

Die Mikrobiota auf Larven der Schwarzen Soldatenfliege (*Hermetia illucens*; Diptera: Stratiomyidae)

Bachelorarbeit

eingereicht im Rahmen des Bachelorstudiums Biologie
an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck

Oberegger Simon Ernst

Matrikelnummer: 01517897

Lehrveranstaltung: Mikrobiologie – Grundübungen

Betreuerin: Mag. Dr. Sonnleitner Renate

Co-Betreuer: Univ. Prof. Dr. Heribert Insam,
Thomas Klammsteiner, M.Sc.

Innsbruck, 15. Juni 2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich den angegebenen Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre mich mit der Archivierung der vorliegenden Bachelorarbeit einverstanden.

15. Juni 2018

Datum

Oberegger Simon

Unterschrift

Danksagung

Danke

Herrn Univ. Prof. Dr. Heribert Insam für die Möglichkeit, meine Bachelorarbeit im Rahmen seiner Arbeitsgruppe am Institut für Mikrobiologie schreiben zu können.

Danke

Herrn Thomas Klammsteiner, M.Sc. für die hervorragende Betreuung meiner Bachelorarbeit, für seine Hilfsbereitschaft, seine Kollegialität, für die vielen hilfreichen Ratschläge und die Geduld sowie für sein großes Interesse an meiner Arbeit. Seine Fähigkeit mich zu motivieren und das freundliche Arbeitsklima haben maßgeblich zum Gelingen meiner Bachelorarbeit beigetragen.

Danke

Frau Carina Heussler, M.Sc. für die Einführung in die verschiedenen Arbeitsabläufe bei der Fliegenzucht.

Zusammenfassung

Viele wissenschaftliche Untersuchungen zeigen, dass Insekten beziehungsweise Insektenlarven eine sehr nährstoffreiche Nahrungsquelle sind. Im Zusammenhang mit der stetig steigenden Weltbevölkerung könnten sie über die Nutzbarmachung organischer Abfälle einen Ausweg aus dem drohenden Nahrungsmangel darstellen. In diesem Kontext stellte sich die Schwarze Soldatenfliege (*Hermetia illucens*, Diptera: Stratiomyidae) als sehr vielversprechend heraus. Die gezielte Zucht der Schwarzen Soldatenfliege hat das Potential, zwei Probleme gleichzeitig zu beheben: Zum einen kann den Soldatenfliegenlarven Bioabfall als Substrat verfüttert und dieser damit effizient ver- beziehungsweise aufgewertet werden, zum anderen können die Larven oder deren Inhaltsstoffe anschließend als Nahrungsmittel in der Futter- und Nahrungsmittelproduktion Einsatz finden.

Mikrobielle Gemeinschaften in den Verdauungssystemen von Insektenlarven sind bereits Gegenstand vieler wissenschaftlicher Studien – nur sehr wenig ist jedoch bisher über das Oberflächenmikrobiom von Insektenlarven bekannt. In dieser Arbeit haben wir uns näher mit der mikrobiellen Besiedelung der Oberfläche von Larven der Schwarzen Soldatenfliege auseinandergesetzt.

Die Anzucht der Soldatenfliegenlarven wurde mit drei unterschiedlichen Substraten durchgeführt (Hühnerfutter, Gras und Gemüse-Obst-Mischung). Durch die Verwendung unterschiedlicher Fütterungssubstrate sollten die Auswirkungen des Fütterungssubstrats auf die Mikrobiota der Larvenoberfläche erforscht werden. Das Oberflächenmikrobiom der Soldatenfliegenlarven wurde durch regelmäßiges Waschen von Larven, anschließender Inkubation der Waschlösungen und Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE x ml⁻¹) erfasst. Auch das Vorkommen potentiell

pathogener Keime (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*) wurde berücksichtigt. Im Zuge der Anzucht der Larven wurde weiteres Augenmerk auf das Larvenwachstum, die gebildete Larvenbiomasse sowie die Geschwindigkeit der larvalen Entwicklung in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat gelegt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich auch auf Larven der Schwarzen Soldatenfliege mikrobielle Gemeinschaften etablieren. Es konnte festgestellt werden, dass die Besiedelungsdichte und die Zusammensetzung der Mikrobiota von multiplen Faktoren wie zum Beispiel vom Fütterungssubstrat und vom Alter der Larven beeinflusst werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Soldatenfliegenlarven ihr Substrat sehr effizient verstoffwechseln und große Mengen der Stoffwechselleistung in den Aufbau von larvaler Biomasse leiten.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann gesagt werden, dass bei einer Anwendung der Larven der Schwarzen Soldatenfliege in der Futterbeziehungsweise Lebensmittelindustrie deren Oberflächenmikrobiom nicht außer Acht gelassen werden darf. Es bedarf – ganz im Gegenteil – einer genauen Überwachung und Kontrolle, um die Sicherheit von Mensch und Tier zu gewährleisten.

