wirtschaftliche Relevanz FermentationsMO	Starke Dynamik
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	Lebensmittelherstellung, aber auch Kontaminant bei Bierherstellung (321)	Wirtschaftlicher Relevanz FermentationsMO	Starke Dynamik
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Breitbandbakteriozimbildner (300) als (a)virulent diskutiert ((202)) (84, 310, 402)	Keine klinische Relevanz FermentationsMO	Starke Dynamik
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lebensmittelproduktion (168, 481), Breitbandbakteriozimbildner (247, 460, 472), Therapeutikum (339)	Keine klinische Relevanz wirtschaftliche Relevanz	Inaktivierung
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Probiotikum (18, 201), Bakteriozimbildner (105)	Keine klinische Relevanz wirtschaftliche Relevanz	Inaktivierung
<i>Pediococcus acidilactici</i>	U. A. in Lebensmittelproduktion eingesetzt, Bakteriozimbildner(50, 95, 380), virulentes Potential bei Immunsupprimierten diskutiert (188, 310, 400)	Keine klinische Relevanz FermentationsMO	Starke Interaktion mit <i>L. plantarum</i> möglich
<i>Staphylococcus fleurettii</i>	Milchassoziierter MO (479), vgl. pathogene Gattungsvertreter (262)	Unbekannt, apathogen, ggf. als Modellorganismus	Inaktivierung
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Apathogen, nahe verwandt mit Zoonoseerreger <i>S. bovis</i> (364, 390), vgl. pathogene Gattungsvertreter(396)	Unbekannt, apathogen, ggf. als Modellorganismus tauglich	Inaktivierung

Bewertung der einzelnen Spezies aus Matrix S

Tabelle 23: Liste der Gram-negativen Mikroorganismen aus Matrix S, deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.

Spezies	Bewertung	Bedeutung	während/nach Fermentation
<i>Acinetobacter</i> spp.	Nosokomialer Infektionserreger (249)	Zunehmende klinische Relevanz (384)	Inaktivierung
<i>Acinetobacter junii</i> (47)	Potentieller Infektionserreger	Zuweilen klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Acinetobacter parvus</i> (337)	Vereinzelt Zytotoxinbildner (82)	Geringe klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Aeromonas caviae</i>	Fischpathogen (148, 418)	Verursacht schwere ökonomische Schäden	Inaktivierung
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Humanpathogen (376)	Klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Citrobacter braakii</i>	Tendenziell virulent (74), Schadstoffabbauend (123)	Pot. wirtschaftliche und evtl. klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Citrobacter freundii</i>	Meningitisreger (34)	Hohe klinische Relevanz bei Neugeborenen	Inaktivierung
<i>Citrobacter gillenii</i>	Klinische Isolate	Unklare klinische Relevanz (75)	Inaktivierung
<i>Citrobacter testosteroni</i>	Kommensalflora	Zuweilen klinische Relevanz (13)	Inaktivierung
<i>Enterobacter cloacae</i>	Nosokomialer Erreger (207, 469).	Klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Enterobacter ludwigii</i>	Nosokomialer Erreger (226)	Klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Escherichia coli</i>	Darmflora, Krankheitserreger (Details siehe S. 9)	Hohe klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Seltener Darmflora, (nosokomialer) Erreger (42, 223, 227, 280, 503)	Steigende klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Krankheitserreger (223)	Hohe klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Krankheitserreger (25, 93, 229)	Klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Pandoraea spurius</i>	Krankheitserreger (98, 154) insb. für Mukoviszidose Patienten (164)	Klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Boden-MO (20, 439) klinische Fallbeispiel (470)	Potenzielle klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Apathogener MO (196), schützt gegen phytopathogene Pilze (461)	Keine klinische Relevanz, pot. wirtschaftliche Relevanz	Inaktiviert
<i>Pseudomonas corrugata</i>	Phytopathogen (89, 403)	Pot. wirtschaftliche Relevanz	Inaktiviert
<i>Pseudomonas monteilii</i>	Bodenbakterium Symbiont Mykorrhizen (130), evtl. pathogen (139)	Pot. wirtschaftliche Relevanz	Inaktiviert

		Pot. wirtschaftliche Relevanz	Inaktiviert
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	Umwelt-MO (240), für Dekontamination nutzbar (505)		Inaktiviert
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Umwelt-MO (349, 394) mit geringem nosokomialelem Potential (186, 257, 341) pot. Modellorganismus für <i>Burkholderia</i> (500)	Klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Pseudomonas veronii</i>	Lebensmittelkontaminant (140), Xenobiotika abbauend in KS (19, 333)	Keine klinische Relevanz, wirtschaftliche Relevanz	Inaktiviert
<i>Serratia fonticola</i>	Pyogener Erreger (65, 359), Umwelt- Darmbakterium (232)	Klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Serratia liquefaciens</i>	Umwelt-MO, wirbeltierassoziiert (193) und Rhizobakterium (252), psychrophiler Kontaminant (70, 112, 194, 395)	Geringe klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Serratia marcescens</i>	Nosokomialer Erreger (193, 215), Kontaminant (307, 447), Verursacher von Blutwunden (266, 504)	Klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Psychrophile Durchfallerreger(108), jedoch zahlreiche apathogene Biovare (108)	Klinische Relevanz (gefundene Biovare, apathogene Gruppe 1A (69))	Inaktiviert

Tabelle 24: Liste der Gram-positiven Mikroorganismen aus Matrix S, deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.

Spezies	Bewertung	Bedeutung	während/nach Fermentation
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Darmbakterium, produziert Bakteriozide (52), Therapeutikum (397)	Keine klimische Relevanz	Inaktivierung
<i>Bifidobacterium theophilum</i>	Darmbakterium, Therapeutikum (52)	Keine klimische Relevanz Fermentations-MO	Starke Dynamik
<i>Candida glabrata</i>	Kommensalfloora, zunehmend pathogen bewertet (156)	Klinische Relevanz bei Immunsupprimierten (489)	Inaktivierung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Braueri- oder auch Bäckerhefe (368)	Wirtschaftliche Relevanz, klimische Relevanz umstritten (143, 316, 327, 433)	Inaktivierung
<i>Enterococcus avium</i>	Darmbakterium (100), selten Bakteriämieerreger (356, 392)	Klimische Relevanz	Inaktivierung
<i>Enterococcus aquimarinus</i>	Maritimer MO (446), Lebensmittelherstellung (91)	Wirtschaftliche Relevanz, keine klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>E. casseliflavus</i>	Lebensmittelherstellung (88), Krankheitserreger bei Immunsupprimierten (382)	Wirtschaftliche Relevanz, geringe klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kommensalfloora und Krankheitserreger, Zytolysinbildner (236, 245)	Hohe klimische Relevanz	Inaktivierung
<i>Enterococcus faecium</i>	Kommensalfloora und Krankheitserreger, weniger virulent als <i>E. faecalis</i> (236, 475) Bakteriozid- und Breitbandbakteriozidinbildner (94, 281)	Hohe klimische Relevanz, vmtl. Pionierflora f. Fermentations-MO	Starke Dynamik, starke Reduktion –
<i>E. haemeperoxidus</i>	Wasser-MO	Keine klimische Relevanz	Inaktivierung
<i>Enterococcus hirae</i>	Sehr seltener Durchfall- und Septikämieerreger (144, 176) meist Kommensalfloora bei Vögeln (122, 151)	Mitunter klinisch relevant	Inaktivierung
<i>Enterococcus thailandicus</i>	Lebensmittelherstellung (451)	Keine klimische Relevanz	Inaktivierung
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Stärkeabbauend, heterofermentativ, Sauerteig-MO (331), Bakterizid- und Bakteriozidinbildner (287),	Keine klimische Relevanz keine klinische Relevanz, wirtschaftliche Fermentations-MO	Dynamik, Interaktionen mit <i>L. reuteri</i> möglich. (254)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Heterofermentativ (295), Bakterizid- und Breitbandbakteriozidinbildner (44, 483), Lebensmittelproduktion (345), Therapeutikum (114)	Keine klimische Relevanz, wirtschaftliche Fermentations-MO	Dynamik
<i>Lactobacillus casei</i>	Avirulent (202), Therapeutikum (177), häufiger Einsatz in „functional food“	Keine klimische Relevanz, hohe wirtschaftliche Relevanz (195), pot. Fermentations-MO	Dynamik
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Breitbandbakteriozidinbildner (259, 449)	Keine klimische Relevanz, wirtschaftliche Fermentations-MO	Dynamik Interaktionen mit <i>L. amylovorus</i> und <i>Pediococcus</i> sp. möglich (230, 449)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Schmalbandbakteriozidinbildner (68, 459), Lebensmittelproduktion(115), als (a)virulent diskutiert ((202)) (211)	Keine klimische Relevanz,	Dynamik

		wirtschaftliche Relevanz	starke Dynamik
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Breitbandbakteriozinbildner (353), Lebensmittelproduktion (115), als (a)virulent diskutiert ((202)) (211)	Keine klinische Relevanz Fermentations-MO	starke Dynamik
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Bakteriozinbildner, antagonisiert pathogene MO, Probiotikum (202, 239, 255, 398, 450) Sporozid (30)	Keine klinische wirtschaftliche Relevanz, pot. Fermentations-MO	Dynamik, Interaktionen mit <i>L. amylovorus</i> und <i>P. pentosaceus</i> möglich (508). starke Dynamik
<i>Lactobacillus kitatonis</i>	Breitbandbakteriozinbildner (87)	Keine klinische wirtschaftliche Relevanz Fermentations-MO	starke Dynamik
<i>Lactococcus lactis</i>	Breitbandbakteriozinbildner, sporozid (116, 312), Lebensmittelproduktion (66)	Keine klinische wirtschaftliche Relevanz	Inaktivierung
<i>Lactobacillus mucosae</i>	Erschriebener mukosahäsiver <i>Lactobacillus</i> , verdrängt pathogene MO, potentieller Breitbandbakteriozinbildner (147, 284, 391)	Keine klinische Relevanz Fermentations-MO	starke Dynamik
<i>Lactobacillus oris</i>	Heterofermentativer Bakteriozinbildner (17, 152, 267, 268)	Keine klinische Relevanz, pot. Fermentations-MO	Dynamik, Interaktionen mit <i>L. crispatus</i> möglich Dynamik
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Heterofermentativ(150), Lebensmittelproduktion (107)	Keine klinische Relevanz (150), wirtschaftliche Relevanz, Klimaxpopulation	Dynamik
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Breitbandbakteriozinbildner (300) als (a)virulent diskutiert ((202)) (84, 310, 402)	Keine klinische Relevanz Fermentations-MO	starke Dynamik
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lebensmittelproduktion (481), Breitbandbakteriozinbildner (247, 460, 472), Therapeutikum (339)	Keine klinische Relevanz	Inaktivierung
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Breitbandbakteriozinbildner (32, 170)	Keine klinische Relevanz Fermentations-MO	starke Dynamik, Interaktion mit <i>L. amylovorans</i> möglich
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Positive Beeinflussung Immunsystem (71), jedoch häufig als (a)virulent diskutiert ((202)) (84, 211, 212, 354), therapeutischer Einsatz (358) Breitbandbakteriozinbildner (354)	Vermutlich keine klinische Relevanz, pot. Fermentations-MO	starke Dynamik
<i>Lactobacillus zeae</i>	Lebensmittelproduktion (499)	Keine klinische Relevanz, pot. Klimaxpopulation	Dynamik
<i>Micrococcus luteus</i>	Pot. nosokomialer Erreger (357)	Zunehmende klinische mutmaßlich Kontamination	Inaktiviert
<i>Pediococcus acidilactici</i>	U. A. in Lebensmittelproduktion eingesetzt, Bakteriozinbildner(50, 95), virulentes Potential bei Immunsupprimierten diskutiert (188, 400)	Keine klinische Relevanz, Fermentations-MO	Starke Dynamik, Interaktion mit <i>L. plantarum</i> möglich
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Bakteriozin- Sporozidbildner (347, 361), virulentes Potential bei Immunsupprimierten diskutiert (38, 104)	Keine klinische Relevanz, Fermentations-MO	Starke Dynamik, Interaktion mit <i>L. reuteri</i> , <i>L. amylovorans</i> möglich
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hautbesiedler, pyogener Erreger (299, 484)	Klinische Relevanz	Inaktiviert
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Hautbesiedler, nosokomialer Erreger (167, 275, 410, 424)	Klinische Relevanz, hier Kontamination	Inaktiviert

<i>Staphylococcus hominis</i>	Hautbesiedler (264), pathogene Unterarten (263)	Inaktiviert
-------------------------------	---	-------------

Tabelle 25: Liste der Gram-positiven sporenbildenden Mikroorganismen aus Matrix S, deren Relevanz sowie Status während oder nach der Fermentation. Grün: positiver Effekt, blau: neutraler Effekt, rot: negativer Effekt.

Spezies	Bewertung	Bedeutung	während/nach Fermentation
<i>Bacillus arsenicus</i>	Umwelt-MO(425).	Keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus cereus</i>	Lebensmittelverderber,(149) Modellorganismus für <i>B. anthracis</i> (216)	Klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus flexus</i>	Kommensalfloora(39)	Keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>B. licheniformis</i>	Umwelt-MO , sehr selten Lebensmittelverderber (453)	I. d. R. keine klinische Relevanz (477)	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus megaterium</i>	Umwelt-MO, sehr selten Lebensmittelverderber (453)	I. d. R. keine klinische Relevanz (428, 476)	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus muralis</i>	Umwelt-MO (221),	Keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus mycoides</i>	Apathogener Blattbesiedler, jedoch aus <i>B. cereus</i> – Gruppe (235)	Antagonisiert Phytopathogene (37)	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus pseudomycoides</i>	Umwelt-MO, <i>B. cereus</i> – Gruppe (235)	Keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>B. pumilus</i>	Boden-MO, fördert Pflanzenwachstum	Antagonisiert Phytopathogene (306)	Überdauerung in Spore
<i>B. simplex</i>	Boden-MO, sehr selten Lebensmittelverderber (453)	I. d. R. keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>B. subtilis</i>	antimykotisch wirksam (277)	Landwirtschaftlich genutzt (374)	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Fungizid und Insektizid (415)	Landwirtschaftlich genutzt	Überdauerung in Spore
<i>Bacillus weihenstephensis</i>	<i>B. cereus</i> -Gruppe, Toxinbildner, pot. Lebensmittelverderber (282, 373, 442)	I. d. R. keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Clostridium baratii</i>	<i>Pot. Botulismus - Erreger</i> (36, 213, 324)	Klinische Relevanz	Inaktivierung (jedoch fraglich bei Sporenbildner)
<i>Clostridium bifementans</i>	Virulenz umstritten (225, 340)	Pot. klinische Relevanz	Dynamisch
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Pot. Botulismus – Erreger</i> (31, 324)	Mitunter klinische Relevanz	Inaktivierung (jedoch fraglich bei Sporenbildner)
<i>Clostridium bolteae</i>	Als Autismusauslöser diskutiert (158, 159, 435)	Pot. klinische Relevanz	Inaktivierung (jedoch fraglich bei Sporenbildner)
<i>Clostridium celerecrescens</i>	Zellulose abbauend (350), extrem selten klinische Fälle (183)	Keine klinische Relevanz	Dynamisch

<i>Clostridium clostridioforme</i>	Vormals als apathogen beschrieben (225), als Autismusauslöser diskutiert (158, 159, 435) Umwelt-MO, hohe Quecksilbertoleranz	Pot. klimische Relevanz	Starke Dynamik
<i>Clostridium cochlearium</i>		Biochemische Relevanz, keine klinische Relevanz (351, 383)	Leichte Reduktion
<i>Clostridium colicanis</i>	Karnivorendarmflora (191), atypischer Bakteriämieerreger(426)	Pot. klimische Relevanz (88)	Leichte Reduktion
<i>Clostridium disporicum</i>	Umwelt-MO (233) sehr selten infektiös (362)	Pot. klimische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Clostridium paraputrificum</i>	Umwelt-MO, Chitinasenproduzent (145)	I. d. R. keine klinische Relevanz	Leichte Reduktion
<i>Clostridium perfringens</i>	übliche Darmflora, fakultativer Krankheitserreger (siehe S. 9)	Hohe klimische Relevanz	Leichte Reduktion
<i>Clostridium sordellii</i>	Vaginalflora (319), fakultativer Krankheitserreger (23)	Hohe klimische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Clostridium sporogenes</i>	Boden-MO, selten pathogen (238, 302)	Selten klimisch relevant	Überdauerung in Spore
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Boden-MO (371), Fungizidbildner (198), Biofilminhibitor (365), pot. Resistenzreservoir (16)	Pot. tenazitätsesskend (200)	Überdauerung in Spore
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Umwelt-MO	Keine klimischen Fälle beschrieben	Pot. Überdauerung in Spore
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Boden-MO (24), pot. Krankheitserreger für Insekten(370), sehr selten humanpathogen (155)	I. d. R. keine klinische Relevanz	Überdauerung in Spore
<i>Paenibacillus lactis</i>	Lebensmittelverderber(408)	Keine klimischen Fälle beschrieben	Überdauerung in Spore
<i>Paenibacillus lautus</i>	Boden- und Darm-MO (220)	Keine klimischen Fälle beschrieben	Pot. Überdauerung in Spore