Abstract

Many scientific investigations have shown that insects, or rather their larvae, represent a highly nutritious source of food. In the light of the steadily increasing global population, insect larvae could constitute a solution for the imminent lack of food by making organic waste available. In this context the black soldier fly (*Hermetia illucens*, Diptera: Stratiomyidae) has proved to be very promising. The purposeful rearing of black soldier flies has the potential to solve two problems simultaneously. On the one hand, organic waste can be efficiently degraded and converted to insect biomass by black soldier fly larvae. On the other hand, the reared larvae can be used directly as foodstuff or – as an alternative – their biological contents can be employed in food and fodder production.

The microbial communities in digestive systems of insect larvae have been objects of many scientific studies – however very little is known about the microbial communities on the surface of insect larvae so far. The surface-microbiota of the black soldier fly larvae is subject of the present study.

The black soldier fly larvae were fed with three different substrates (chicken feed, grass cuttings and fruit-vegetables). By feeding the larvae with different substrates, the effects of these substrates on the larval surface-microbiota should be investigated. The microbial communities on the surface of the larvae were analyzed by washing the larvae at regular intervals, followed by the incubation of the washing-solutions and the calculation of the living bacterial count (cfu x ml⁻¹). In addition, the occurrence of potential pathogens (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*) was considered. During the process of rearing the black soldier fly larvae, larval growth, the yielded larval biomass and the velocity of larval development were observed, depending on the three different substrates.

The present study shows that the larvae of the black soldier fly possess a specific microbiome on their surface. Our results show, that the population density and the composition of this surface-microbiota are influenced by multiple factors such as the applied substrate and the age of the larvae. Furthermore, it could be proved that the larvae of the black soldier fly metabolize their substrates very efficiently and that they invest a remarkable amount of the gained energy in larval biomass.

Based on the results of this study it can be stated that if black soldier fly larvae are employed in food and fodder production, the microbial load on their surface must not be neglected. Careful monitoring is needed in order to guarantee the safety of consumer and animal health.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
2	Material und Methoden	13
2.1	Anzucht der Larven	13
2.2	Herstellung der unterschiedlichen Fütterungssubstrate	15
2.2.1	Hühnerfutter	15
2.2.2	Gras	16
2.2.3	Gemüse-Obst-Mischung.....	17
2.3	Fütterung der Larven.....	18
2.4	Bestimmung der Substratzusammensetzung für eine äquivalente Fütterung der Larven	19
2.5	Herstellung der verwendeten Nährmedien	19
2.6	Untersuchung der Mikrobiota auf den Larven – Waschen der Larven	22
2.7	Ausplattieren und Inkubation der Waschlösungen	24
2.8	Bestimmung der gebildeten Biomasse in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat.....	26
2.9	Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen	27
2.10	Colony PCR.....	28
2.11	Aufreinigung der PCR-Produkte	32
2.12	Sequenzierung	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Substratzusammensetzungen der unterschiedlichen Fütterungssubstrate.....	34
3.2	Fütterungsversuch	36
3.3	Die Mikrobiota auf Larven von <i>H. illucens</i>	42
3.4	Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen	45
3.5	Colony PCR.....	46
3.6	DNA-Sequenzierung – Identifikation der Reinkulturen	48

4	Diskussion	50
4.1	Fütterungsversuch	50
4.2	Die Mikrobiota auf Larven von <i>H. illucens</i>	54
4.3	Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen	56
4.4	DNA-Sequenzierung – Identifikation von Reinkulturen	57
5	Abbildungsverzeichnis	59
6	Tabellenverzeichnis	60
7	Literaturverzeichnis	61

1 Einleitung

Die Schwarze Soldatenfliege (*Hermetia illucens*) wird systematisch in die Familie der Waffenfliegen (Stratiomyidae), und somit in die Ordnung der Zweiflügler (*Diptera*) eingereiht. Heimisch ist diese Art in tropischen und subtropischen Gebieten wie zum Beispiel in Südamerika (Oliveira et al., 2015). Der Lebenszyklus der Schwarzen Soldatenfliege verläuft relativ schnell und ist unter Laborbedingungen bei 27 °C innerhalb von 40 bis 43 Tagen abgeschlossen (Tomberlin et al., 2002). In der Natur pflanzen sich adulte Fliegen in der Nähe geeigneter Nahrungsquellen fort und legen in diesen Substraten auch ihre Eier ab. Das Habitat von Soldatenfliegenlarven stellen biologische Materialien – pflanzliche wie auch tierische – dar (Diener et al., 2011; Čičková et al., 2015; Clariza Samayoa et al., 2016). Die Larven fressen große Mengen an Substrat (Čičková et al., 2015) und investieren einen Großteil der gewonnenen Energie in den Aufbau von Biomasse (Diener et al., 2009).

Im Gegensatz zu den Hausfliegen (*Musca domestica*) besitzen adulte Schwarze Soldatenfliegen keine Mundwerkzeuge mehr und sind deshalb auch zu keiner Nahrungsaufnahme mehr fähig (Oliveira et al., 2015). Im Vergleich zu Hausfliegen sind Schwarze Soldatenfliegen in ihrem Verhalten sehr passiv und neigen dazu, auf Vegetation und dergleichen zu ruhen und suchen nicht die Nähe zum Menschen (Čičková et al., 2015). Versuche zeigten, dass die Hausfliege durch die Gegenwart der Schwarzen Soldatenfliege in ihrer Vermehrung inhibiert wird und dadurch eine geringere Anzahl an Larven hervorbringt. Die Schwarze Soldatenfliege könnte somit der biologischen Kontrolle von Hausfliegen dienen (Čičková et al., 2015).

Im adulten Stadium zehrt die Schwarze Soldatenfliege nur mehr von den Nährstoffreserven, die sie sich als Larve angefressen hat. Die Präpuppen

bestehen aus bis zu 40 % Protein- und 30 % Fettanteil und weisen damit sehr gute Nährwerte auf (Newton et al., 1977; St-Hilaire et al., 2007; Spranghers et al., 2017). Die Schwarze Soldatenfliege besitzt somit enormes Potential – sowohl in der Prozessierung und Verwertung von Bioabfällen wie auch in ihrer Verwendung als Futter- oder Lebensmittel (Čičková et al., 2015; Pastor et al., 2015).

Mikroorganismen sind allgegenwärtig. Auch Insektenlarven stellen ein Habitat für Mikroorganismen – Bakterien und Pilze, aber auch Viren – dar. Sollten die Larven von *H. illucens*, wie auch andere Insekten, sich als menschliches Nahrungsmittel etablieren, muss der Aspekt der mikrobiellen Besiedelung berücksichtigt werden. Die Larven besitzen, wie der Mensch und andere Tiere, unter anderem ein Oberflächen- (Hautmikrobiom) wie auch ein Darmmikrobiom. Die Besiedelung durch potentiell humanpathogene Mikroorganismen kann Larven zu Vektoren für Krankheiten verwandeln (Schäfer et al., 2016). Bei der Verwendung von Insektenlarven als Nahrungsmittel würde es deshalb genauer Regelungen und Kontrollen bedürfen, um eine Gefährdung der Konsumenten zu vermeiden. Erste Entwicklungen im Rahmen von EU-Verordnungen sind bereits im Gange (Europäische Union, 2015).

Bisherige mikrobielle Untersuchungen von Insektenlarven beschränken sich zumeist auf deren Darmmikrobiom und nur wenige beschäftigten sich mit der oberflächenständigen Mikrobiota. Das Interesse an mikrobiellen Gemeinschaften im Larvendarm ist dadurch bedingt, dass die Fähigkeit von Insektenlarven, große Mengen an Substrat effektiv zu verwerten, unter anderem mit den Mikroorganismen im Darm assoziiert ist. Im Vergleich dazu spielen die Mikroorganismen auf der Larvenoberfläche nur eine untergeordnete Rolle. Nichtsdestotrotz darf die Oberflächenmikrobiota keinesfalls außer Acht gelassen werden.

Die Schwarze Soldatenfliege kann aber noch mehr: Durch ihre Fähigkeit zur Produktion antibakterieller Peptide können Extrakte aus Soldatenfliegenlarven wirksam gegen phytopathogene Erreger eingesetzt werden (Park et al., 2015). Elhag et al. (2017) konnten einige der Gene, welche für antimikrobielle Peptide codieren, identifizieren. Weiterführende Versuche zeigten, dass manche dieser Peptide effizient gegen mehrere pathogene Mikroorganismen wie zum Beispiel grampositiven *Staphylococcus aureus* und gramnegative *E. coli*, sowie auch verschiedene Pilze (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*) wirken (Elhag et al., 2017).

2 Material und Methoden

2.1 Anzucht der Larven

Die Larven von *H. illucens*, die für die Durchführung des Versuchs benötigt wurden, mussten angezchtet werden. Eier wurden vom Institut für Mikrobiologie der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, das bereits eine bestehende Zucht von *H. illucens* besitzt, zur Verfügung gestellt. Die Fliegenpopulation wird am Institut in einem Klimaschrank (Fitotron® SGC 120, Weiss Technik®, Heuchelheim, Deutschland) bei 27 °C und 60 % Feuchtigkeit gezüchtet und gehalten. Für die Simulation des Tag-Nacht-Zyklus, der essentiell für die Paarung von *H. illucens* ist, werden LED-Lampen verwendet (Heussler et al., 2018). Die Larvenzucht für diesen Versuch erfolgt unter denselben Bedingungen.

Die Eier aus der bestehenden Fliegenpopulation wurden geerntet und in Plastikboxen (21,5 x 10,5 x 7 cm) überführt. In den Deckeln der Plastikboxen befinden sich Löcher (12,5 x 5,5 cm), die mit einem Fliegengitter (Maschenweite 2 mm) überklebt sind, durch welches eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet wird.