8.6.3. Qualitative Daten Matrizes S_{Pool} ; $S_{Pool-Wk}$; $S_{Pool-Wk+Sp}$

Legende:

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

Tabelle 26: Mikroflorenveränderung der Matrizes S_{Pool} , $S_{Pool-Wk}$ und $S_{Pool-Wk+Sp}$ zu unterschiedlichen Fermentationszeitpunkten

	Vor der Fermentation	Nach 3 Tagen Fermentation	Nach 7 Tagen Fermentation
Bakterienart	Gefunden in	Gefunden in	Gefunden in
<i>Acinetobacter bouvetii</i> (++)	$S_{Pool-Wk+Sp} / 3$		
<i>Acinetobactergerneri</i> (+)	$S_{Pool-Wk} / 1$		
<i>Acinetobacter guillouiae</i> (+)	$S_{Pool} / 1$		
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (+++)	$S_{Pool-Wk} / 1,4$ $S_{Pool-Wk+Sp} / 3,4$ $S_{Pool} / 3$		
<i>Acinetobacter sp.</i> (+)	$S_{Pool-Wk+Sp} / 1,2,4$ $S_{Pool} / 2$		
<i>Acinetobacter tandoii</i> (+)	$S_{Pool-Wk} / 2,3$		
<i>Bacillus amyloquefaciens</i> (+)	$S_{Pool-Wk} / 1,2$ $S_{Pool} / 3,4$		
<i>Bacillus arsenicus</i> (+)			$S_{Pool-Wk+Sp} / 3$ $S_{Pool} / 1,2,3$
<i>Bacillus cereus</i> (+++)	$S_{Pool-Wk} / 1,2,3,4$ $S_{Pool-Wk+Sp} / 4$ $S_{Pool} / 1,2,3,4$	$S_{Pool-Wk} / 1,2,3,4$ $S_{Pool-Wk+Sp} / 1,2,3,4$ $S_{Pool} / 1,2,3,4$	$S_{Pool-Wk} / 1,2,4$ $S_{Pool-Wk+Sp} / 1,3$ $S_{Pool} / 1,3$
<i>Bacillus flexus</i> (++)	$S_{Pool-Wk} / 2$	$S_{Pool-Wk} / 2$	
<i>Bacillus galactosidilyticus</i> (++)			$S_{Pool} / 1,3$
<i>Bacillus idriensis</i> (+++)	$S_{Pool-Wk} / 1$	$S_{Pool} / 1,2,3,4$	$S_{Pool} / 2$

	S _{Pool} /1,4		
<i>Bacillus mycoides</i> (++)	S _{Pool} -Wk /2,3 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /3		S _{Pool} -Wk+Sp /3 S _{Pool} /2
<i>Bacillus pseudomycooides</i> (+)			S _{Pool} -Wk+Sp /4
<i>Bacillus pumilus</i> (+)			S _{Pool} -Wk+Sp /3
<i>Bacillus sp.</i> (+)	S _{Pool} -Wk+Sp /4		
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	S _{Pool} -Wk /2,3 S _{Pool} /1	S _{Pool} /4	S _{Pool} -Wk /1
<i>Bacillus thermoamylovorans</i> (++)		S _{Pool} -Wk /1,3,4	S _{Pool} -Wk /3 S _{Pool} -Wk+Sp /4
<i>Bacillus thuringiensis</i> (+)	S _{Pool} -Wk /1 S _{Pool} /4		S _{Pool} -Wk /1,2,4 S _{Pool} -Wk+Sp /3 S _{Pool} /1
<i>Bacteroides ovatus</i> (+++)			S _{Pool} -Wk /3 S _{Pool} /2
<i>Bifidobacterium longum</i> (++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,4 S _{Pool} /1,2,4		
<i>Candida lusitanae</i> (+)	S _{Pool} -Wk+Sp /4		
<i>Citrobacter freundii</i> (+++)	S _{Pool} -Wk /3		
<i>Clostridium baratii</i> (++)	S _{Pool} -Wk /3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /4 S _{Pool} /1,2		S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3 S _{Pool} /1,3
<i>Clostridium bifermentans</i> (++)	S _{Pool} -Wk /2,4 S _{Pool} -Wk+Sp /2,3 S _{Pool} /4	S _{Pool} -Wk /1,2,3	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,3,4 S _{Pool} /1,2,3
<i>Clostridium glycolicum</i> (+)			S _{Pool} -Wk /1,2
<i>Clostridium innocuum</i> (++)			S _{Pool} /1
<i>Clostridium paraputrificum</i> (++)		S _{Pool} /1,3,4	S _{Pool} /1
<i>Clostridium perfringens</i> (+++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,2,3

<i>Clostridium sordellii</i> (++)	S _{Pool} -Wk /2,3 S _{Pool} -Wk+Sp /1 S _{Pool} /3,4	S _{Pool} -Wk /4	S _{Pool} -Wk+Sp /1 S _{Pool} /1
<i>Clostridium tertium</i> (++++)	S _{Pool} -Wk /3 S _{Pool} -Wk+Sp /1	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,4 S _{Pool} /2
<i>Clostridium tetani</i> (++++)	S _{Pool} -Wk+Sp /3		
<i>Eggerthella lenta</i> (++)		S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4	
<i>Enterobacter cloacae</i> (+)	S _{Pool} /1		
<i>Enterococcus avium</i> (++++)		S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk+Sp /1,4
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (++)		S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk+Sp /2
<i>Enterococcus faecalis</i> (++++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk+Sp /3
<i>Enterococcus faecium</i> (++++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 WK/1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 WK/1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 WK/1
<i>Enterococcus gallinarum</i> (++++)	S _{Pool} -Wk /4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,3	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4
<i>Enterococcus malodoratus</i> (++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /2,3,4 S _{Pool} /1,2		
<i>Enterococcus pseudoavium</i> (+)	S _{Pool} -Wk /2		
<i>Escherichia coli</i> (++++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4
<i>Eubacterium limosum</i> (++)			S _{Pool} -Wk /1,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,4 S _{Pool} /1,2
<i>Eubacterium sp.</i> (+)	S _{Pool} -Wk /3		

<i>Klebsiella oxytoca</i> (++)	S _{Pool} -Wk /4 S _{Pool} /3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (+++)			S _{Pool} -Wk+Sp /2,4
<i>Lactobacillus amylovorus</i> (+)		S _{Pool} /1,2,3,4	
<i>Lactobacillus crispatus</i> (+++)			S _{Pool} /1,2,3
<i>Lactobacillus gasseri</i> (+++)	S _{Pool} -Wk+Sp /1	S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} /1,2,3
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (+++)		S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} /1,2,3
<i>Lactobacillus kitasatonis</i> (++)			S _{Pool} /1,2,3
<i>Lactobacillus mucosae</i> (++)	S _{Pool} -Wk /3 S _{Pool} -Wk+Sp /2,3 S _{Pool} /2,3,4	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /2,3,4 S _{Pool} /3,4	S _{Pool} -Wk /1,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3 S _{Pool} /1,2
<i>Lactobacillus paracasei</i> (++)	S _{Pool} -Wk /1,2 S _{Pool} -Wk+Sp /1 S _{Pool} /1,2		
<i>Lactobacillus reuteri</i> (+)		S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} /1,2,3
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (+)		S _{Pool} -Wk+Sp /3,4	
<i>Lactobacillus sp.</i> (+)	S _{Pool} -Wk /4 S _{Pool} -Wk+Sp /4	S _{Pool} -Wk+Sp /1	
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (++)	S _{Pool} -Wk+Sp /1 S _{Pool} /2		
<i>Microbacterium maritypicum</i> (+)	S _{Pool} -Wk+Sp /1,3		
<i>Microbacterium sp.</i> (+)		S _{Pool} -Wk /2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,3,4	
<i>Moraxella osloensis</i> (+)			S _{Pool} -Wk /3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1
<i>Morganella morganii</i> (+)	S _{Pool} /3		
<i>Pediococcus acidilactici</i> (+)	S _{Pool} -Wk /3 S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1	S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} /1,2,3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	S _{Pool} -Wk /2,4	S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3	

(+++)	S _{Pool} -Wk+Sp /1,2,3,4 S _{Pool} /1,2,3,4	S _{Pool} /1,2,3,4	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (++)	S _{Pool} -Wk /1		
<i>Pseudomonas oleovorans</i> (++)	S _{Pool} -Wk /1,2,3,4 S _{Pool} -Wk+Sp /1 S _{Pool} /3		
<i>Pseudomonas sp.</i> (+)	S _{Pool} -Wk+Sp /2,3 S _{Pool} /1,2,4		
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (+++)	S _{Pool} -Wk /1,3 S _{Pool} -Wk+Sp /2 S _{Pool} /2,3,4		
<i>Serratia marcescens</i> (++)	S _{Pool} -Wk+Sp /1 S _{Pool} /2		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (++)			S _{Pool} -Wk /2,4 S _{Pool} -Wk+Sp /2
<i>Staphylococcus hominis</i> (+)	S _{Pool} -Wk+Sp /4	S _{Pool} -Wk /4 S _{Pool} -Wk+Sp /1	
<i>Streptococcus lutetiensis</i> (++)	S _{Pool} -Wk 1 S _{Pool} /1		

TGGE-Dendrogramme



Abbildung 50: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 1



Abbildung 51: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 2



Abbildung 52: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 3



Abbildung 53: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 4

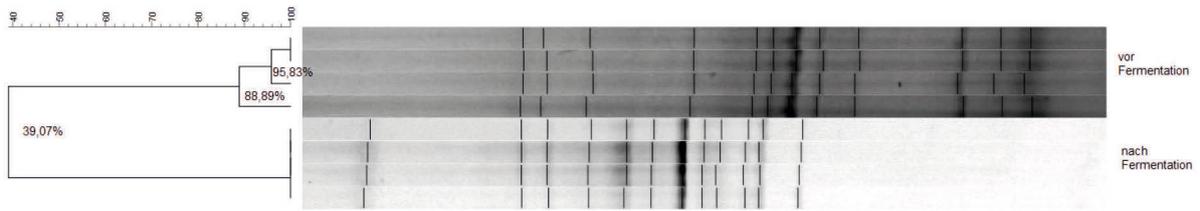


Abbildung 54: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 5

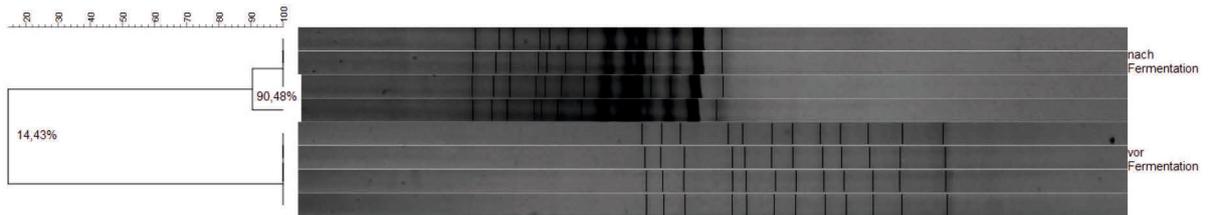


Abbildung 55: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 6



Abbildung 56: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 7



Abbildung 57: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 8



Abbildung 58: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 9



Abbildung 59: TGGE-Bandenmuster, vor und nach Fermentation von Matrix S auf Basis von Klärschlamm 10

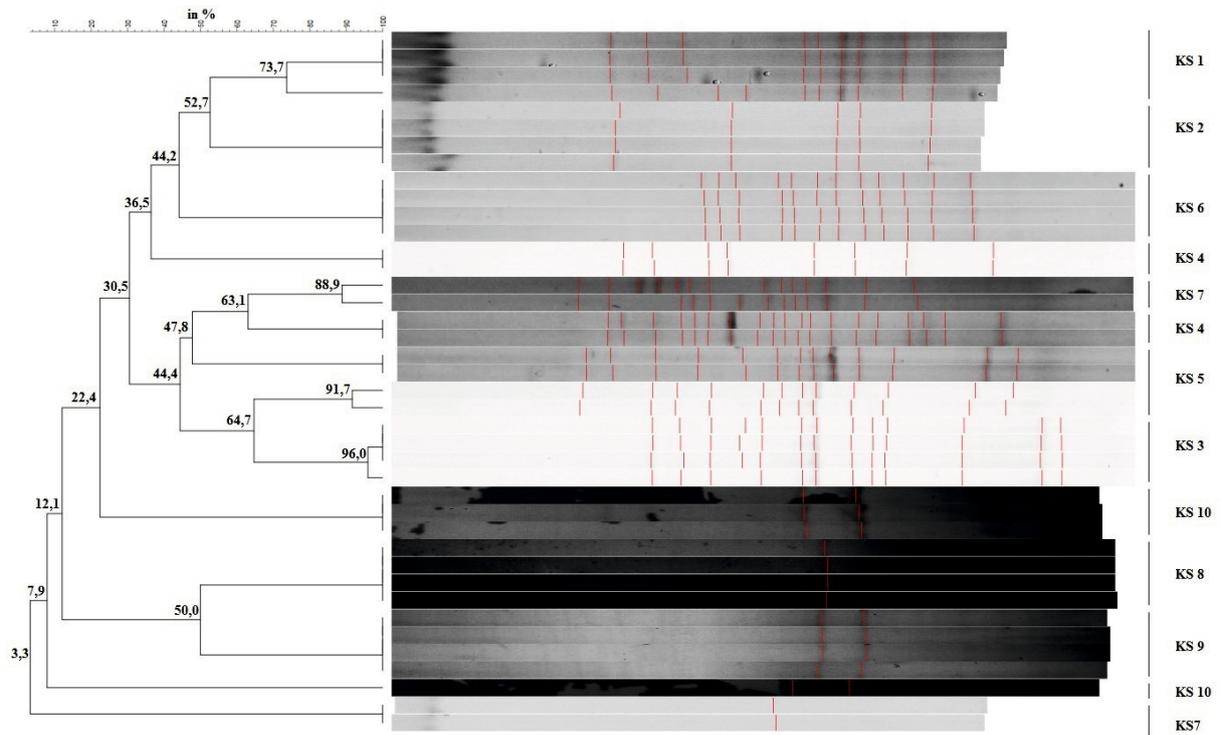


Abbildung 60: TGGE-Bandenmuster aller Klärschlammmatrizes (S) vor der Fermentation

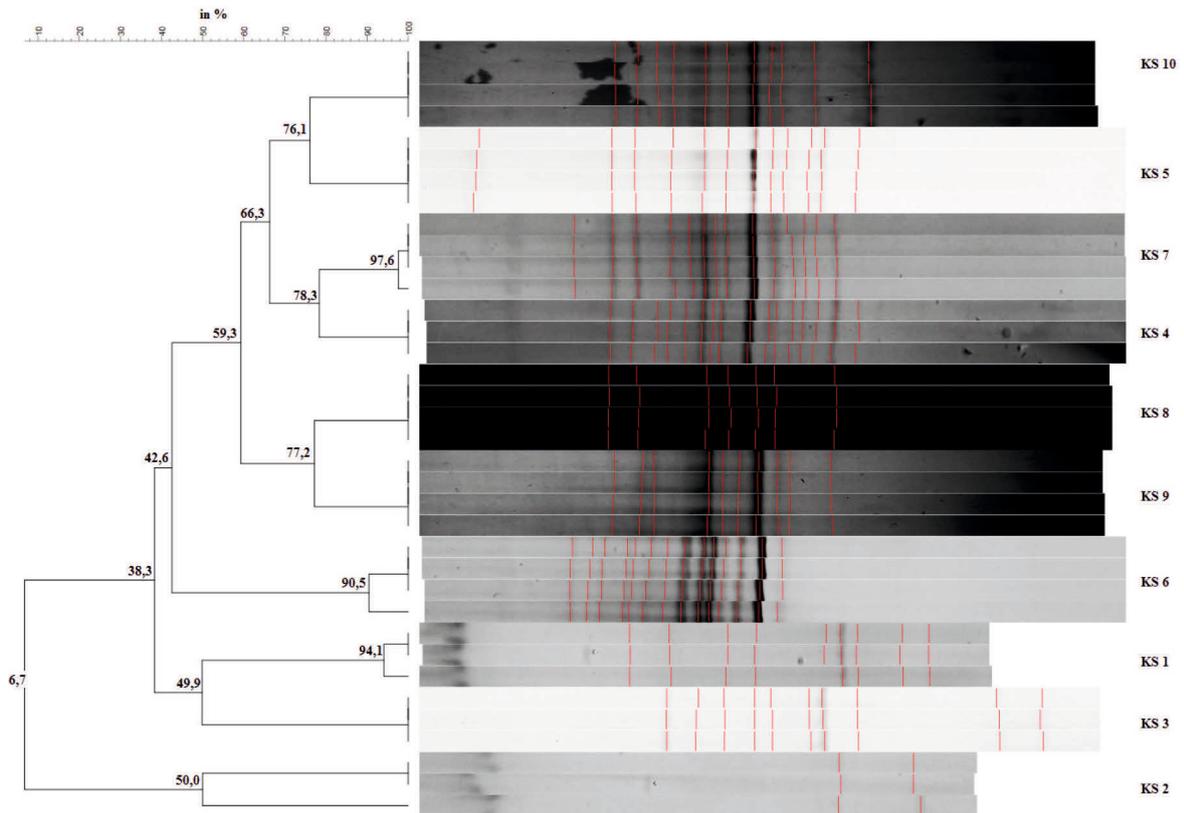


Abbildung 61: TGGE-Bandenmuster aller Klärschlammproben (S) nach der Fermentation

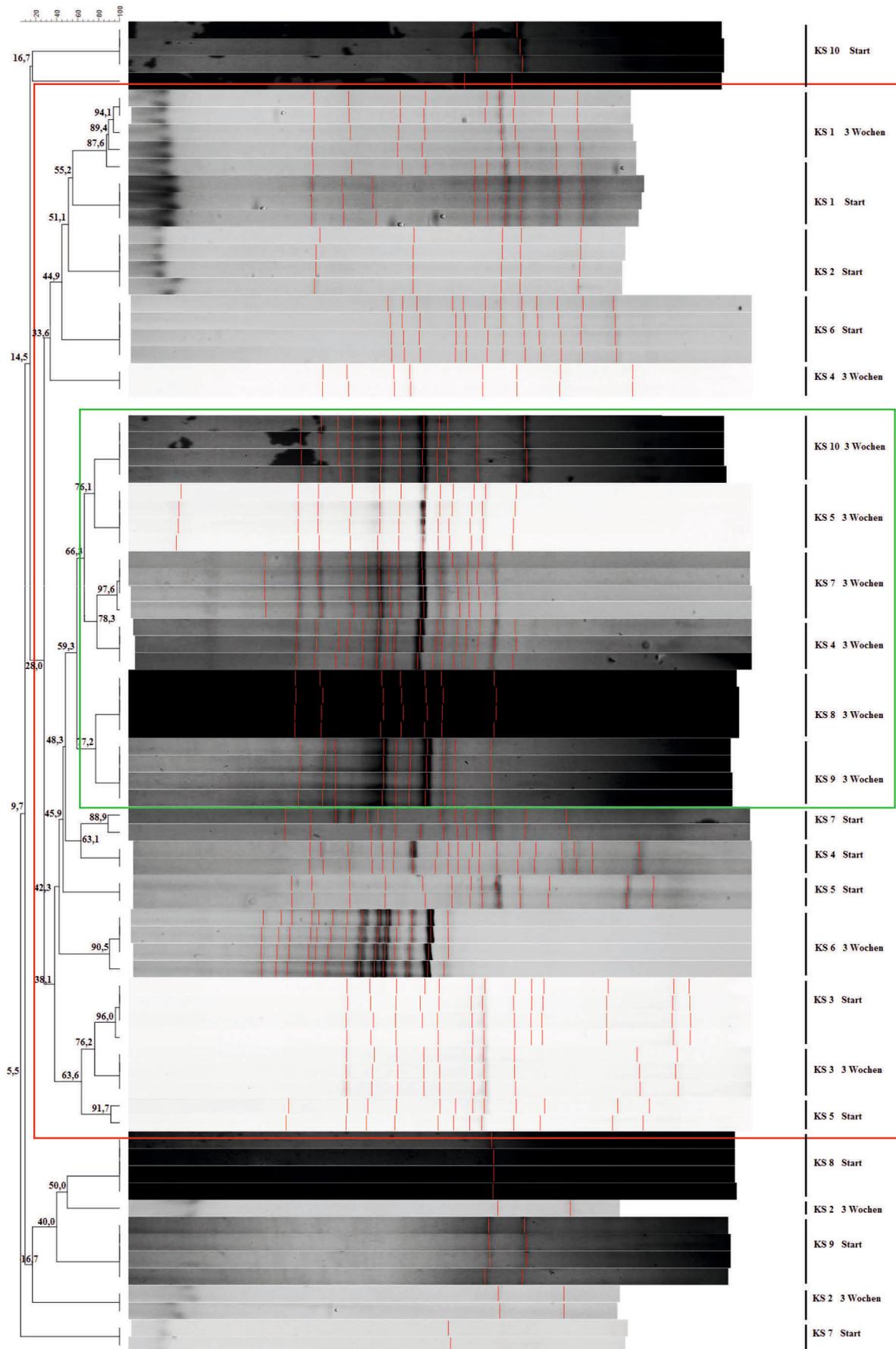


Abbildung 62: TGGE-Bandenmuster aller Klärschlammproben (S) zu beiden Zeitpunkten

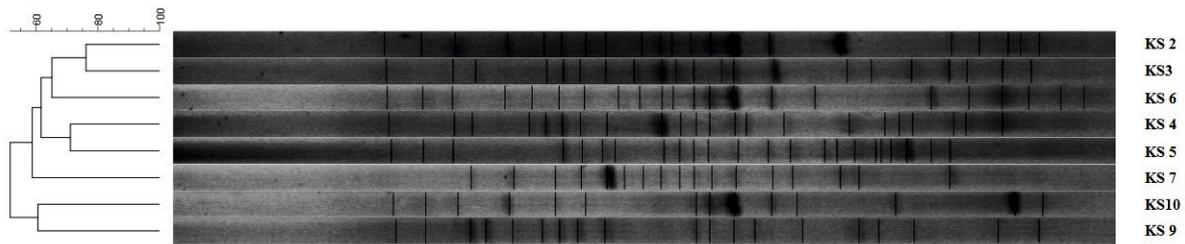


Abbildung 63: TGGE-Bandenmuster einiger unbehandelter Klärschlämme

8.7. TGGE-Bandenmuster Isolation von Einzelbanden

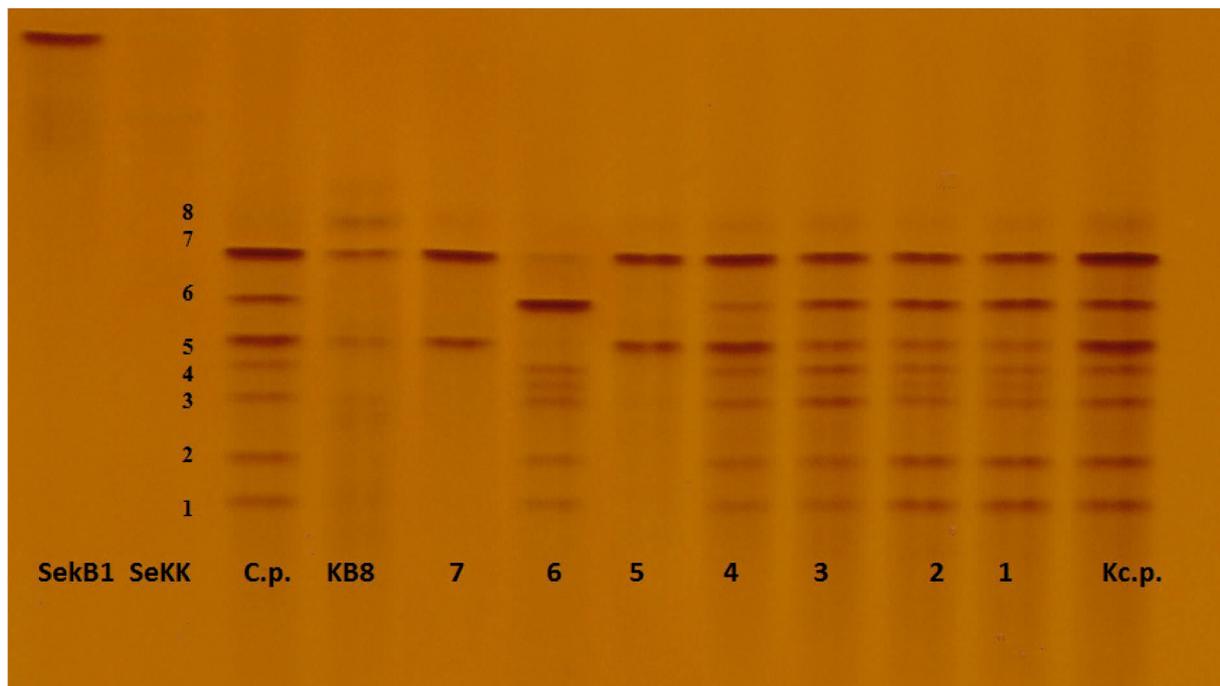


Abbildung 64: TGGE-Bandenmuster nach Isolation von Einzelbanden

8.8. Sequenzen

Sequenz K2 366/366 BP (906-1271) *C. perfringens* Stamm E060 Gänseleber (369)

```
TCCAGCTTCGGGTAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGACTGGTTTTAA
AGTTTGGCTCCACCTCGCGGTATTGCATCTCTCTGTACCAGCCATTGTAGCACGTG
TG TAGCCCTACACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTG
GTAAACCCAGGCAGTCTCGCTAGAGTCCTCAACTTAATGGTAGTAACTAACGACA
AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
AACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGATTCCTCGATTAAGAGTAA
TGCAAGGGATGTCAAGTGTAGGTAAGGTTCTTC
```

Sequenz BvF 2 361/361 BP nichtkultivierter Umwelt-MO Biogasanlagen(388), Fluss (289)

TCATGTAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGGGGTCGGTTTTGAAGATTTG
CTCCACGTCACCGTATTGCGTCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
CAGGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTATC
CCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTT
GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT
GCACCACCTGTCACCTCTGCTCCGAAGAGAGTACCCGATTAAGGGTAGGTCAGAG
GGATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGC

Sequenz K7 361 BP 360(361)/361 *C. perfringens* (423)

TCATGTAGGCGAGTTTCAGGCTAC(g/a)ATCCGAACTGAGACTGGTTTTTAAGTTTG
GCTCCACCTCGCGGTATTGCATCTCTGTACCAGCCATTGTAGCACGTGTGTAGC
CCTACACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCTGGTTAAC
CCAGGCAGTCTCGCTAGAGTCCTCAACTTAATGGTAGTAACTAACGACAAGGGTT
GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT
GCACCACCTGTCACCTTGTCGCCCGAAGGGATTTCTCGATTAAGAGTAATGCAAG
GGATGTCAAGTGTAGGTAAGGTTCTTCGCG

Sequenz BvF 1 241/241 (962-1201) nicht kultivierter Umwelt-MO Süßwasser (498)

TCCAGATCGCTCTTTCGCTTCCCTCTGTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCC
AAGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGGTTACC
CCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCATCTTACTGCTGGCTACTAAGGATAAGGGTTG
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATG
CACCACCTGTCACCTTCTGCC

Sequenz BnF 4 171/171 (929-1099) *Clostridium* sp. isoliert aus Rattendarm
(unveröffentlichte Daten) GenBank: JN381505.1

TGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAAGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTCTG
TCCCCGAAGGGAAAGATGCGATTAGGCATCGGTCAAAGGATGTCAAGCTTAGG
TAAGGTT

Sequence ID: lcl|44901 Length: 361 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 358 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
638 bits(345)	0.0	351/354(99%)	0/354(0%)	Plus/Plus
Query 12	GTAGGCGAGTTTCAGCCTACAATCCGAACTGAGACTGGTTTTAAAGTTTGGCTCCACCTC	71		
Sbjct 5	GTAGGCGAGTTTCAGGCTACGATCCGAACTGAGACTGGTTTTAAAGTTTGGCTCCACCTC	64		
Query 72	GCGGTATTGCATCTCTCTGTACCAGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACACATAAGGG	131		
Sbjct 65	GCGGTATTGCATCTCTCTGTACCAGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACACATAAGGG	124		
Query 132	GCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCCTCCTGGTTAACCCAGGCAGTCTCGCTAGA	191		
Sbjct 125	GCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCCTCCTGGTTAACCCAGGCAGTCTCGCTAGA	184		
Query 192	GTCCTCAACTTAATGGTAGTAACTAACGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC	251		
Sbjct 185	GTCCTCAACTTAATGGTAGTAACTAACGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC	244		
Query 252	AACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCTCCCGAAGG	311		
Sbjct 245	AACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCTCCCGAAGG	304		
Query 312	GATTTCCCTCGATTAAGAGTAATGCAAGGGATGTCAAGTGTAGGTAAGGTTCTTC	365		
Sbjct 305	GATTTCCCTCGATTAAGAGTAATGCAAGGGATGTCAAGTGTAGGTAAGGTTCTTC	358		

Abbildung 65: Sequenzvergleich der Banden K 2 und K 7 (erstellt mit BLAST(507))

8.9. Fotografien



Abbildung 66: Springschwänze, Milben, Ameisen u.v.m. (1:25) auf der fermentierten Matrix **K** während des Vererdungsprozesses

Im Vergleich dazu waren auf dem umgebenden Ackerboden in ähnlicher Probenmenge (~15 g) keine Bodentiere zu sehen.

In **Abbildung 67** und **Abbildung 68** sind Versuchsbeete dargestellt, diese wurden angelegt um den Vererdungsprozess von Matrix **K** zu beobachten sowie anwendungsorientierte Vorversuche durchzuführen (406). Der Zusatz von Holzkohle führte dazu, dass sich die Farbe der entstehenden Erde stark veränderte. Dies führte u. a. zu einer stärkeren Erwärmung im Frühjahr und einer früheren Keimung.



Abbildung 67: Versuchsbeet ohne Holzkohle nach Ernte



Abbildung 68: Versuchsbeet mit Holzkohle nach Ernte

Hinweise zur Diagrammbeschriftung sowie der Matrixbezeichnung:

Den Limitationen des Programmes Excel (Microsoft, Redmond, USA) unterworfen, war es leider nicht möglich, in Diagrammen gleichzeitig *kursive* und nichtkursive Zeichen in einer Beschriftungszeile zu verwenden. Aus diesem Grunde bittet der Autor um Entschuldigung für die abweichende Schreibweise bei Serovaren (z. B. *S. Anatum*, oder *E. coli* O:157) bzw. Familiennamen in der X-Achse.

Darüber hinaus erschien es dem Autor sinnvoll, die Namen der Matrizes bei jeder Erstverwendung in einem Abschnitt fett zu drucken, um Suchvorgänge zu erleichtern.

Literaturverzeichnis

1. Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien. EEG.
2. VDLUFA Methodenbuch Band III Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA - Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V.
3. 1872. Landwirtschaftliche Jahrbücher. Zeitschr. für d. wissenschaftl. Landbau. Wiegandt Hempel & Parey, Berlin, Berlin.
4. 1992. Klärschlammverordnung. AbfKlärV, vol. 1992.
5. 1992. RICHTLINIE 92/119/EWG DES RATES vom 17. Dezember 1992 mit allgemeinen Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung bestimmter Tierseuchen sowie besonderen Maßnahmen bezüglich der vesikulären Schweinekrankheit. 92/119/EWG.
6. 2003. Verordnung (EG) Nr. 2003/2003 über Düngemittel. eur-lex.europa.eu.
7. 2007. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. DVG-Verlag, Giessen.
8. 2009. Düngegesetz.
9. 2010. VERORDNUNG (EG) Nr. 1069/2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte). http://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=7722&article_id=21700&_psmand=24.
10. **Aasen, I. M., T. Moretro, T. Katla, L. Axelsson, and Storro I.** 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**:159–166.
11. **Abe, F., N. Ishibashi, and S. Shimamura.** 1995. Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets. *Journal of Dairy Science* **78**:2838–2846.
12. **Abebe, W., N. Tsuji, H. Kasuga-Aoki, T. Miyoshi, T. Isobe, T. Arakawa, Y. Matsumoto, and S. Yoshihara.** 2002. Species-specific proteins identified in *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* using two-dimensional electrophoresis. *Parasitology Research* **88**:868–871.
13. **Abraham, J. M., and G. L. Simon.** 2007. *Comamonas testosteroni* Bacteremia. *Infectious Diseases in Clinical Practice* **15**:272–273.
14. **Adam, D.** (ed.). 2004. Die Infektiologie. Mit 444 Tabellen. Springer, Berlin, Heidelberg [u.a.].
15. **Ade-Kappellmann, K.** 2008. Untersuchungen zur seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von Gärresten aus Bioabfällen nach der von Gärresten aus Bioabfällen nach der. INAUGURAL-DISSERTATION. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin.
16. **Adelowo, O. O., and O. E. Fagade.** 2012. Phylogenetic characterization, antimicrobial susceptibilities, and mechanisms of resistance in bacteria isolates from a poultry waste-polluted river, southwestern Nigeria. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY* **36**:37–45.
17. **Ahrné, Nobaek, Jeppsson, Adlerberth, Wold, and Molin.** 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology* **85**:88–94.
18. **Aiba, Y., N. Suzuki, A. M. Kabir, A. Takagi, and Y. Koga.** 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterology* **93**:2097–2101.
19. **Ajithkumar, B., V. P. Ajithkumar, and R. Iriye.** 2003. Degradation of 4-aminophenol and 4-hexylphenol by a new activated sludge isolate of *Pseudomonas veronii* and proposal for a new subspecies status. *Research in Microbiology* **154**:17–23.
20. **Akhtar, M. S., and Z. A. Siddiqui.** 2008. *Glomus intraradicis*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Gen Plant Pathol* **74**:53–60.
21. **Albert, E., F. Förster, H. Ernst, Kolbe Hartmut, B. Dittrich, and et.al.** 2007. Umsetzung der Düngeverordnung. Hinweise und Richtwerte für die Praxis. www.Landwirtschaft.Sachsen.de/LFL.
22. **Alcock, J. P.** 2000. Milk and its Products in Ancient Rome, p. 31–38. *In* H. Walker (ed.), *Milk-- beyond the dairy*. Proceedings of the Oxford Symposium on Food and Cookery 1999. Prospect Books. Prospect Books, Totnes, Devon, Eng.
23. **Aldape, M. J., A. E. Bryant, and D. L. Stevens.** 2006. *Clostridium sordellii* Infection: Epidemiology, Clinical Findings, and Current Perspectives on Diagnosis and Treatment. *Clinical Infectious Diseases* **43**:1436–1446.
24. **ALEXANDER, B., and F. G. Priest.** 1989. *Bacillus gluconolyticus*, a New Species That Degrades a Variety of -Glucans. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**:112–115.
25. **Alnor, D., N. Fridodt-Møller, F. Espersen, and W. Frederiksen.** 1994. Infections with the Unusual Human Pathogens *Agrobacterium* Species and *Ochrobactrum anthropi*. *Clinical Infectious Diseases* **18**:914–920.
26. **Altermann, M., J. Rinklebe, I. Merbach, M. Körschens, U. Langer, and B. Hofmann.** 2005. Chernozem—Soil of the Year 2005. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**:725–740.
27. **Amann, R. L., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* **59**:143–169.
28. **Anema, P. J., and J. M. Geers.** 1973. Controlling the Sporulation of *Clostridium sporogenes* and the Heat Resistance of the Spores. *Journal of Applied Bacteriology*:553–558.
29. **Appel, B., G. F. Bül, M. Greiner, M. Lahrssen-Wiederholt, and A. Hensel.** 2012. EHEC outbreak 2011. Investigation of the outbreak along the food chain. *BfR-Wissenschaft*, vol. 2012,3. BfR, Berlin.
30. **Arakawa, K., Y. Kawai, H. Iioka, M. Tanioka, J. Nishimura, H. Kitazawa, K. Tsurumi, and T. Saito.** 2009. Effects of gasserins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii*, with glycine on custard cream preservation. *Journal of Dairy Science* **92**:2365–2372.
31. **Aureli, P., L. Feniccia, B. Pasolini, M. Gianfranceschi, L. M. McCroskey, and C. L. Hatheway.** 1986. Two Cases of Type E Infant Botulism Caused by Neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *Journal of Infectious Diseases* **154**:207–211.
32. **Axelsson, L. T., T. C. Chung, W. J. Dobrogosz, and S. E. Lindgren.** 1989. Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis* **2**:131–136.
33. **Back, W.** 2008. Mikrobiologie der Lebensmittel, Getränke. Behrs-Verlag, Hamburg.
34. **Badger, J. L., M. F. Stins, and K. S. Kim.** 1999. *Citrobacter freundii* Invades and Replicates in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Infection and Immunity* **67**:4208–4215.
35. **Bagge, E., L. Sahlström, and A. Albiñ.** 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research* **39**:4879–4886.
36. **Barash, J. R., T. W. H. Tang, and S. S. Arnon.** 2005. First Case of Infant Botulism Caused by *Clostridium baratii* Type F in California. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:4280–4282.
37. **Bargabus, R., N. Zidack, J. Sherwood, and B. Jacobsen.** 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**:289–298.