Die Plastikboxen wurden vorher gereinigt und mit 75 %-igem Ethanol desinfiziert. Als Einstreu wurde autoklavierter Pinienhumus in die Boxen gegeben, sodass die Böden der Plastikboxen zur Gänze bedeckt waren. In den ersten Tagen nach der Eierernte werden die Boxen täglich kontrolliert und die Eier immer wieder befeuchtet. Nachdem die jungen Larven aus den Eiern geschlüpft sind, werden diese mit einer Mischung aus gemahlenem Hühnerfutter und Wasser gefüttert. Die Homogenität, strukturelle Beschaffenheit und Nährwert zeichnen dieses Substrat als geeignetes Anzuchtfutter aus.

Die circa sechs bis neun Tage alten Larven wurden aus den Plastikboxen geerntet und händisch gezählt. Da zu wenige gleichaltrige Larven für den Ansatz des Versuchs vorhanden waren, wurden aus etwas älteren Larvenpopulationen (max. 4 Tage) die kleinsten Individuen ausgewählt und mit den anderen Larven gemischt, sodass für den Beginn des Versuchs 300 Larven zu Verfügung standen.

Für den Ansatz des eigentlichen Versuchs wurden nochmals gereinigte und mit 75 %-igem Ethanol desinfizierte Plastikboxen vorbereitet. In sechs Plastikboxen wurden jeweils circa 20 g autoklavierter Pinienhumus zugegeben und in jede der sechs Boxen 50 Larven überführt (vgl. Tabelle 1). Der Tag des Versuchsansatzes wird in weiterer Folge als Tag 0 angenommen.

Tabelle 1: Übersicht – Vorbereitung der einzelnen Larvenboxen für die weitere Larvenzucht

Box	Pinienhumus [g]	Anzahl der Larven	Fütterungs-substrat
1	20,12	50	Hühnerfutter
2	19,95	50	Hühnerfutter
3	20,04	50	Gras
4	19,99	50	Gras
5	20,56	50	Gemüse-Obst
6	20,27	50	Gemüse-Obst

Ab dem Zeitpunkt der Aufteilung der Larven auf die sechs Plastikboxen erfolgte die Fütterung unterschiedlich, je Fütterungssubstrat in zwei Parallelen.

2.2 Herstellung der unterschiedlichen Fütterungssubstrate

Für die Aufzucht der Larven wurden drei unterschiedliche Fütterungssubstrate verwendet:

- Hühnerfutter
- Gras
- Gemüse-Obst-Mischung

2.2.1 Hühnerfutter

Das pelletierte Hühnerfutter (Grünes Legekorn Premium, Unser Lagerhaus WHG, Innsbruck, Österreich), das als Standardsubstrat für die Soldatenfliegenpopulation dient, wird vor weiterer Verwendung gemahlen (Fidibus Getreidemühle, Komo Mühlen, Österreich).

Aufgrund des geringen Wassergehaltes und um die Aufnahme durch die Larven zu erleichtern, wird das gemahlene Hühnerfutter im Verhältnis 40:60 mit Wasser gemischt (Diener et al., 2009).

Die Mischungen aus gemahlenem Hühnerfutter und Wasser werden bei jeder Fütterung neu angesetzt und anschließend gleich verfüttert.

2.2.2 Gras

Das für die Fütterung verwendete Gras wurde im Gemeindegebiet der Gemeinde Dölsach in Osttirol in der Nähe von Mauern und unter Vordächern gesammelt.

Um eine gleichmäßige Nährstoffverteilung und die Aufnahme durch die Larven zu erleichtern, wurde das gesammelte Gras mittels Küchenmixer homogenisiert (Total Nutrition Center®, Vitamix, Berlin, Deutschland). Die direkte Zerkleinerung des Grasses mit dem Küchenmixer war aufgrund der fasrigen Struktur nicht möglich. Vor Zugabe in den Mixer musste es mit einer Schere in ca. 0,5 bis 1 cm große Stücke geschnitten werden.

Das Gras war zudem relativ trocken, weshalb es nötig war, beim Mixvorgang Wasser beizumischen. Das fertig hergestellte Fütterungssubstrat setzte sich aus 38 % Grasschnitt und 62 % zugesetztem Wasser zusammen.

Das hergestellte Fütterungssubstrat (insgesamt 398 g) wurde in eine Plastikbox gefüllt und anschließend bei -20 °C bis zum Gebrauch eingefroren (vgl. Abbildung 1).

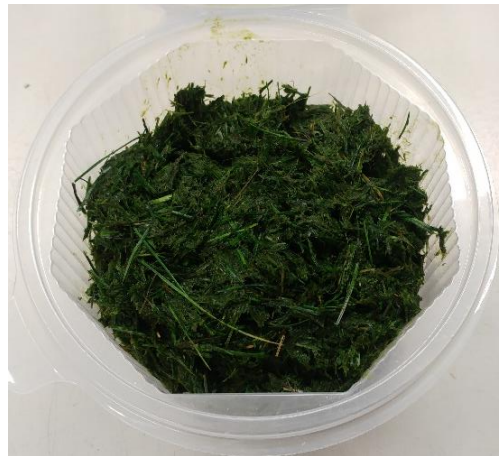


Abbildung 1: Fütterungssubstrat Gras (Grasschnitt, gemischt mit Wasser)

2.2.3 Gemüse-Obst-Mischung

Für die Herstellung des Fütterungssubstrats Gemüse-Obst-Mischung wurden die benötigten Zutaten im Supermarkt gekauft. Für das Fütterungssubstrat verwendet wurde:

- Salatgurke (*Cucumis sativus*)
- Tomate (*Solanum lycopersicum*)
- Apfel (*Malus domestica*)
- Orange (*Citrus sinensis*)

Die einzelnen Zutaten wurden zu Beginn gründlich gewaschen. Bei den Tomaten beziehungsweise Äpfeln wurden die grünen beziehungsweise verholzten Teile (Strunk) entfernt, die Orangen wurden zur Gänze geschält (vgl. Abbildung 2).



Abbildung 2: Zutaten für das Fütterungssubstrat Gemüse-Obst-Mischung

Wie auch bei der Herstellung des Gras-Fütterungssubstrats wurden die einzelnen Zutaten grob zerkleinert und anschließend im Küchenmixer (Total Nutrition Center®, Vitamix, Berlin, Deutschland) homogenisiert. Aufgrund des hohen Wassergehaltes der einzelnen Zutaten war es bei diesem Fütterungssubstrat nicht nötig, Wasser beizumengen.

Analog zur Auflistung der Zutaten für das Fütterungssubstrat ergibt sich eine Zusammensetzung im Verhältnis von 0,5:1:1:1 (Salatgurke, Tomate, Apfel, Orange).

Das hergestellte Fütterungssubstrat (insgesamt 2 kg) wurde auf vier Plastikboxen portioniert und ebenfalls bei -20 °C, bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.3 Fütterung der Larven

Da sich die einzelnen Fütterungssubstrate hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihres Nährstoffgehaltes teils stark unterscheiden, wird für die Zucht eine äquivalente Fütterung der Fliegenlarven angestrebt, sodass die Entwicklung der Larven sowie die gebildete Biomasse miteinander vergleichbar sind.

Diener et al. (2009) stellten fest, dass eine Fütterungsrate von 100 mg pro Larve pro Tag mit dem Substrat Hühnerfutter (40:60 mit Wasser gemischt) einen optimalen Trade-off in der Kosten-Nutzen-Effizienz bei der Anzucht von *H. illucens* darstellt.

Bei allen drei Fütterungssubstraten wird dieselbe Menge an organischer Substanz verfüttert. Zusätzlich zur verfütterten Organik wird auch der Wassergehalt der Fütterungssubstrate berücksichtigt. Bei der Fütterung mit allen drei Substraten soll den Fliegenlarven schlussendlich immer dieselbe Menge an Organik sowie an Wasser zugeführt werden.

2.4 Bestimmung der Substratzusammensetzung für eine äquivalente Fütterung der Larven

Um die Fütterung der Fliegenlarven, unabhängig vom Fütterungssubstrat, mit derselben Menge an organischer Substanz durchführen zu können, ist die Bestimmung der Substratzusammensetzung nötig.

Die Bestimmung der Substratzusammensetzung umfasst einerseits die Analyse der Trockenmasse wie auch die Analyse der organischen und anorganischen Bestandteile des Fütterungssubstrats.

Für die Bestimmung der Trockenmasse werden je Fütterungssubstrat circa 5 g Frischmasse eingewogen. Die Proben der Frischmassen werden bei 105 °C, 50 % Lüfteransteuerung für 24 Stunden im Trockenschrank (UF 110, Memmert, Schwabach, Deutschland) getrocknet.

Anschließend wird die Bestimmung der Zusammensetzung der Fütterungssubstrate – organische und anorganische Bestandteile – durchgeführt. Die Bestimmung der Organik beziehungsweise Anorganik der Substrate erfolgt durch Veraschung der Proben (CWF 1100, Carbolite Gero, Neuhausen, Deutschland) bei 550 °C für 5 Stunden (Bisutti et al., 2004).

2.5 Herstellung der verwendeten Nährmedien

Für das Ausplattieren der Waschlösungen von Fliegenlarven wurden ein Standardnährmedium und Selektiv- beziehungsweise Differenzialnährmedien verwendet.