38. **Barton, L. L., E. D. Rider, and R. W. Coen.** 2001. Bacteremic Infection With *Pediococcus*: Vancomycin-Resistant Opportunist. *PEDIATRICS* **107**:775–776.
39. **Batchelor, D. M.** Aerobic Spore-Bearing Bacteria in the Intestinal Tract of Children.
40. **Batmanglij, N.** 2000. Milk and its By-products in Ancient Persia and Modern Iran, p. 64–73. *In* H. Walker (ed.), *Milk-- beyond the dairy*. Proceedings of the Oxford Symposium on Food and Cookery 1999. Prospect Books. Prospect Books, Totnes, Devon, Eng.
41. **Bayne, H. N., G. H. Bayne, and J. A. Garibaldi.** 1969. Heat Resistance of *Salmonella*: the Uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775W. *Applied and Environmental Microbiology* **17**:78–82.
42. **Beaugerie, L., M. Metz, F. Barbut, G. Bellaiche, and J.-C. Petit.** 2003. *Klebsiella oxytoca* as an agent of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **1**:370–376.
43. **Behre, K.-E.** 1976. Beginn und Form der Plaggenwirtschaft in Nordwestdeutschland nach pollenanalytischen Untersuchungen in Ostfriesland. Neue Ausgrabungen und Forschungen in Niedersachsen.
44. **Benoit, V., A. Lebrhi, Milliè, J.-B. re, G. Lefebvre, and rard.** 1997. Purification and Partial Amino Acid Sequence of Brevicin 27, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus brevis* SB27. *Current Microbiology* **34**:173–179.
45. **Bernal, M. P., M. A. Sánchez-Monedero, C. Paredes, and A. Roig.** 1998. Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **69**.
46. **Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Hendrik-Dubernet, and Guéguen Micheline.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**.
47. **Bernards, A., A. de Beaufort, L. Dijkshoorn, and C. van Boven.** 1997. Outbreak of septicemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. *Journal of Hospital Infection* **35**:129–140.
48. **Bettelheim, K. A.** 1992. The Genus *Escherichia*, p. 2696–2736. *In* A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
49. **Bhunia, A., M. Johnson, B. Ray, and N. Kalchayanand.** 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:25–33.
50. **Bhunia, A., M. C. Johnson, and B. Ray.** 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology* **65**:261–268.
51. **Biasucci, G., B. Benenati, and G. Boehm.** 2008. Cesarean Delivery May Affect the Early Biodiversity of Intestinal Bacteria. *The Journal of Nutrition* **138**:1796–1800.
52. **Biavati, B., B. Sgorbati, and Scardovi Vittorio.** 1992. The Genus *Bifidobacterium*, p. 816–833. *In* A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
53. **Biele, C., and H. R. Horton.** 2008. *Biochemie*. S. 476. *Bio - Biologie*, 4th ed. Pearson Studium, München [u.a.].
54. **Biometra.** 2010. *Handbuch TGGE Maxi System*. biometra, Göttingen.
55. **Blobel, H., T. Schließer, H. Seifert, and H. Böhnelt.** 1995. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Clostridiosen, 2nd ed., 2/4. Fischer, Stuttgart u.a.
56. **Blume, H.-P.** 1990. *Handbuch des Bodenschutzes*. Bodenökologie und -belastung : vorbeugende und abwehrende Schutzmassnahmen. ecomed, Landsberg/Lech.
57. **Blume, H.-P., G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, and et.al.** 2010. Böden als Pflanzenstandort. *In* H.-P. Blume, G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, and et.al. (ed.), *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag ISBN 978-3-8274-2251-4 (Online). Spektrum Akademischer Verlag ISBN 978-3-8274-2251-4 (Online).
58. **Blume, H.-P., G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, and et.al.** 2010. Bodenbewertung und Bodenschutz. *In* H.-P. Blume, G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, and et.al. (ed.), *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag ISBN 978-3-8274-2251-4 (Online). Spektrum Akademischer Verlag ISBN 978-3-8274-2251-4 (Online).
59. **Blume, H.-P., G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, and et.al.** 2010. Organische Bodensubstanz, p. 63–80. *In* H.-P. Blume, G. W. Brümmer, R. Horn, E. Kandeler, I. Kögel-Knabner, R. Kretzschmar, and et.al. (ed.), *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag ISBN 978-3-8274-2251-4 (Online). Spektrum Akademischer Verlag ISBN 978-3-8274-2251-4 (Online).
60. **Boch, J., R. Supperer, T. Schnieder, and C. Bauer.** 2006. *Veterinärmedizinische Parasitologie*, 6th ed. Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart, Stuttgart.
61. **Boegel, K., M. Mussgay, and L. Kunger.** 1960. Isolierung und Charakterisierung eines Enterovirus des Rindes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* **7**:534–552.
62. **Boer, W. d., L. B. Folman, R. C. Summerbell, and L. Boddy.** 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:795–811.
63. **Bogaard, A., R. Fraser, T. H. E. Heaton, M. Wallace, P. Vaiglova, M. Charles, G. Jones, R. P. Evershed, A. K. Styring, N. H. Andersen, R.-M. Arbogast, L. Bartosiewicz, A. Gardeisen, M. Kanstrup, U. Maier, E. Marinova, L. Ninov, M. Schafer, and E. Stephan.** 2013. Crop manuring and intensive land management by Europe's first farmers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
64. **Boisvenue, R. J.** 1990. Effects of aeration and temperature in in vitro and in vivo studies on developing and infective eggs of *Ascaris suum*. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **57**.
65. **Bollet, C., M. Gannier, J. M. Sainty, P. Orhesser, and P. de Micco.** 1991. *Serratia fonticola* isolated from a leg abscess. *Journal of Clinical Microbiology* **29**:834.
66. **Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* **11**:731–753.
67. **Boon, N., W. Windt, W. Verstraete, and E. M. Top.** 2002. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* **39**:101–112.
68. **Boris, S., R. Jimenez-Diaz, J. Caso, and C. Barbes.** 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. *J Appl Microbiol* **91**:328–333.
69. **Bottonne, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical Microbiology Reviews* **10**:257–276.
70. **Boulton, Chapman, and Walsh.** 1998. Fatal reaction to transfusion of red-cell concentrate contaminated with *Serratia liquefaciens*. *Transfus Med* **8**:15–18.
71. **Braat, H., J. van den Brande, E. van Tol, P. M. Hommes Daan, and S. van Deventer.** 2004. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**:1618–1625.

72. **Breitenfellner, A., C. J. Cuaresma, and C. Keppel.** 2009. Geldpolitik und Wirtschaft: Determinanten der Rohölpreisentwicklung: Angebot, Nachfrage, Kartell oder Spekulation? GELDPOLITIK & WIRTSCHAFT 4. http://eptypen.oenb.at/de/img/gewi_2009_q4_analyse06_tcm14-155293.pdf.
73. **Breitschuh, G., G. Reinhold, and T. Breitschuh** (ed.). 2006. Ökologische Konsequenzen (einschließlich CC) des Anbaus und der Verwendung nachwachsender Biogasrohstoffe. http://biogas-infoboard.de/pdf/Breitschuh_AH_v4.pdf.
74. **Brenner, D. J., P. A. D. GRIMONT, A. G. Steigerwalt, G. R. FANNING, E. AGERON, and C. F. RIDDLE.** 1993. Classification of Citrobacteria by DNA Hybridization: Designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and Three Unnamed *Citrobacter* Genomespecies. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43:645–658.
75. **Brenner, D. J., C. M. O'Hara, P. A. Grimont, J. M. Janda, E. Falsen, E. Aldova, and A. G. Steigerwalt.** 1999. Biochemical Identification of *Citrobacter* Species Defined by DNA Hybridization and Description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomespecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomespecies 11). *Journal of Clinical Microbiology* 37:2619–2624.
76. **Brosius, J., T. Dull, D. D. Sleeter, and H. F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 148:107–127.
77. **Brügemann, J., J. R. Stephen, Y.-J. Chang, S. J. Macnaughton, G. A. Kowalchuk, E. Kline, and D. C. White.** 2000. Competitive PCR–DGGE analysis of bacterial mixtures. *Journal of Microbiological Methods* 40:111–123.
78. **Buchholz, U., H. Bernard, D. Werber, M. M. Böhmer, C. Renschmidt, H. Wilking, Y. Deleré, M. an der Heiden, C. Adlhoeh, J. Dreesman, J. Ehlers, S. Ethelberg, M. Faber, C. Frank, G. Fricke, M. Greiner, M. Höhle, S. Ivarsson, U. Jark, M. Kirchner, J. Koch, G. Krause, P. Luber, B. Rosner, K. Stark, and M. Kühne.** 2011. German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts. *N Engl J Med* 365:1763–1770.
79. **Bundesamt für Veterinärwesen BVET.** 2011. Askaridose. Eidgenössisches Volkswirtschaftsdepartement EVD.
80. **Bundesministerium für Umwelt, N. u. R.** 2012, posting date. Klärschlamm. <http://www.bmu.de/themen/wasser-abfall-boden/abfallwirtschaft/abfallarten-abfallstroeme/klaerschlamm/>.
81. **Bundesministerium für Umwelt, N. u. R.** 2012. Klärschlamm - Statistik. www.bmu.de/N3195/. [http://www.bmu.de/detailansicht/artikel/klaerschlamm-statistik/?tx_ttnews\[backPid\]=608](http://www.bmu.de/detailansicht/artikel/klaerschlamm-statistik/?tx_ttnews[backPid]=608).
82. **Callister, S. M., and W. A. Agger.** 1987. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. 53.
83. **Cameron, M. S., J. L. Sherman, and L. E. Barrett.** 1980. Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree. *Applied and Environmental Microbiology* 39:943–949.
84. **Cannon, J. P., T. A. Lee, J. T. Bolanos, and L. H. Danziger.** 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:31–40.
85. **Capdevila, J. A., V. Bisbe, I. Gasser, J. Zuazu, T. Olivé, F. Fernández, and B. A. Pahissa.** 1998. *Enterobacter amnigenus*. An unusual human pathogen. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 16:364.
86. **Casadevall, A., and L.-a. Pirofski.** 2007. Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryotic Cell* 6:2169–2174.
87. **Casey, P., G. Casey, G. Gardiner, M. Tangney, C. Stanton, R. Ross, C. Hill, and G. Fitzgerald.** 2004. Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol* 39:431–438.
88. **Castro, A. de, A. Montaña, F.-J. Casado, A.-H. Sánchez, and L. Rejano.** 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology* 19:637–644.
89. **Catara, V., L. Sutra, A. Morineau, W. Achouak, R. Christen, and L. Gardan.** 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1749–1758.
90. **Chadalavada, D. M., and P. C. Bevilacqua.** 2009. Analyzing RNA and DNA Folding Using Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) with Application to In Vitro Selections, p. 389–408. *In*, Biophysical, Chemical, and Functional Probes of RNA Structure, Interactions and Folding: Part A. Elsevier. *Methods in Enzymology*. Elsevier.
91. **Chen, Y.-s., H.-c. Wu, H.-y. Lo, W.-h. Hsu, W.-c. Lin, and B.-y. Lin.** 2012. Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from Shao-jiou-luo (fermented zoned cerith), a traditional fermented food in Taiwan. *Journal of Aquatic Food Product Technology*:121113080641001.
92. **Childe, G. V.** 1929. *The Danube in prehistory*. Clarendon Press S. 45f, Oxford.
93. **Cieslak, T. J., C. J. Drabick, and M. L. Robb.** 1996. Pyogenic Infections Due to *Ochrobactrum anthropi*. *Clinical Infectious Diseases* 22:845–847.
94. **Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4321–4330.
95. **Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernandez, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernandez, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2643–2648.
96. **Clark, G.** 1952. *Prehistoric Europe: the economic basis*. With plates and text illustrations [including maps.]. Methuen & Co. LTD., London.
97. **Clark, J. S., J. Merkt, and H. Muller.** 1989. Post-Glacial Fire, Vegetation, and Human History on the Northern Alpine Forelands, South-Western Germany. *Journal of Ecology* 4 S. 897-925.
98. **Coenye, T., E. Falsen, B. Hoste, M. Ohlen, J. Goris, J. Govan, M. Gillis, and P. Vandamme.** 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomemusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:887–899.
99. **Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, and J. M. Tiedje.** 2013. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42:D633.
100. **Collins, M. D., D. Jones, J. A. E. Farrow, R. Kilpper-Balz, and K. H. Schleifer.** 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34:220–223.
101. **Collins, M. D., P. A. Lawson, and J. E. Farrow.** 1994. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:812–826.
102. **Colwell, R. R.** 1979. Enumeration of specific populations by the most-probable-number (MPN) method., p. 56–61. *In* J. Costerton and R. R. Colwell (ed.), *Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity and Ecology*, Philadelphia.
103. **Conn, V. M., and C. M. M. Franco.** 2004. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1787–1794.