Bei dem Standardnährmedium handelt es sich um ein Vollmedium, mit dem möglichst die gesamte kultivierbare Mikrobiota auf der Oberfläche der Fliegenlarven zur Abschätzung der Keimdichte erfasst werden soll.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung – Standardmedium

Standardmedium	
Pepton aus Fleisch	5,00 g
Hefeextrakt (granuliert)	2,50 g
Glukose	1,00 g
Agar	15,00 g
Aqua deion.	1000 ml
pH bei 25 °C auf pH = 7 einstellen	

Die Einwaage der Bestandteile des Nährmediums erfolgte entsprechend der Rezeptur in Tabelle 2. Der pH-Wert des Mediums wird mittels Natronlauge (NaOH) beziehungsweise Salzsäure (HCl) bei 25 °C auf pH = 7 eingestellt. Das Standardnährmedium wird durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend, nach Abkühlung auf eine Temperatur von circa 55 °C, in ebenfalls sterile Petrischalen gegossen. Die Nährböden wurden mit je circa 20 ml Nährmedium pro Petrischalen gegossen.

Zusätzlich zum Standardmedium wurden zwei Selektiv- beziehungsweise Differenzialnährmedien verwendet. Von Interesse war das Vorkommen von potentiellen Pathogenen – insbesondere ein Vorkommen von *E. coli* und anderen coliformen Bakterien, sowie eine etwaige Belastung mit Salmonellen.

Für den Nachweis von *E. coli* und anderen coliformen Bakterien wird Chromocult® Coliformen Agar ES (Enhanced Selectivity) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als selektives Differenzialnährmedium verwendet. Die Herstellung des Mediums erfolgte laut Gebrauchsanweisung der Herstellerfirma (Merck KGaA, 2007). Nach Einwaage der entsprechenden

Menge an Fertignährmedium (34,50 g pro Liter) wird dieses mit der notwendigen Menge an Aqua deion. aufgefüllt. Unter regelmäßigem Schwenken wurde das Nährmedium im kochenden Wasserbad bis zum kompletten Lösen erhitzt. Anschließend muss auch dieses Nährmedium auf eine Temperatur von circa 55 °C abgekühlt werden, um in sterile Petrischalen gegossen werden zu können. Der Abkühlprozess darf nicht zu lange dauern, da ansonsten einzelne Bestandteile ausfallen könnten. Um den Abkühlprozess zu beschleunigen, wurde das Nährmedium unter ständigem Schwenken in ein 55 °C warmes Wasserbad gestellt.

Die Menge an Chromocult®-Nährmedium pro Petrischale betrug circa 15 ml. Kolonien von *E. coli* wachsen auf Chromocult®-Nährmedium mit einer violett-blauen Farbe heran und können dadurch von rosarotgefärbten anderen coliformen Bakterien und weißen anderen gramnegativen Bakterien unterschieden werden (vgl. Abbildung 3). Die genauen Informationen sind dem Manual der Herstellerfirma zu entnehmen (Merck KGaA, 2007).

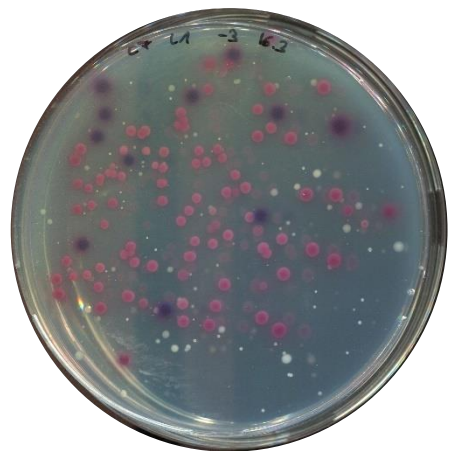


Abbildung 3: Foto einer Agarplatte mit Chromocult®-Nährmedium.

Unterschiedliche Farben der Kolonien: *E. coli* violett, anderer coliforme Bakterien rosarot, andere gramnegative Bakterien weiß

Für den Nachweis einer etwaigen Belastung mit Salmonellen wurde XLT4 Agar verwendet. Hierbei handelt es sich um ein selektives Differenzialnährmedium für *Salmonella spp.* Die Herstellung des Mediums erfolgte laut Gebrauchsanweisung der Herstellungsfirma (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Nach der Einwaage der entsprechenden Menge an Fertignährmedium XLT4-Agar Basis (59,0 g pro Liter) und der Zugabe der

entsprechenden Menge an XLT4-Supplementlösung (4,6 ml pro Liter) wird dieses mit der entsprechenden Menge an Aqua deion. aufgefüllt. Unter regelmäßigem Schwenken wird das Nährmedium bis zum kompletten Lösen im kochenden Wasserbad aufgeköcht. Der Abkühlprozess wurde auch hier mit Hilfe eines circa 55 °C warmen Wasserbades beschleunigt. Die Menge an Nährmedium pro Petrischale betrug circa 20 ml. *Salmonella spp.* zeigen auf diesem Nährmedium gutes Wachstum und sind als Kolonien mit schwarzem Zentrum zu erkennen. Die genauen Informationen sind dem Manual der Herstellerfirma zu entnehmen (Merck KGaA, 2007).