104. **Corcoran, G., N. Gibbons, and T. Mulvihill.** 1991. Septicaemia caused by *Pediococcus pentosaceus*: A new opportunistic pathogen. *Journal of Infection* **23**:179–182.
105. **Corr, S. C., Y. Li, C. U. Riedel, P. W. O'Toole, C. Hill, and Gahan, C. G. M.** 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:7617–7621.
106. **Corti, G., N. Mondanelli, M. Losco, L. Bartolini, A. Fontanelli, and F. Paradisi.** 2009. Post-traumatic infection of the lower limb caused by rare Enterobacteriaceae and Mucorales in a young healthy male. *International Journal of Infectious Diseases* **13**:e57.
107. **Coton, M., F. Berthier, and E. Coton.** 2008. Rapid identification of the three major species of dairy obligate heterofermenters *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus parabuchneri* by species-specific duplex PCR. *FEMS Microbiology Letters* **284**:150–157.
108. **Cover, T. L., and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *New England Journal of Medicine* **321**.
109. **Cruz, A. T., A. C. Cazacu, and C. H. Allen.** 2007. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:1989–1992.
110. **Csonka, L. N.** 1989. Physiological and Genetic Response of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiological Reviews* **53**.
111. **Cuatrecasas, P., S. Fuchs, and C. B. Anfinsen.** 1967. Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* **242**:1541–1547.
112. **Dainty, R. H., R. A. Edwards, C. M. Hibbard, and S. V. Ramantanis.** 1986. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology* **61**:117–123.
113. **Delavenne, E., S. Cliquet, C. Trunet, G. Barbier, J. Mounier, and G. Le Blay.** 2014. Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. *Food Microbiology*.
114. **Della Riccia, D. N., F. Bizzini, M. G. Perilli, A. Polimeni, V. Trinchieri, G. Amicosante, and M. G. Cifone.** 2007. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases* **13**:376–385.
115. **Delley, M., B. Mollet, and H. Hottinger.** 1990. DNA Probe for *Lactobacillus delbrueckii*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:1967–1970.
116. **Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans, and J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:193–202.
117. **Denevan, W. M.** 1995. Prehistoric Agricultural Methods as Models for Sustainability. *ADVANCES IN PLANT PATHOLOGY-- 11 pp. 21-43*.
118. **Denevan, W. M.** 1996. A Bluff Model of Riverine Settlement in Prehistoric Amazonia. *Annals of the Association of American Geographers* **86**.
119. **Denevan, W. M.** 2002. Cultivated landscapes of native Amazonia and the Andes. *Oxford geographical and environmental studies*. Oxford University Press, Oxford, New York.
120. **Dernby, K. G., and J. Blanc.** 1921. On the growth and the proteolytic enzymes of certain anaerobes. *Journal of bacteriology* **6**:419–430.
121. **Devriese, L., M. Baele, and P. Butaye.** 2006. The Genus *Enterococcus*, p. 163–174. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer US. Springer US, New York, NY.
122. **Devriese, L. A., K. Chiers, P. de Herdt, D. Vanrompay, M. Desmidt, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1995. *Enterococcus hirae* infections in psittacine birds: Epidemiological, pathological and bacteriological observations. *Avian Pathology* **24**:523–531.
123. **Dhouib, A., N. Hamad, I. Hassaïri, and S. Sayadi.** 2003. Degradation of anionic surfactants by *Citrobacter braakii*. *Process Biochemistry* **38**:1245–1250.
124. **Di Giancamillo, A., F. Vitari, G. Savoini, V. Bontempo, C. Bersani, V. Dell'Orto, and C. Domeneghini.** 2008. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histology and histopathology* **23**:651.
125. **Dice, L. R.** 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* **26**:297.
126. **Diercke, C., and M. Fuchs.** 2008. *Diercke - Weltatlas, [Ausg.] 2, Freistaat Sachsen, 1. Aufl., Dr. A 1. Westermann, Braunschweig*.
127. **Dietrich, D. R., S. F. Webb, and T. Petry.** 2002. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicology Letters* **131**:1–3.
128. **Dillon, V., and R. Board (ed.)** 1994. *Natural antimicrobial systems and food preservation*. Biddles Ltd, Guildford, Wallingford UK.
129. **Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and P. G. van Wijkelaar.** 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Sci* **56**:330–343.
130. **Duponnois, R., and M. Kisa.** 2006. The possible role of trehalose in the mycorrhiza helper bacterium effect. *Can. J. Bot.* **84**:1005–1008.
131. **Eckelmann, W., R. Baritz, S. Bialousz, P. Bielek, F. Carre, and B. Housková.** 2006. Common Criteria for Risk Area Identification according to Soil Threats. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
132. **Eckelmann, W., H. Sponagel, W. Grotenthaler, K. J. Hartmann, R. Hartwich, P. Janetzko, H. Joisten, D. Kühn, K.-J. Sabel, and R. Traidl.** 2005. *Bodenkundliche Kartieranleitung*. E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
133. **Eckert, J.** 2008. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. 112 Tabellen, 2nd ed. Enke, Stuttgart.
134. **Edberg, S., E. Rice, R. Karlin, and M. Allen.** 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology* **88**:106S.
135. **Eden, M. J., W. Bray, L. Herrera, and C. McEwan.** 1984. Terra Preta Soils and Their Archaeological Context in the Caqueta Basin of Southeast Colombia. *American Antiquity* **49**.
136. **Bruno Glaser.** persönliche Email. Online Verfügbar: u.a.: <http://www.magazin.uni-halle.de/13999/biokohle-mit-mist-gegen-den-klimawandel/>
137. **Edward Brandt (ed.)** 1927. *Untersuchungen zum römischen Kochbuche. Versuch einer Lösung der Apicius-Frage*, vol. 19. Dietrich'sche Verlagsbuchhandlung, Leipzig.
138. **Eghball, B., J. F. Power, J. E. Gilley, and J. W. Doran.** 1997. Nutrient, carbon, and mass loss during composting of beef cattle feedlot manure. *Journal of environmental quality* **26**:189–193.
139. **Elomari, M., L. Coroler, S. Verhille, D. Izard, and H. Leclerc.** 1997. *Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**:846–852.
140. **ELOMARI, M., L. COROLER, B. Hoste, M. Gillis, D. IZARD, and H. LECLERC.** 1996. DNA Relatedness among *Pseudomonas* Strains Isolated from Natural Mineral Waters and Proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:1138–1144.
141. **EMIKO Handelsgesellschaft mbH.** EMIKO® Bokashi Schwarzerde. <http://emiko-shop.de/Haus-Garten/Bodenverbesserung/EMIKO-Bokashi-Schwarzerde.html>.
142. **EMIKO Handelsgesellschaft mbH.** Resonanzkeramik. <http://emiko-shop.de/Resonanzkeramik/>.
143. **Eng, R. H., R. Drehmel, S. M. Smith, and E. J. Goldstein.** 1984. *Saccharomyces cerevisiae* infections in man. *Med Mycol* **22**:403–407.

144. **Etheridge, M. E., R. H. Yolken, and Vonderfecht S. L.** 1988. Enterococcus hirae implicated as a cause of diarrhea in suckling rats. *Journal of Clinical Microbiology* **26**:1741–1744.
145. **Evyernie, D., S. Yamazaki, K. Morimoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya.** 2000. Identification and characterization of Clostridium paraputrificum M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**:596–601.
146. **Factura, H., T. Bettendorf, C. Buzie, H. Pieplow, Reckin J., and R. Otterpohl.** 2010. Terra Preta Sanitation: re-discovered from an ancient Amazonian civilisation - integrating sanitation, bio-waste management and agriculture. *Water Science & Technology*, **61**:2673.
147. **Fakhry, S., N. Manzo, E. D'Apuzzo, L. Pietrini, I. Sorrentini, E. Ricca, M. de Felice, and L. Baccigalupi.** 2009. Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Research in Microbiology* **160**:817–823.
- 147a **FAO, IFAD and WFP.** 2014. The State of Food Insecurity in the World 2014. Strengthening the enabling environment for food security and nutrition. Rome, FAO
148. **Farmer III, J., M. Arduino, and F. Hickman-Brenner.** 1992. The Genera Aeromonas und Plesiomonas, p. 3012–3045. *In* A. Balows, H. G. Trüpfel, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
149. **Farrar, W. E., and A. C. Reboli.** 1992. The Genus Bacillus - Medical, p. 1746–1768. *In* A. Balows, H. G. Trüpfel, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
150. **Farrow, J. A., B. A. Phillips, and M. D. Collins.** 1988. Nucleic acid studies on some heterofermentative lactobacilli: Description of Lactobacillus malefermentans sp.nov. and Lactobacillus parabuchneri sp.nov. *FEMS Microbiology Letters* **55**:163–168.
151. **Farrow, J. A. E., and M. D. Collins.** 1985. Enterococcus hirae, a New Species That Includes Amino Acid Assay Strain NCDO 1258 and Strains Causing Growth Depression in Young Chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**:73–75.
152. **Farrow, J. A. E., and M. D. Collins.** 1988. Notes: Lactobacillus oris sp. nov. from the Human Oral Cavity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**:116–118.
153. **Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and A. D. L. Akkermans.** 2002. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:219–226.
154. **Fernandez-Olmos, A., M. I. Morosini, A. Lamas, M. Garcia-Castillo, L. Garcia-Garcia, R. Canton, and L. Maiz.** 2012. Clinical and Microbiological Features of a Cystic Fibrosis Patient Chronically Colonized with Pandoraea sputorum Identified by Combining 16S rRNA Sequencing and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **50**:1096–1098.
155. **Ferrand, J., T. Hadou, C. Selton-Suty, F. Goehringer, N. Sadoul, C. Alauzet, and A. Lozniewski.** 2013. Cardiac Device-Related Endocarditis Caused by Paenibacillus glucanolyticus. *Journal of Clinical Microbiology* **51**:3439–3442.
156. **Fidel Jr., P. L., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel.** 1999. Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans. *Clinical Microbiology Reviews* **12**:80–96.
157. **Finck, A.** 1991. Pflanzenernährung in Stichworten, 5th ed. Hirt, Berlin [u.a.].
158. **Finegold, S. M., J. Downes, and P. H. Summanen.** 2012. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* **18**:260–262.
159. **Finegold, S. M., Y. Song, C. Liu, D. W. Hecht, P. Summanen, E. Könönen, and S. D. Allen.** 2005. Clostridium clostridioforme: a mixture of three clinically important species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**:319–324.
160. **Firbas, F.** 1949. Waldgeschichte Mitteleuropas Band 1, vol. 1. Gustav Fischer Verlag S.353 ff, Jena.
161. **Fleming, H. P., R. F. McFeeters, and M. A. Daeschel.** 1985. The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: vegetable products. Bacterial starter cultures for foods:97–118.
162. **Formowitz, B., F. Elango, S. Okumoto, A. Buerkert, and T. Müller.** 2005. Wie wirken "effektive Mikroorganismen" auf EM-Bokashi in der Bananenproduktion (Musa ssp.)? 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau.
163. **Frank, C., D. Werber, J. P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M. J. Kemper, P. Follin, L. Müller, L. A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, and G. Krause.** 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli O104:H4 Outbreak in Germany. *N Engl J Med* **365**:1771–1780.
164. **Franke, U.** 2008. Mukoviszidose. Cystische Fibrose, 1st ed. GRIN Verlag, s.l. http://ebooks.ciando.com/book/index.cfm/bok_id/116681.
165. **Fregnan, G. B., D. W. Smith, and H. M. Randall.** 1961. Biological and Chemical Studies on Mycobacteria Relationship of Colony Morphology to Mycoside Content for Mycobacterium kansasii and Mycobacterium fortuitum. *Journal of bacteriology* **82**:517–527.
166. **Fritsch, F.** 2008. Informationen für Ackerbau und Grünland, Fleischknochenmehle als Dünger, August, 55545 Bad Kreuznach.
167. **Froggatt, J. W., J. L. Johnston, D. W. Galetto, and G. L. Archer.** 1989. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of Staphylococcus haemolyticus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**:460–466.
168. **Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Microbiol* **66**:365–378.
169. **Gaasenbeek, C., and F. Borgsteede.** 1998. Studies on the survival of Ascaris suum eggs under laboratory and simulated field conditions. *Veterinary Parasitology* **75**:227–234.
170. **Gänzle, M. G., A. Holtzel, J. Walter, G. Jung, and W. P. Hammes.** 2000. Characterization of Reutericyclin Produced by Lactobacillus reuteri LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4325–4333.
171. **Gehrt, E., M. Geschwinde, and M. W. I. Schmidt.** 2002. Neolithikum, Feuer und Tschernosem - oder: Was habend die Linienbandkeramiker mit der Schwarzerde zu tun? *Archäologisches Korrespondenzblatt*.
172. **George, S. M., B. M. Lund, and T. F. Brocklehurst.** 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of Listeria monocytogenes. *Letters in applied microbiology* **6**:153–156.
173. **Gerlach, R., and E. Eckmeier.** 2012. Das Problem der „Schwarzerden“ im Rheinland im archäologischen Kontext – Ein Resümee. *In* A. Stobbe and U. Tegmeier (ed.), *Verzweigungen Eine Würdigung für A.J. Kalis und J.Meurers-Balke S. 105-124*. Verlag Dr. Rudolf Habelt GmbH. Verlag Dr. Rudolf Habelt GmbH, Bonn.
174. **Germans, W.** 1954. Laboratoriumsuntersuchungen über die Resistenz der Eier des menschlichen Spulwurmes Ascaris Lumbricoides L. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **16**.
175. **Ghosh, J., P. Larsson, B. Singh, B. M. F. Pettersson, N. M. Islam, S. N. Sarkar, S. Dasgupta, and L. A. Kirsebom.** 2009. Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:10781–10786.
176. **Gilad, J., A. Borer, K. Riesenber, N. Peled, A. Shnaider, and F. Schlaeffer.** 1998. Enterococcus hirae septicemia in a patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:576–577.
177. **Gionchetti, P., F. Rizzello, A. Venturi, P. Brigidi, D. Matteuzzi, G. Bazzocchi, G. Poggioli, M. Miglioli, and M. Campieri.** 2000. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **119**:305–309.
178. **Glaser, B., and J. J. Birk.** 2012. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Indio). *Geochimica et Cosmochimica Acta*.

179. **Glaser, B., L. Haumaier, G. Guggenberger, and W. Zech.** 2001. The 'Terra Preta' phenomenon: A model for sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften*.
180. **Glaser, B., M. Parr, C. Braun, and G. Kopolo.** 2009. Biochar is carbon negative. *Nature Geoscience* **2**.
181. **Glathe, H., K. H. Knoll, and A. A. Makawi.** 1962. Das Verhalten von Salmonellen in verschiedenen Bodenarten. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde* **100**.
182. **Glathe, H., and A. A. M. Makawi.** 1963. Über die Wirkung von Klärschlamm auf Boden und Mikroorganismen. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* **101**:109–121.
183. **Glazunova, O. O., D. Raoult, and V. Roux.** 2005. First Identification of *Clostridium celerecrescens* in Liquid Drained from an Abscess. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:3007–3008.
184. **Goedeky, G.** Bruker's IVD MALDI Biotyper Now Available to Clinical Microbiology Sites in Canada for Proteomic Identification of Microorganisms. Press Release.
185. **Goepfert, J. M., and R. Hicks.** 1969. Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **97**:956–958.
186. **Goetz, A.** 1983. *Pseudomonas stutzeri* Bacteremia Associated With Hemodialysis. *Arch Intern Med* **143**:1909.
187. **Goez, J. A. E.** 1782. Versuch einer Naturgeschichte der Eingeweidewürmer thierischer Körper. Philipp Adam Pape, Blankenburg.
188. **Golledge, C. L., N. Stingemore, M. Aravena, and D. Joske.** 1990. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pedococcus acidilactici*. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1678–1679.
189. **Graevenitz, A. v., and T. Krech.** 1992. The Genus *Corynebacterium* - Medical, p. 1172–1187. In A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
190. **Graffunder, E. M.** 2002. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**:999–1005.
191. **Greetham, H. L.** 2003. *Clostridium colicanis* sp. nov., from canine faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:259–262.
192. **Gries, C.** 2008. Einfluss verschiedener Silierfehler auf die Silagequalität auf Qualitätsmerkmale von Silagen aus Herbstaufwüchsen. Bachelor-Thesis. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
193. **Grimont, F., and P. A. D. Grimont.** 2006. The Genus *Serratia*, p. 219–244. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer New York. Springer New York.
194. **Grohskopf, L. A., V. R. Roth, D. R. Feikin, M. J. Arduino, L. A. Carson, J. I. Tokars, S. C. Holt, B. J. Jensen, R. E. Hoffman, and W. R. Jarvis.** 2001. *Serratia liquefaciens* Bloodstream Infections from Contamination of Epoetin Alfa at a Hemodialysis Center. *N Engl J Med* **344**:1491–1497.
195. **Guarneri, T., L. Rossetti, and G. Giraffa.** 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* **33**:377–381.
196. **Gunther, N. W., A. Nunez, W. Fett, and D. K. Y. Solaiman.** 2005. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:2288–2293.
197. **Haacker, K., H. J. Block, and F. Weissbach.** 1983. Zur kolorimetrischen Milchsäurebestimmung in Silagen mit p-Hydroxydiphenyl. *Archiv für Tierernaehrung* **33**.
198. **Hakizimana, J. D., M. Gryzenhout, T. A. Coutinho, and N. van den Berg.** 2011. Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*, p. 1–10. In , Proc. VII World Avocado Congress.
199. **Halling-Sørensen, B., S. Nors Nielsen, P. Lanzky, F. Ingerslev, H. Holten Lützhøft, and S. Jørgensen.** 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* **36**:357–393.
200. **Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley.** 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Micro* **2**:95–108.
201. **Hammes, W., N. Weiss, and W. Holzappel.** 1992. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, p. 1535–1595. In A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
202. **Hammes, W. P., and C. Hertel.** 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, p. 320–403. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer US. Springer US, New York, NY.
203. **HAND, W. L.** 1970. *Mycobacterium fortuitum*—A Human Pathogen. *Ann Intern Med* **73**:971.
204. **Hanna, P.** 1998. Anthrax pathogenesis and host response, p. 13–35. In P. K. Vogt and M. J. Mahan (ed.), *Bacterial Infection: Close Encounters at the Host Pathogen Interface*. Springer Berlin Heidelberg. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 225. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
205. **Hao, D. N., van Tao, B. T. P. Hoa, T. N. Le Diep, and N. T. T. Duyen.** 2001. Effects of Bokashi (EM) product on the animal excretes. *Khoa Hoc Ky Thuat Thu Y / Veterinary Sciences and Techniques* **Feb**:44–48. <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2001%2FVN%2FVN01002.xml%3BVN2001000140>.
206. **Hao, D. N., van Tao, B. T. P. Hoa, Nguyen Thi Thuy, and K. T. D. Duyen.** 2005. Study on the effect of EM Bokashi product on the microbial digestive system, excretes and environmental sanitation in chicken rearing. *Chinh tri Quoc gia, Hanoi - Agris*:474–782. <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2007/VN/VN0701.xml;VN2006000196>.
207. **Harbarth, S., P. Sudre, S. Dharan, M. Cadenas, and D. Pittet.** 1999. Outbreak of *Enterobacter cloacae* Related to Understaffing, Overcrowding, and Poor Hygiene Practices •. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**:598–603.
208. **Härle, M.** 2009. Biogasgülle - Eigenschaften, Einfluss auf den Ackerbau und Rechtliche Grundlagen. Diplomarbeit. Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen.
209. **Hartmann, F. A., and S. E. West.** 1995. Antimicrobial Susceptibility Profiles of Multidrug-Resistant *Salmonella* Anatum Isolated from Horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **7**:159–161.
210. **Hartmans, S., J. A. M. Bont, and E. Stackebrandt.** 2006. The Genus *Mycobacterium*--Nonmedical, p. 889–918. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer New York. Springer New York, New York, NY.
211. **Harty, D., H. Oakey, M. Patrikakis, E. Hume, and K. Knox.** 1994. Pathogenic potential of lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology* **24**:179–189.
212. **Harty, D. W. S., M. Patrikakis, and K. W. Knox.** 1993. Identification of *Lactobacillus* Strains Isolated from Patients with Infective Endocarditis and Comparison of their Surface-associated Properties with those of Other Strains of the Same Species. *Microb Ecol Health Dis* **6**:191–201.
213. **Harvey, S. M., J. Sturgeon, and D. E. Dassey.** 2002. Botulism Due to *Clostridium baratii* Type F Toxin. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:2260–2262.
214. **Werner Willmann.** Grassilo als Fahrsilo auf einem betonierten Platz. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fahrsilo.JPG>.
215. **Hejazi, A., and F. R. Falkiner.** 1997. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* **46**:903–912.

216. Helgason, E., O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, and A.-B. Kolsto. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:2627–2630.
217. Hensel, J. 2010. Brot aus Steinen. Ein neues und logisches System zur Felddüngung und körperlichen Regeneration. [Lulu], [Ragleih].
- 217a. Herrmann, C., Heiermann, M., and Idler, C. (2011) Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource technology*, **102**(8):5153-5161.
218. Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, and E. M. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3233–3241.
219. Heuer, H., and K. Smalla. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. *Modern soil microbiology*:353–373.
220. Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke, P. Scheldeman, K. Kersters, P. de Vos, N. A. Logan, A. M. Aziz, N. Ali, and R. C. W. Berkeley. 1996. A Polyphasic Reassessment of the Genus *Paenibacillus*, Reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and Emended Descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**:988–1003.
221. Heyrman, J. 2005. Study of mural painting isolates, leading to the transfer of 'Bacillus maroccanus' and 'Bacillus carotarum' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to 'Bacillus macroides' and description of *Bacillus muralis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:119–131.
222. Higa, T., and J. F. Parr. 1994. Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment, Atami, Japan.
223. Highsmith, A. K., and W. R. Jarvis. 1985. *Klebsiella pneumoniae*: Selected Virulence Factors That Contribute to Pathogenicity. *Infection Control* **6**:75–77.
224. Hildebrand, D. C., N. J. Palleroni, M. Henderson, J. Toth, and J. L. Johnson. 1994. *Pseudomonas flavescens* sp. nov., Isolated from Walnut Blight Cankers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:410–415.
225. Hippe, H., J. R. Andreesen, and G. Gottschalk. 1992. The Genus *Clostridium*-Nonmedical, p. 1800–1866. In A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
226. Hoffmann, H., S. Stindl, A. Stumpf, A. Mehlen, D. Monget, J. Heesemann, K. H. Schleifer, and A. Roggenkamp. 2005. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and Applied Microbiology* **28**:206–212.
227. Högenauer, C., C. Langner, E. Beubler, I. T. Lippe, R. Schicho, G. Gorkiewicz, R. Krause, N. Gerstgrasser, G. J. Krejs, and T. A. Hinterleitner. 2006. *Klebsiella oxytoca* as a Causative Organism of Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. *N Engl J Med* **355**:2418–2426.
228. Hohenstein, V. 1919. Die ostdeutsche Schwarzerde (Tschernosem). *Internationale Mitteilungen für Bodenkunde S 1-31 sowie 125-178*.
229. Holmes, B., M. Popoff, M. Kiredjian, and K. Kersters. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**:406–416.
230. Holzapfel, W. H., C. M. A. P. Franz, W. Ludwig, W. Back, and L. M. T. Dicks. The Genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*, p. 229–266.
231. Homer, m. a. 750-700 v. Chr. Odyssee, unbekannt.
232. Hopkins, M. J., and G. T. Macfarlane. 2002. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology* **51**:448–454.
233. Horn, N. 1987. *Clostridium disporicum* sp. nov., a Saccharolytic Species Able to Form Two Spores per Cell, Isolated from a Rat Cecum. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**:398–401.
234. Hrubant, G. R. 1975. Changes in Microbial Population During Fermentation of Feedlot Waste with Corn. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**:113–119.
235. Hu, X., G. van der Auwera, S. Timmerly, L. Zhu, and J. Mahillon. 2009. Distribution, Diversity, and Potential Mobility of Extrachromosomal Elements Related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 Virulence Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:3016–3028.
236. Huycke, M. M., D. Sahn, and M. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:239–249.
237. Inceoglu, O., E. F. Hoogwout, P. Hill, and J. D. van Elsas. 2010. Effect of DNA Extraction Method on the Apparent Microbial Diversity of Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:3378–3382.
238. Inkster, T., C. Cordina, and A. Siegmeth. 2011. Septic arthritis following anterior cruciate ligament reconstruction secondary to *Clostridium sporogenes*; a rare clinical pathogen. *Journal of Clinical Pathology* **64**:820–821.
239. Ito, Y., Y. Kawai, K. Arakawa, Y. Honme, T. Sasaki, and T. Saito. 2009. Conjugative Plasmid from *Lactobacillus gasseri* LA39 That Carries Genes for Production of and Immunity to the Circular Bacteriocin Gassericin A. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:6340–6351.
240. Izuka, H., and K. Komagata. 1964. Microbiological Studies on Petroleum and Natural Gas. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**:207–221.
241. Jackson, T., H. Wang, M. J. Nugent, C. T. Griffin, A. M. Burnell, and B. C. Dowds. 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. *J Appl Microbiol* **78**:237–244.
242. William H. DuBay. Picture of cabbage and onions fermenting in a glass jar, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sauerkraut_Jar.jpg
243. Jawetz, E., E. A. Adelberg, and J. L. Melnick. 1980. *Medizinische Mikrobiologie*, 5th ed. Springer, Berlin [u.a.].
244. Jeffers, G. T., J. L. Bruce, and M. Wiedemann. 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* **147**:1095–1104.
245. Jett, B., M. M. Huycke, and M. Gilmore. 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **7**:462–478.
246. Jiang, X., J. Morgan, and M. P. Doyle. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Manure-Amended Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **68**.
247. Jiménez-Díaz, R., R. M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruiz-Barba, and J. C. Piard. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1416–1424.
248. Johnson, P., R. Dixon, and A. Ross. 1998. An in-vitro test for assessing the viability of *Ascaris suum* eggs exposed to various sewage treatment processes. *International Journal for Parasitology* **28**:627–633.
249. Joly-Guillou, M.-L. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* **11**:868–873.

250. Jones, D., and H. P. Seeliger. 1992. The Genus *Listeria*, p. 1595–1616. In A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
251. Jones, P., and M. Martin. 2003. A Review of the Literature on the Occurrence and Survival of Pathogens of Animals and Humans in Green Compost. The Waste and Resources Action Programme, Banbury OX16 0AH.
252. Kalbe, C., P. Marten, and G. Berg. 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiological Research* **151**:433–439.
253. Kalchayanand, N., M. Hanlin, and B. Ray. 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett Appl Microbiol* **15**:239–243.
254. Kawai, Y., Y. Ishii, K. Uemura, H. Kitazawa, T. Saito, and T. Itoh. 2001. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiology* **18**:407–415.
255. Kawai, Y., T. Saito, H. Kitazawa, and T. Itoh. 1998. Gassericin A; an Uncommon Cyclic Bacteriocin Produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 Linked at N- and C-Terminal Ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:2438–2440.
256. Kelterborn, E. 1988. Kauffmann-White-Schema (1987). VEB Ingenieurbüro für Melioration Abt. Vervielfältigung, Bad Freienwald.
257. Keys, T. F., L. J. Melton, M. D. Maker, and D. M. Ilstrup. 1983. A suspected hospital outbreak of pseudobacteremia due to *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Infectious Diseases* **147**:489–493.
258. Kibbe, W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* **35**:W43.
259. Kim, J.-W., and S. Rajagopal. 2001. Antibacterial Activities of *Lactobacillus crispatus* ATCC 33820 and *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. *The Journal of Microbiology* **39**:146–148.
260. Kjellberg Christensen, K., M. Carlsbæk, E. Norgaard, K. H. Warberg, O. Venelampi, and M. Brøgger. 2002. Supervision of the sanitary quality of composting in the Nordic countries. Evaluation of 16 full-scale facilities. *TemaNord*, 2002:567. Nordisk Council of Minister, Copenhagen.
261. Klauth, P. 2001. Quantitative Erfassung von Bakterien und deren spezifische Aktivität in komplexen Habitaten mittels Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildverarbeitung. Universitätsbibliothek.
262. Kloos, E. W., K.-H. Schleifer, and F. Götz. 1992. The Genus *Staphylococcus*, p. 1369–1420. In A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
263. Kloos, W. E., C. G. George, J. S. Olgiate, L. van Pelt, M. L. McKinnon, B. L. Zimmer, E. Muller, M. P. Weinstein, and S. Mirrett. 1998. *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:799–812.
264. Kloos, W. E., and K. H. Schleifer. 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **25**:62–79.
265. Knarreborg, A., N. Miquel, T. Granli, and B. B. Jensen. 2002. Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology* **99**:131–140.
266. Köhler, W. 1992. Pest, Pestheilige, Blutwunder und andere Begebenheiten aus der Geschichte der Bakteriologie. *Leopoldina* **37**:211–238.
267. Köll, P., R. Mändar, H. Marcotte, E. Leibur, M. Mikelsaar, and L. Hammarström. 2008. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol* **23**:139–147.
268. Koll-Klais, P., R. Mändar, E. Leibur, H. Marcotte, L. Hammarstrom, and M. Mikelsaar. 2005. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* **20**:354–361.
269. Koné, D., O. Coffe, C. Zurbrügg, K. Gallizzi, D. Moser, S. Drescher, and M. Strauss. 2007. Helminth eggs inactivation efficiency by faecal sludge dewatering and co-composting in tropical climates. *Water Research* **41**:4397–4402.
270. Kongpol, A., T. Pongtharangkul, J. Kato, K. Honda, H. Ohtake, and A. S. Vangnai. 2009. Characterization of an organic-solvent-tolerant *Brevibacillus agri* strain 13 able to stabilize solvent/water emulsion. *FEMS Microbiology Letters* **297**:225–233.
271. Korhonen, H., S. Ali-Yrkko, H. Ahola-Luttilla, and M. Antila. 1978. The antagonistic properties of lactobacilli against clostridia isolated from cheese, feed and manure. *Meijeriteellininen Aikkakaurskirja* **36**:20–24.
272. Kruis, W., E. Schutz, P. Fric, B. Fixa, G. Judmaier, and M. Stolte. 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **11**:853–858.
273. Kühnen, V., and H. E. Goldbach. 2004. Schwermetallbilanzen verschiedener Betriebstypen: Eintragswege, Flüsse, Minderungspotential. Forschungsbericht Nr. 118, Bonn.
274. Kulp, K., and K. J. Lorenz. 2003. *Handbook of dough fermentations*. M. Dekker, New York (N.Y.), Basel.
275. La Veach, M. A. Pfaller, M. t. Barrett, F. P. Koontz, and R. P. Wenzel. 1990. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:2064–2068.
276. Landwirtschaft, B. L. f. 2011. Basisdaten. http://www.lfl.bayern.de/iab/duengung/mineralisch/10536/basisdaten_2011.pdf, gelesen am 15. Januar 2013.
277. Landy, M., G. H. Warren, S. B. Rosenman, and L. G. Colio. 1948. Bacillomycin: An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active against Pathogenic Fungi. *Experimental Biology and Medicine* **67**:539–541.
278. Lau, S. K. 2004. Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Medical Microbiology* **53**:1247–1253.
279. Laubach, C. A., and J. L. Rice. 1916. Spore-Bearing Bacteria in Soil. *Aerobic Spore-Bearing Non-Pathogenic Bacteria*. *Journal of Applied Bacteriology* **1**:513–518.
280. Lautenbach, E., J. B. Patel, W. B. Bilker, P. H. Edelstein, and N. O. Fishman. 2001. Extended-Spectrum -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes. *Clinical Infectious Diseases* **32**:1162–1171.
281. Leblanc, D. J. 2006. *Enterococcus*, p. 175–204. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer US, New York, NY.
282. Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B. M. Pruß, T. Kaplan, E. Wießner-Gunkel, G. S. A. B. Stewart, and S. Scherer. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1373–1382.
283. Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* **18**:3956–3963.
284. Lee, J. H., V. D. Valeriano, Y.-R. Shin, J. P. Chae, G.-B. Kim, J.-S. Ham, J. Chun, and D.-K. Kang. 2012. Genome Sequence of *Lactobacillus mucosae* LM1, Isolated from Piglet Feces. *Journal of bacteriology* **194**:4766.
285. Lehmann, E., and H. Birsgal. 1960. Untersuchung von Futtermitteln mit Hilfe der Ameisensäuremethode zur Bestimmung von Zellstoff, Stärke und Protein. *Z. Pflanzenenernähr. Dueng. Bodenk.* **89**:42–49.