2.6 Untersuchung der Mikrobiota auf den Larven – Waschen der Larven

Zu jedem Beprobungszeitpunkt der Fliegenlarven (jeweils Montag, Mittwoch und Freitag) werden aus jeder Box je zwei Larven entnommen (pro Beprobung 12 Larven). Die Entnahme der Larven erfolgt mit einer mit 75 %-igem Ethanol desinfizierten Pinzette. Da auf den Larven Pinienhumus und auch Fütterungssubstrat anhaftete, wurden diese mit einem desinfizierten Pinsel vorsichtig von groben Verschmutzungen befreit und in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben.

Die Fliegenlarven verunreinigten die 1,5 ml Eppendorfgefäße sehr häufig mit ihren Fäkalien. Sie wurden deshalb bei Bedarf nochmals in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach der Probennahme und Bestimmung des Frischgewichts werden die Fliegenlarven zur Betäubung für circa eine halbe Stunde bei -20 °C eingefroren.

Die Gewinnung der Bakteriensuspension von der Oberfläche von Fliegenlarven (Waschung) wird unter dem Laminar Flow und nacheinander durchgeführt, sodass die Behandlung bei allen Proben gleich erfolgt.

Zur Larve im 1,5 ml Eppendorfgefäß wird mit der Kolbenhubpipette 1 ml steriles Aqua dest. hinzugegeben. Das 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Fliegenlarve und sterilem Aqua dest. wird für eine Dauer von 30 Sekunden bei mittlerer Stufe gevortext. Dieser Schritt entspricht dem Waschen der Fliegenlarve. Nach dem Vortexen wird die Larve mit einer Pinzette, die zuvor in der Flamme des Bunsenbrenners sterilisiert wurde, aus der Waschlösung entfernt. Mit der Waschlösung wird eine Verdünnungsreihe (je 1:10 auf 1 ml Gesamtvolumen) erstellt. Von der Verdünnungsreihe je Fliegenlarve werden bestimmte Verdünnungsstufen für das Ausplattieren auf den unterschiedlichen Nährmedien verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} erstellt.

Eine Aufstellung des Arbeitsablaufes der Waschungen der Fliegenlarven ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Arbeitsablauf – Waschen der Larven

Schritt 1	Entnahme der Fliegenlarve aus der Box (mit desinfizierter Pinzette)
Schritt 2	Entfernung von etwaigen groben Verschmutzungen (mit desinfiziertem Pinsel)
Schritt 3	Überführen der Fliegenlarve in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß
Schritt 4	Einfrieren der Fliegenlarven bei -20 °C für circa 30 Minuten
Schritt 5	Zugabe von 1 ml sterilem Aqua dest. zur Fliegenlarve
Schritt 6	Waschen der Larve – 30 Sekunden lang bei mittlerer Stufe vortexen
Schritt 7	Entfernen der Fliegenlarve aus der Waschlösung (mit abgeflammter Pinzette)
Schritt 8	Erstellen einer Verdünnungsreihe
Schritt 9	Ausplattieren der geeigneten Verdünnungsstufen

2.7 Ausplattieren und Inkubation der Waschlösungen

Je Beprobung wurden für alle Fliegenlarven je vier Agarplatten ausplattiert:

- 2 Standardmedium
- 1 Chromocult®
- 1 XLT4

Für das Ausplattieren der Waschlösung beziehungsweise deren Verdünnungsstufen wurde ein Volumen von 50 µl festgelegt. Die ausplattierten Verdünnungsstufen mussten der zunehmenden Anzahl an Mikroorganismen auf der Oberfläche der Larven angepasst werden.

Die bei den einzelnen Beprobungen ausplattierten Verdünnungsstufen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Übersicht – Beprobungszeitpunkte und ausplattierte Verdünnungsstufen

	Tag	Standardmedium		Chromocult®	XLT4
Beprobung 1	5	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-1}
Beprobung 2	7	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-1}
Beprobung 3	9	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-2}
Beprobung 4	12	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-2}
Beprobung 5	14	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-2}
Beprobung 6	16	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-2}

Je 50 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe werden auf die Agarplatte pipettiert und mit einem Drigalskispatel, der zuvor in 96 %-iges Ethanol getaucht und abgeflammt wurde, ausgespatelt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Anzucht der Fliegen bei einer Temperatur von 27 °C erfolgt, wurden die Agarplatten mit dem Standardmedium in einem verfügbaren Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 28 °C inkubiert.

Laut Angaben des Herstellers müssen die Agarplatten mit dem XLT4-Nährmedium bei einer Temperatur von 35 bis 37 °C inkubiert werden. Für den Chromocult® Agar gilt eine Inkubationstemperatur von 35 bis 37 °C, optimal 37 °C. Es wurden sowohl die Agarplatten mit dem XLT4-Nährmedium wie auch die Agarplatten mit dem Chromocult® Agar zusammen bei einer Temperatur von 36 °C inkubiert.

Die Inkubation der Waschlösungen erfolgte bei allen Beprobungen für 24 Stunden. Anschließend an die Inkubation werden die Agarplatten zu Dokumentationszwecken eingescannt und die einzelnen Platten nach koloniebildenden Einheiten (KBE) ausgewertet. Die Berechnung der Anzahl der Mikroorganismen auf den Fliegenlarven erfolgt in koloniebildenden Einheiten pro Milliliter ($\text{KBE} \times \text{ml}^{-1}$).