286. **Lehmann, J., J. Pereira da Silva Jr., C. Steiner, T. Nehls, W. Zech, and B. Glaser.** 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant and Soil* **249**.
- 286a **Leithold, G.** (2004). Humusversorgung im ökologischen Landbau: Analyse und Bewertung des Humushaushaltes mit Hilfe von Humusbilanzen. *Thüringer Ökoherz eV, Weimar*.
287. **Leroy, F., T. de Winter, T. Adriany, P. Neysens, and L. de Vuyst.** 2006. Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology* **112**:102–111.
288. **Levine, A. S., and C. R. Fellers.** 1940. Action of acetic acid on food spoilage microorganisms. *Journal of bacteriology* **39**:499–515.
289. **Li, D., R. Qi, M. Yang, Y. Zhang, and T. Yu.** 2011. Bacterial community characteristics under long-term antibiotic selection pressures. *Water Research* **45**:6063–6073.
290. **Lind, O.** 1937. Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Milchsäure, Essigsäure und Salzsäure und ihre Verwendung als Konservierungsmittel für Fleisch. Dissertation. Buch-,Verlags- und Akzidenzdruckerei Eduard Seibert, Giessen.
291. **Linde, K.** 1981. Hoch Immunogene Salmonella-Mutanten mit zwei unabhängig voneinander attenuierten Markern als potentielle Impfstoffe aus vermehrungsfähigen Bakterien. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.*
292. **Linde, K., J. Beer, and V. Bondareno.** 1990. Stable Salmonella live vaccine strains with two or more attenuating mutations and any desired level of attenuation. *Vaccine* **8**.
293. **Linde, K., A. Große-Herrenthey, P. Heisig, S. Schwarz, I. D. Jacobsen, and M. Krüger.** 2012. Metabolic Drift (MD) Mutanten als potentielle Impfstämme Einzelbefunde oder ein für alle Erreger zutreffendes Attenuierungsprinzip?! Verlag der DVG Service GmbH, Leipzig.
294. **Liu, J., H. Schulz, S. Brandl, H. Miehtke, B. Huwe, and B. Glaser.** 2012. Short-term effect of biochar and compost on soil fertility and water status of a Dystric Cambisol in NE Germany under field conditions. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **175**:698–707.
295. **Liu, S., B. Saha, and M. Cotta.** Cloning, Expression, Purification, and Analysis of Mannitol Dehydrogenase Gene *mtlK* from *Lactobacillus brevis*, p. 391–401.
296. **Logan, N. A.** 2002. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:953–966.
297. **Lorch, A., and M. Hoffmann.** 2010. EM - eine Chance für unsere Erde. Effektive Mikroorganismen - Wirkungsweise und Praxis ; [ein praktisches Anwenderbuch für alle], Erw. und aktualisierte Ausg. A. Lorch, Heiligenschwendi, Untere Haltenstr. 39.
298. **Loreille, O. M., T. M. Diegoli, J. A. Irwin, M. D. Coble, and T. J. Parsons.** 2007. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics* **1**:191–195.
299. **Lowy, F. D.** 1983. *Staphylococcus epidermidis* Infections. *Ann Intern Med* **99**:834.
300. **Lozo, J., M. Vukasinovic, I. Strahinic, and A. Topisirovic.** 2004. Characterization and Antimicrobial Activity of Bacteriocin 217 Produced by Natural Isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *Journal of Food Protection*:2727–2734.
301. **LUBW, A. 2., ... B.-u. N.** 2007. *Naturschutz-Info 1/2007*. Greiserdruck, Rastatt.
302. **MacLennan, J. D.** 1962. THE HISTOTOXIC CLOSTRIDIAL INFECTIONS OF MAN. *Bacteriology Reviews* **26**:177–274.
303. **Madigan, M. T., and J. M. Martinko.** 2009. *Brock Mikrobiologie*. Pearson.
304. **Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker, T. D. Brock, and W. Goebel.** 2001. *Mikrobiologie*. Spektrum Akad. Verl., Berlin [u.a.].
305. **Mafart, P., and I. Leguerinel.** 1998. Modeling Combined Effects of Temperature and pH on Heat Resistance of Spores by a Linear-Bigelow Equation. *J Food Science* **63**:6–8.
306. **Manero, G. F., N. Acero, J. Lucas, and A. Probanza.** 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant and Soil* **182**:67–74.
307. **Marrie, T. J., and J. W. Costerton.** 1981. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology* **42**:1093–1102.
308. **Martens, W., and R. Böhm.** 2009. Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresource Technology* **100**:5374–5378.
309. **Martens, W., A. Fink, W. Philipp, A. Weber, D. Winter, and Böhm R.** 1998. Inactivation of viral and bacterial pathogens in large scale slurry treatment plants. *Proceedings from Ramiran*:529–539.
310. **Mastro, T. D., J. S. Spika, P. Lozano, J. Appel, and R. R. Facklam.** 1990. Vancomycin-Resistant *Pediococcus acidilactici*: Nine Cases of Bacteremia. *Journal of Infectious Diseases* **161**:956–960.
311. **Mather, E., and J. F. Hart.** 1956. The Geography of Manure. *Land Economics* **32**.
312. **Mattick, A., A. Hirsch, and N. Berridge.** 1947. Further Observations on an Inhibitory Substance (Nisin) from Lactic Streptococci. *The Lancet* **250**:5–8.
313. **Mau, F.-P.** 2002. EM. Fantastische Erfolge mit effektiven Mikroorganismen in Haus und Garten, für Pflanzenwachstum und Gesundheit ; Anwenderbuch, 1st ed. Goldmann, München.
314. **Maya, C., M. Ortiz, and B. Jiménez.** 2010. Viability of *Ascaris* and other helminth genera non larval eggs in different conditions of temperature, lime (pH) and humidity. *Water Science and Technology* **62**.
315. **McCrary, M. H.** 1915. The numerical interpretation of fermentation-tube results. *Journal of Infectious Diseases* **17**.
316. **McCusker, J. H., K. V. Clemons, D. A. Stevens, and Davis R W.** 1994. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics* **136**:1261–1269.
317. **Meng, Q., M. S. Kerley, T. J. Russel, and G. L. Allee.** 1998. Lectin-like activity of *Escherichia coli* K88, *Salmonella choleraesuis*, and *Bifidobacteria pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin. *Journal of animal science* **76**:551–556.
318. **Meyer, H.** 2009. *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*, 11th ed. Schaper, Hannover.
319. **Miech, R. P.** 2005. Pathophysiology of Mifepristone-Induced Septic Shock Due to *Clostridium sordellii*. *Annals of Pharmacotherapy* **39**:1483–1488.
320. **Minamisawa, K., K. Nishioka, T. Miyaki, B. Ye, T. Miyamoto, M. You, A. Saito, M. Saito, W. L. Barraquio, N. Teaumroong, T. Sein, and T. Sato.** 2004. Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia Isolated from Gramineous Plants. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:3096–3102.
321. **Miyamoto, M., Y. Seto, D. Hai Hao, T. Teshima, Y. Bo Sun, T. Kabuki, L. Bing Yao, and H. Nakajima.** 2005. *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables ‘Suan cai’ in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Systematic and Applied Microbiology* **28**:688–694.
322. **Modderman, P. J. R.** 1971. Bandkeramiker und Wanderbauerntum. *Archäologisches Korrespondenzblatt* **1 S. 7-9**.
323. **Monnet, C., K. Correia, A.-S. Sarthou, and F. Irlinger.** 2006. Quantitative Detection of *Corynebacterium casei* in Cheese by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:6972–6979.
324. **Montecucco, C., O. Rossetto, and M. R. Popoff.** 2006. Neurotoxicogenic Clostridia, p. 679–697. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer US, Springer US, New York, NY.

325. **Morgulis, A., G. Coulouris, Y. Raytselis, T. L. Madden, R. Agarwala, and A. A. Schaffer.** 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* **24**:1757–1764.
326. **Mountzouris, K. C., P. Tsirotsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr, and K. Fegeros.** 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science* **86**:309–317.
327. **Munoz, P., E. Bouza, M. Cuenca-Estrella, J. M. Eiros, M. J. Perez, M. Sanchez-Somolinos, C. Rincon, J. Hortal, and T. Pelaez.** 2005. *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases* **40**:1625–1634.
328. **Murray, E., S. A. Webb, and M. Swann.** 1926. A disease in rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed organism: *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *Journal of Pathol. Bacteriology*:407–439.
329. **Muyzer, G., and K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:127–141.
330. **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 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* **59**:695–700.
331. **Nakamura, L. K.** 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a New Starch-Hydrolyzing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**:56–63.
332. **Nakamura, L. K.** 1993. DNA Relatedness of *Bacillus brevis* Migula 1900 Strains and Proposal of *Bacillus agri* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus centrosporus* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**:20–25.
333. **Nam, I.-H., Y.-S. Chang, H.-B. Hong, and Y.-E. Lee.** 2003. A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**:284–290.
334. **Naylor, S. W., J. C. Low, T. E. Besser, A. Mahajan, G. J. Gunn, M. C. Pearce, I. J. McKendrick, D. G. E. Smith, and D. L. Gally.** 2003. Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the Bovine Host. *Infection and Immunity* **71**:1505–1512.
335. **Nazir, J.** 2011. Persistence of H4N6, H5N1, and H6N8 avian influenza viruses, H1N1 human influenza virus, and two model viruses (NDV and ECBO) in various types of water, lake sediment, duck feces, and meat. VVB LauferweilerVerlag, Giessen.
336. **Nejsum, P., E. D. Parker, J. Frydenberg, A. Roepstorff, J. Boes, R. Haque, I. Astrup, J. Prag, and U. B. Skov Sorensen.** 2005. Ascariasis Is a Zoonosis in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:1142–1148.
337. **Nemec, A.** 2003. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1563–1567.
338. **Neut, C.** 2002. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology* **97**:939–946.
339. **Niedzielin, K., H. Kordecki, and B. e. Birkenfeld.** 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **13**:1143–1147.
340. **Nishida, S., K. Tamai, and T. Yamagishi.** 1964. Taxonomy of *Clostridium Bifermentans* and *Clostridium Sordellii* I. Their Toxicogenicity, Urease Activity, and Sporulating Potency. *Journal of bacteriology* **88**:1641–1646.
341. **Noble, R. C., and S. B. Overman.** 1994. *Pseudomonas stutzeri* infection a review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **19**:51–56.
342. **Nölkes, D.** 2008. Untersuchungen zu den Ursachen der Graskrankheit unter Anwendung molekularbiologischer Methoden (DGGE). Institut für Bakteriologie und Mykologie, Leipzig.
343. **Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, and H. Backhaus.** 1996. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of bacteriology* **178**:5636–5643.
344. **O'Donnell, C. J., K. B. Meyer, J. V. Jones, T. Benton, E. S. Kaneshiro, J. S. Nichols, and F. W. Schaefer III.** 1984. Survival of Parasite Eggs Upon Storage in Sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **618–625**.
345. **Ogunbanwo, S., A. Sanni, and Onilude A.A.** 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis*. *African Journal of Biotechnology* **2**:219–227.
346. **Oh, S.-E., S. van Ginkel, and B. E. Logan.** 2003. The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. *Environ. Sci. Technol.* **37**:5186–5190.
347. **Okereke, A., and T. J. Montville.** 1991. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **54**.
348. **Palleroni, N. J.** 1992. Human- and Animal-Pathogenic *Pseudomonads*, p. 3087–3103. *In* A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
349. **Palleroni, N. J., M. Doudoroff, R. Y. Stanier, R. E. Solanes, and M. Mandel.** 1970. Taxonomy of the Aerobic *Pseudomonads*: the Properties of the *Pseudomonas stutzeri* Group. *Journal of General Microbiology* **60**:215–231.
350. **Palop, M. L. L., S. Valles, F. Pinaga, and A. Flors.** 1989. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**:68–71.
351. **Pan-Hou, H. S., Y. Kajikawa, and N. Imura.** 1982. Characterization of organomercury-decomposing activity in cell extract of mercury-resistant *Clostridium cochlearium* T-2P. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **6**:82–88.
352. **Pareek, C. S., R. Smoczynski, and A. Tretyn.** 2011. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genetics* **52**:413–435.
353. **Pascual, L. M., M. B. Daniele, W. Giordano, M. C. Pájaro, and I. L. Barberis.** 2008. Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol* **56**:397–402.
354. **Pascual, L. M., M. B. Daniele, F. Ruiz, W. Giordano, C. Pájaro, and L. Barberis.** 2008. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **54**:141–148.
355. **Passador, L., J. Cook, M. Gambello, L. Rust, and B. Iglewski.** 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**:1127–1130.
356. **Patel, R., M. R. Keating, F. R. Cockerill, and J. M. Steckelberg.** 1993. Bacteremia Due to *Enterococcus avium*. *Clinical Infectious Diseases* **17**:1006–1011.
357. **Peces, R.** 1997. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter. *Nephrology Dialysis Transplantation* **12**:2428–2429.
358. **Pessi, T., Y. Sutas, M. Hurme, and E. Isolauri.** 2000. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* **30**:1804–1808.
359. **Pfyffer, G. E.** 1992. *Serratia fonticola* as an infectious agent. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:199–200.
360. **Pia Heinemann.** 2011. So krank machen deutsche Krankenhäuser. Hunderttausende Patienten infizieren sich jedes Jahr mit hochresistenten Erregern: Der Krieg gegen die Superkeime ist ein Kampf an vielen Fronten. Killerkeime. Die Welt. <http://www.welt.de/wissenschaft/article13554025/So-krank-machen-deutsche-Krankenhaeuser.html>.
361. **Piva, A., and D. R. Headon.** 1994. *Pediocin A*, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiology* **140**:697–702.

362. Plassart, C., F. Mauvais, J. Heurté, J. Sautereau, C. Legeay, and P. Bouvet. 2013. First case of intra-abdominal infection with *Clostridium disporicum*. *Anaerobe* **19**:77–78.
363. Pourcher, A.-M., P. Morand, F. Picard-Bonnaud, S. Billaudel, S. Monpocho, M. Federighi, V. Ferré, and G. Moguelet. 2005. Decrease of enteric microorganisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology* **99**:528–539.
364. Poyart, C. 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. coli' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:1247–1255.
365. Pradhan, A. K., N. Pradhan, L. B. Sukla, P. K. Panda, and B. K. Mishra. 2013. Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. *Bioprocess Biosyst Eng*.
366. Presser, K. A., T. Ross, and D. A. Ratkowsky. 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**:1773–1779.
367. Preston, R. J. 1939. Soil Erosion: The Significance of the Problem and Its Attempted Control. *Journal of Geography* **38**.
368. Pretorius, I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**:675–729.
369. Prevost, S., J.-L. Cayol, F. Zuber, J.-L. Tholozan, and F. Remize. 2013. Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety. *Food Control* **32**:222–227.
370. Pridal, A. 2002. Effects of three bacterial species on *Bombus terrestris* larvae under laboratory conditions. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **50**.
371. Priest, F. G., M. Goodfellow, and C. Todd. 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *Microbiology* **134**:1847–1882.
372. Princewill, T. J. T. 1978. Differences in Colony Morphology and Carbohydrate Fermentation of *Clostridium sporogenes*. *Journal of General Microbiology*:315–319.
373. Prüß, B. M., R. Dietrich, B. Nibler, E. Märtebauer, and S. Scherer. 1999. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:5436–5442.
374. Pusey, P. L. 1984. Postharvest Biological Control of Stone Fruit Brown Rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* **68**:753.
375. Quinn, P. J., B. K. Markey, F. C. Leonard, E. S. FitzPatrick, S. Fanning, and P. J. Hartigan. 2011, ©2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*, Second Edition. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.
376. Rahman, M., P. Colque-Navarro, I. Kuhn, G. Huys, J. Swings, and R. Mollby. 2002. Identification and Characterization of Pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar *Sobria* Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome in Fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:650–655.
377. Ramon-Garcia, S. 2006. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**:252–259.
378. Ranjit, N., and L. Kung. 2000. The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. *Journal of Dairy Science* **83**:526–535.
379. Rasko, D. A., D. R. Webster, J. W. Sahl, A. Bashir, N. Boisen, F. Scheutz, E. E. Paxinos, R. Sebra, C.-S. Chin, D. Iliopoulos, A. Klammer, P. Peluso, L. Lee, A. O. Kislyuk, J. Bullard, A. Kasarskis, S. Wang, J. Eid, D. Rank, J. C. Redman, S. R. Steyert, J. Frimodt-Møller, C. Struve, A. M. Petersen, K. A. Kroghelt, J. P. Nataro, E. E. Schadt, and M. K. Waldor. 2011. Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany. *N Engl J Med* **365**:709–717.
380. Ray, B., and M. Daeschel. 1994. Bacteriocins of Starter Culture Bacteria. In V. Dillon and R. Board (ed.), *Natural antimicrobial systems and food preservation*. Biddles Ltd, Guildford. Biddles Ltd, Guildford, Wallingford UK.
381. Reeves, A. E., M. J. Koenigsnecht, I. L. Bergin, and V. B. Young. 2012. Suppression of *Clostridium difficile* in the Gastrointestinal Tracts of Germfree Mice Inoculated with a Murine Isolate from the Family *Lachnospiraceae*. *Infection and Immunity* **80**:3786–3794.
382. Reid, K. C., F. R. Cockerill, and R. Patel. 2001. Clinical and Epidemiological Features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* Bacteremia: A Report of 20 Cases. *Clinical Infectious Diseases* **32**:1540–1546.
383. Reitzer, R., K. Gruber, G. Jögl, U. G. Wagner, H. Bothe, W. Buckel, and C. Kratky. 1999. Glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*: the structure of a coenzyme B12-dependent enzyme provides new mechanistic insights. *Structure* **7**:891–902.
384. Rello, J. 1999. *Acinetobacter baumannii* Infections in the ICU Customization is the Key. *CHEST* **115**:1226.
385. Revathi, G. 1998. An outbreak of extended-spectrum, β -lactamase-producing *Salmonella* senftenberg in a burns ward. *Journal of Hospital Infection* **40**:295–302.
386. Riley, M. A., and M. A. Chavan. 2007. *Bacteriocins. Ecology and evolution*. Springer, Berlin, New York.
387. Riley, M. A., and J. E. Wertz. 2002. BACTERIOCINS. Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:117–137.
388. Rivière, D., V. Desvignes, E. Pelletier, S. Chaussonnerie, S. Guermazi, J. Weissenbach, T. Li, P. Camacho, and A. Sghir. 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J* **3**:700–714.
389. Rolle, M., and A. Mayr. 2002. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 8th ed. Enke, Stuttgart.
390. Romero, B., M.-I. Morosini, E. Loza, M. Rodriguez-Banos, E. Navas, R. Canton, and R. d. Campo. 2011. Reidentification of *Streptococcus bovis* Isolates Causing Bacteremia According to the New Taxonomy Criteria: Still an Issue? *Journal of Clinical Microbiology* **49**:3228–3233.
391. Roos, S., F. Karner, L. Axelsson, and H. Jonsson. 2000. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:251–258.
392. Rosato, A., J. Pierre, D. Billot-Klein, A. Buu-Hoi, and L. Gutmann. 1995. Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**:830–833.
393. Ross, A. J., and F. P. Brancato. 1959. *Mycobacterium fortuitum* Cruz from the tropical fish *Hyphessobrycon innesi*. *Journal of bacteriology* **78**:392.
394. Rossello, R., E. Garcia-Valdes, J. Lalucat, and J. Ursing. 1991. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic and Applied Microbiology* **14**:150–157.
395. Roth, V., M. Arduino, J. Nobiletti, S. Holt, L. Carson, C. Wolf, B. Lenes, P. Allison, and W. Jarvis. 2000. Transfusion-related sepsis due to *Serratia liquefaciens* in the United States. *Transfusion* **40**:931–935.
396. Ruoff, K. L. 1992. The Genus *Streptococcus* - Medical, p. 1450–1464. In A. Balows, H. G. Trüpfner, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
397. Saavedra, J., N. Bauman, J. Perman, R. Yolken, and I. Oung. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet* **344**:1046–1049.
398. Sakamoto, I., M. Igarashi, K. Kimura, A. Takagi, T. Miwa, and Y. Koga. 2001. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**:709–710.

399. **Sanders, M., L. Morelli, and T. Tompkins.** 2003. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2:101–110.
400. **Sarma, P. S., and S. Mohanty.** 1998. *Pediococcus acidilactici* pneumonitis and bacteremia in a pregnant woman. *Journal of Clinical Microbiology* 36:2392–2393.
401. **Saviola, B., and W. Bishai.** 2006. The Genus *Mycobacterium*—Medical, p. 919–933. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer New York. Springer New York, New York, NY.
402. **Saxelin, M., N.-H. Chuang, B. Chassy, H. Rautelin, P. H. Makela, S. Salminen, and S. L. Gorbach.** 1996. Lactobacilli and Bacteremia in Southern Finland, 1989-1992. *Clinical Infectious Diseases* 22:564–566.
403. **Scarlett, C. M., J. T. Fletcher, P. Roberts, and R. A. Lelliott.** 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Ann Applied Biology* 88:105–114.
404. **Scheffer, F., and B. Meyer.** 1963. Berührungspunkte der archaeologischen und bodenkundlichen Forschung. Neue Ausgrabungen und Forschungen in Niedersachsen I.
405. **Scheinemann, H. A., K. Dittmar, K. Erfurt, F. Stöckel, and M. Krüger.** Hygienisation and nutrient conservation of sewage sludge or cattle manure by fermentation. unpublished data.
406. **Scheinemann, H. A., and M. Krüger.** 2010. Labor- und Felduntersuchung zur Abfall-/Klärschlammverwertung aus dezentralen Abwasserbehandlungen für die Herstellung hochwertiger Schwarzerdeböden (Terra Preta). Projektabschlussbericht DBU AZ 27937 /1, Leipzig.
407. **Scheinemann, H. A., and M. Krüger.** 2012. Untersuchung zur Abfall-/Klärschlammverwertung aus dezentraler Abwasserbehandlungen für die Herstellung hochwertiger Schwarzerdeböden (Terra Preta). Projektabschlussbericht DBU AZ 27937 /2, Leipzig.
408. **Scheldeman, P., K. Goossens, M. Rodriguez-Diaz, A. Pil, J. Goris, L. Herman, P. de Vos, N. A. Logan, and M. Heyndricks.** 2004. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:885–891.
409. **Shikora, A., A. Carreri, E. Charpentier, H. Hirt, and D. M. Ojcius.** 2008. The Dark Side of the Salad: *Salmonella typhimurium* Overcomes the Innate Immune Response of *Arabidopsis thaliana* and Shows an Endopathogenic Lifestyle. *PLoS ONE* 3:e2279.
410. **Schleifer, K. H., and W. E. Kloos.** 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25:50–61.
411. **Schmidhalter, U.** 2011. N-Düngung – Präzisionsdüngung und Gießkannenprinzip. Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften.
412. **Schmidt, M. W., J. O. Skjemstad, and C. Jäger.** 2002. Carbon isotope geochemistry and nanomorphology of soil black carbon: Black chernozemic soils in central Europe originate from ancient biomass burning. *Global Biogeochemical Cycles* 16.
413. **Schneider, N.** 2011. Entwicklung von Nachweismethoden für Lysozym und Nisin in Milchprodukten. Dissertation. Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg.
414. **Schneider-Götz, N., H. Pfeidler, M. Elsässer, and M. Breuer (ed.).** 2011. Leitfaden zur Düngung. Landwirtschaftliches Technologiezentrum, Karlsruhe.
415. **Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and Dean D.H.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:775–806.
416. **Schnug, E., and S. Haneklaus.** 2008. Dispersion of uranium in the environment by fertilization. *In* B. J. Merkel (ed.), *Uranium, Mining and Hydrogeology*. Springer-Verlag. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
417. **Schultheiß, U., H. Döhler, and M. Schwab.** 2010. Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft – jährliche. *Landtechnik* 65.
418. **SCOTT, M.** 1968. The Pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* (Griffin) in Sea and Brackish Waters. *Journal of General Microbiology* 50:321–327.
419. **Seamster, A. P.** 1958. Developmental Studies Concerning the Eggs of *Ascaris lubricoides* var. *suum*. *The American Midland Naturalist* 43.
420. **Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult.** 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *CLIN INFECT DIS* 49:543–551.
421. **Sherrat, A. (ed.).** 1981. *Plough and pastoralism: aspects of the secondary products revolution*. University Press, Cambridge.
422. **Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki, and K. Komagata.** 1996. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:939–946.
423. **Shimizu, T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara, and H. Hayashi.** 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:996–1001.
424. **Shittu, A.** 2004. Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *Journal of Medical Microbiology* 53:51–55.
425. **Shivaji, S.** 2005. *Bacillus arsenicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from a siderite concretion in West Bengal, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1123–1127.
426. **Simmon, K. E., S. Mirrett, L. B. Reller, and C. A. Petti.** 2008. Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 46:1596–1601.
427. **Skjemstad, J. O., P. Clarke, J. A. Taylor, J. M. Oades, and S. G. McClure.** 1996. The chemistry and nature of protected carbon in soil. *Australian Journal of Soil Research*.
428. **Slepecky, R. A., and E. H. Hemphill.** 1992. The Genus *Bacillus* - Nonmedical, p. 1663–1696. *In* A. Balows, H. G. Trüpf, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
429. **Sleutel, S., S. de Neve, and G. Hofman.** 2003. Estimates of carbon stock changes in Belgian cropland. *Soil Use and Management* 19 pp. 166–171.
430. **Smith, L. D.** 1975. Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. *Applied microbiology* 30:319–323.
431. **Smith, L. D.** 1992. The Genus *Clostridium*—Medical, p. 1867–1878. *In* A. Balows, H. G. Trüpf, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer, 2nd ed. Springer, New York, NY, Berlin, Heidelberg.
432. **Smith, N. J.** 1980. Anthrosols and Human Carrying Capacity in Amazonia. *Annals of the Association of American Geographers* 70.
433. **Sobel, J. D., J. Vazquez, M. Lynch, C. Meriwether, and M. J. Zervos.** 1993. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical Infectious Diseases* 16:93–99.
434. **Sommer, S. G.** 2001. Effect of composting on nutrient loss and nitrogen availability of cattle deep litter. *European Journal of Agronomy* 14.
435. **Song, Y., C. Liu, D. R. Molitoris, T. J. Tomzynski, P. A. Lawson, M. D. Collins, and S. M. Finegold.** 2003. *Clostridium bolteae* sp. nov., Isolated from Human Sources. *Systematic and Applied Microbiology* 26:84–89.

436. **Songer, G. J.** 2010. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*.
437. **Sorme, L., and R. Lagerkvist.** 2002. Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *The Science of The Total Environment* **298**:131–145.
438. **Ständer, N. M.** 2007. Untersuchungen zum Einfluss von neurotoxinhaltigen Kulturüberständen der *Clostridium botulinum* Toxovare A bis G auf eukaryote Degradierungssysteme am Modellorganismus *Tetrahymena pyriformis* GL. Inaugural-Dissertation. Universität Leipzig, Leipzig.
439. **Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff.** 1966. The aerobic pseudomonads a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **43**:159–271.
440. **Steiner, C., W. G. Teixeira, J. Lehmann, T. Nehls, J. L. Vasconcelos de Macêdo, W. E. Blum, and W. Zech.** 2007. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. *Plant and Soil* **291**.
441. **Steiner, C., W. G. Teixeira, W. I. Woods, and W. Zech.** 2009. Indigenous Knowledge About Terra Preta Formation. In W. I. Woods, W. G. Teixeira, J. Lehmann, C. Steiner, A. M. WinklerPrins, and L. Rebellato (ed.), *Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision*. Springer Science. Springer Science.
442. **Stenfors, L. P., R. Mayr, S. Scherer, and P. E. Granum.** 2002. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiology Letters* **215**:47–51.
443. **Streit, W. R., and R. A. Schmitz.** 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* **7**:492–498.
444. **Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J.-J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins, and J. Doré.** 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4799–4807.
445. **Sugiyama, H.** 1951. STUDIES ON FACTORS AFFECTING THE HEAT RESISTANCE OF SPORES OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM. *Journal of bacteriology* **62**:81–96.
446. **Svec, P.** 2005. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:2183–2187.
447. **Szewzyk, U., R. Szewzyk, and T. A. Stenström.** 1993. Growth and survival of *Serratia marcescens* under aerobic and anaerobic conditions in the presence of materials from blood bags. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:1826–1830.
448. **Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews* **40**:722.
449. **Tahara, T., and K. Kanatani.** 1997. Isolation and partial characterization of *crispacin A*, a cell-associated bacteriocin produced by *Lactobacillus crispatus* JCM 2009. *FEMS Microbiology Letters* **147**:287–290.
450. **Tahara, T., S. Yoshioka, R. Utsumi, and K. Kanatani.** 1997. Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* JCM 2124. *FEMS Microbiology Letters* **148**:97–100.
451. **Tanasupawat, S., S. Sukontasing, and J.-S. Lee.** 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:1630–1634.
452. **Taubenberger, J. K., A. H. Reid, R. M. Lourens, R. Wang, G. Jin, and T. G. Fanning.** 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* **437**:889–893.
453. **Taylor, J. M., A. D. Sutherland, K. E. Aidoo, and N. A. Logan.** 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters* **242**:313–317.
454. **Thies, K.** 2003. Tiergesundheit und seuchenhygienische Aspekte bei extensiver Schweinefreilandhaltung im Rahmen der Landschaftspflege. INAUGURAL-DISSERTATION, Hannover.
455. **Thota, V. R., S. Dacha, A. Natarajan, and J. Nerad.** 2011. *Eggerthella lenta* bacteremia in a Crohn's disease patient after ileocecal resection. *Future Microbiology* **6**:595–597.
456. **Tilman, D., P. B. Reich, and Knops, Johannes M H.** 2006. Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature* **441**:629–632.
457. **Tinner, W., M. Conedera, B. Ammann, and A. F. Lotter.** 2005. Fire ecology north and south of the Alps since the last ice age. *The Holocene* **15** S. 1214 - 1226.
458. **Tiquia, S. M., T. L. Richard, and M. S. Honeyman.** 2002. Carbon, nutrient, and mass loss during composting. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **62**.
459. **Toba, T., E. Yoshioka, and T. Itoh.** 1991. Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett Appl Microbiol* **12**:43–45.
460. **Todorov, S., and L. Dicks.** 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* **36**:318–326.
461. **Tombolini, R., D. J. van der Gaag, B. Gerhardson, and J. K. Jansson.** 1999. Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3674–3680.
462. **Tränkner, G.** 1968. Taschenbuch Maschinenbau in 3 Bänden. Band 3/II: Stoffumformung., vol. 2. Verlag Technik, Berlin.
463. **Tria Terra.** Geschichte und Theorie der Terra Preta.
464. **Tsakamura, M.** 1984. The "non-pathogenic" species of mycobacteria: their distribution and ecology in non-living reservoirs. The Mycobacteria (Kubica, GP and Wayne, LG, Eds.):1339–1359.
465. **Tullis, R. H., and H. Rubin.** 1980. Calcium protects DNase I from proteinase K: A new method for the removal of contaminating RNase from DNase I. *Analytical Biochemistry* **107**:260–264.
466. **Tumpey, T. M.** 2005. Characterization of the Reconstructed 1918 Spanish Influenza Pandemic Virus. *Science* **310**:77–80.
467. **Tuomela, M.** 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* **72**:169–183.
468. **Tyler, H. L., and E. W. Triplett.** 2008. Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**:53–73.
469. **Tzelepi, E., P. Giakkoupi, D. Sofianou, V. Loukova, A. Kemeroglou, and A. Tsakris.** 2000. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:542–546.
470. **Valenstein, P., G. H. Bardy, C. C. Cox, and P. Zwadyk.** 1983. *Pseudomonas alcaligenes* endocarditis. *American journal of clinical pathology* **79**:245.
471. **van Netten, P., J. H. i. t. Veld, and D. Mossel.** 1994. The immediate bactericidal effect of lactic acid on meat-borne pathogens. *J Appl Microbiol* **77**:490–496.
472. **van Reenen, Dicks, and Chikindas.** 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* **84**:1131–1137.
473. **van Schaik, W., J. Top, D. R. Riley, J. Boekhorst, J. E. P. Vrijenhoek, C. M. E. Schapendonk, A. P. A. Hendrickx, I. J. Nijman, M. J. M. Bonten, H. Tettelin, and R. J. L. Willems.** 2010. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* **11**:239.

474. **Vandenbergh, P. A.** 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*.
475. **Vankerckhoven, V., T. van Autgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes, and H. Goossens.** 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:4473–4479.
476. **Vary, P. S.** 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* **140**:1001–1013.
477. **Veith, B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, rg, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, Bäuml, S. umer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, and G. Gottschalk.** 2004. The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**:204–211.
478. **Verheijen, F., S. Jeffery, A. Bastos, van der Velde, M., and I. Diafas.** 2009. Biochar Application to Soils A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes and Functions. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
479. **Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy, H. Meugnier, M. Bes, Y. Lasne, F. Fiedler, J. Etienne, and J. Freney.** 2000. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:1521–1527.
480. **Vogel, C.** 1860. *Der Guano*. Schotte u. Cp., Berlin [u.a.].
481. **Vries, M. C. de, E. E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* **16**:1018–1028.
482. **Vuyst, L. de, R. Callewaert, and K. Crabbe.** 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* **142**:817–827.
483. **Wada, T., M. Noda, F. Kashiwabara, H. J. Jeon, A. Shirakawa, H. Yabu, Y. Matoba, T. Kumagai, and M. Sugiyama.** 2009. Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**:1726–1737.
484. **Wade, J. C.** 1982. *Staphylococcus epidermidis*: An Increasing Cause of Infection in Patients with Granulocytopenia. *Ann Intern Med* **97**:503.
485. **Wagner, M., and A. Loy.** 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:218–227.
486. **Walter, R.** 2000. *Umweltvirologie*. Viren in Wasser und Boden. Springer, New York.
487. **Walther, B. A., and P. W. Ewald.** 1999. Pathogen survival in the external environment and the evolution of virulence. *Biol. Rev.* **79**:849–869.
488. **Watanabe, K., Y. Kodama, and S. Harayama.** 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods* **44**:253–262.
489. **Weems, J. J.** 1992. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, Pathogenicity, Clinical Manifestations, and Antimicrobial Susceptibility. *Clinical Infectious Diseases* **14**:756–766.
490. **Weese, J., M. Archambault, H. Dick, P. Hearn, B. Kreiswirth, B. Said-Salim, A. McGeer, Y. Likhoshvay, J. Prescott, and D. Low.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Horses and Horse Personnel, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:430–435.
491. **Weiland, P.** 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:849–860.
492. **Wellinger, A.** 1991. *Biogas-Handbuch*. Grundlagen - Planung - Betrieb landwirtschaftlicher Anlagen, 2nd ed. Wirz, Aarau.
493. **Wiegel, J., R. Tanner, and F. A. Rainey.** 2006. An Introduction to the Family Clostridiaceae, p. 654–678. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer US, New York, NY.
494. **Wilkinson, J., K. Bolsen, and C. Lin.** 2003. History of Silage, p. 1–30. *In* D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (ed.), *Silage science and technology*. American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America. American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, Madison, Wis.
495. **Wintzingerode, F. von, U. B. Göbel, and E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**:213–229.
496. **Witt, J., C. Henning, N. Rensberg, A. Schwenker, M. Scheffelowitz, and et.al.** 24.08.2010, posting date. Monitoring zur Wirkung des Erneuerbare-Energie-Gesetz (EEG) auf die Entwicklung der Stromerzeugung aus Biomasse. http://www.stromeffizienz.de/page/fileadmin/biogas/Downloads/Studien/DBFZ_Stromerzeugung_aus_Biomasse_3_Zwischenbericht_Kapitel_1-5_fuer_Veroeffentlichung_final.pdf.
497. **Woo, J.-H., and Y.-C. Song.** 2010. Biohydrogen production from sewage sludge using a continuous hydrogen fermentation system with a heat treatment vessel. *KSCE J Civ Eng* **14**:673–679.
498. **Xing, P., L. Guo, W. Tian, and Q. L. Wu.** 2010. Novel *Clostridium* populations involved in the anaerobic degradation of *Microcystis* blooms. *ISME J* **5**:792–800.
499. **Xiong, T., Q. Guan, S. Song, M. Hao, and M. Xie.** 2012. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food Control* **26**:178–181.
500. **Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa.** 1991. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology* **36**:1251–1275.
501. **Yıldırım, Z., Y. K. Avcı, ar, and M. Yıldırım.** 2002. Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactocobacillus buchneri*. *Microbiological Research* **157**:103–107.
502. **Yoh, M.** 2005. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* **54**:1077–1082.
503. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh.** 2009. Characterization of a New Metallo- -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**:5046–5054.
504. **Yu, V. L.** 1979. *Serratia marcescens*. *N Engl J Med* **300**:887–893.
505. **Zhang, H., H. Wan, L. Song, H. Jiang, H. Wang, and C. Qiao.** 2010. Development of an autofluorescent *Pseudomonas nitroreducens* with dehydrochlorinase activity for efficient mineralization of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH). *Journal of Biotechnology* **146**:114–119.
506. **Zhang, L., S. Danon, M. Grehan, A. Lee, and H. Mitchell.** 2005. Template DNA Ratio can Affect Detection by Genus-Specific PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of Bacteria Present at Low Abundance in Mixed Populations. *Helicobacter* **10**:80–82.
507. **Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller.** 2000. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology* **7**:203–214.
508. **Zhu, W., W. Liu, and D. Wu.** 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasser* KT7. *J Appl Microbiol* **88**:877–886.

509. Zoetendal, E. g., A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos. 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* 64:3854–3859.
510. Zschocke, A. K. 2012. EM. Die Effektiven Mikroorganismen : Bakterien als Ursprung und Wegweiser alles Lebendigen. AT Verlag, Aarau.

Selbstständigkeitserklärung zur Dissertation

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel „Hygienisierung von Rindergülle und Klärschlämmen mittels milchsaurer Fermentation“, um eine von mir selbstständig verfasste Arbeit handelt. Ich erkläre zudem, dass ich die in der Dissertation verwendeten fremden Quellen, als solche kenntlich gemacht habe.

Leipzig den 17. November 2014

Dipl.-Biol. Hendrik A. Scheinemann