2.8 Bestimmung der gebildeten Biomasse in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat

Nachdem die Fliegenlarven bei den Beprobungen abgewogen und gewaschen wurden, wurden für alle einzelnen Larven Trockenmasse, organische und anorganische Anteile bestimmt. Für die Bestimmung der gebildeten Biomasse müssen sowohl die Fliegenlarven berücksichtigt werden, die für die Beprobungen entnommen werden, wie auch jene Fliegenlarven, die am Ende des Versuchs noch übriggeblieben sind. Das Vorgehen mit den am Ende des Versuches übriggebliebenen Larven erfolgte analog zu den für die Beprobungen verwendeten Larven. Die Fliegenlarven beziehungsweise die Puppen wurden aus den Boxen entnommen, deren Frischgewicht bestimmt und danach ebenfalls für eine halbe Stunde auf -20 °C gestellt. Auch von diesen Larven beziehungsweise Puppen wurden Trockengewicht, organische und anorganische Bestandteile bestimmt. Der Unterschied liegt darin, dass diese Messwerte nicht für die einzelnen Larven, sondern für die Larven beziehungsweise Puppen je Box bestimmt wurden.

Die Vorgehensweise für die Bestimmung der Trockenmasse sowie der organischen und anorganischen Bestandteile erfolgt analog der Analyse der Substratzusammensetzung (vgl. Kapitel „2.4 Bestimmung der Substratzusammensetzung für eine äquivalente Fütterung der Larven“).

Die Proben (Larven beziehungsweise Puppen) werden bei 105 °C, 50 % Lüfteransteuerung für 24 Stunden im Trockenschrank (UF 110, Memmert, Schwabach, Deutschland) getrocknet.

Die Analyse organischer und anorganischer Bestandteile erfolgte durch Veraschung. Die Veraschung wird wiederum bei 550 °C für 5 Stunden

durchgeführt (CWF 1100, Carbolite Gero, Neuhausen, Deutschland) (Bisutti et al., 2004).

2.9 Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen

Zusätzlich zu der quantitativen Auswertung der Agarplatten (Bestimmung der KBE) werden auch qualitative Aspekte berücksichtigt. Von den unterschiedlichen Proben und Nährmedien werden vor allem morphologisch unterschiedliche Kolonien, die deutlich von anderen Kolonien abgegrenzt sind, mit sterilen Pipettenspitzen auf eine Masterplatte (MP; Standardmedium) überimpft. Unter diese Agarplatte wird ein Zahlenraster gelegt, innerhalb welchem die Kolonien verteilt werden (vgl. Abbildung 4).

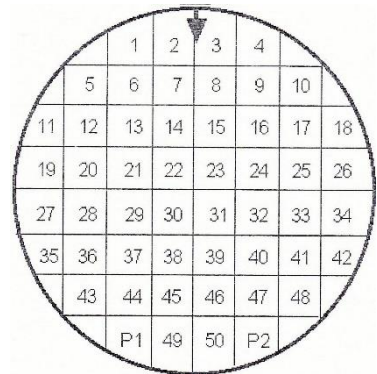


Abbildung 4: Verwendetes Zahlenraster

Bei jeder durchgeführten Beprobung werden die morphologisch besonderen Kolonien auf eine Masterplatte überimpft und deren Herkunft notiert. Ausgehend von den gesammelten Kolonien auf den Masterplatten werden diese nochmals verglichen und selektiert. Die Sammlung morphologisch unterschiedlicher Kolonien wird am Ende durch eine Master-Masterplatte (MMP) repräsentiert.

2.10 Colony PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction; PCR), handelt es sich um eine *in vitro*-Methode, die der Vervielfältigung von DNA dient. Im Wesentlichen umfasst eine PCR drei unterschiedliche Schritte – Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation – die vielfach hintereinander wiederholt werden und zur Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Fragmentes führen. Die Automatisierung der Polymerasekettenreaktion in Thermocyclern wurde durch die Entdeckung und Verwendung von hitzestabilen Polymerase-Enzymen ermöglicht (Mülhardt, 2013).

Für die molekularbiologische Identifikation von unbekanntem Mikroorganismen hat sich unter anderem die Methode der Sequenzierung von 16S rRNA-Genen etabliert. Die derzeitige geltende Phylogenie der Prokaryoten basiert größtenteils auf der Homologie von 16S rRNA-Genen. (Munk, 2001; Madigan et al., 2013). Mit 16S rRNA-Sequenzen können Datenbankabgleiche durchgeführt werden. Dadurch erhält man Informationen darüber, ob der vorliegende Organismus bereits beschrieben worden ist und um welchen Organismus es sich handelt.

Eine funktionsfähige PCR besteht aus mehreren Bestandteilen (Reinard, 2010; Mülhardt, 2013):

- DNA-Matrize (Template)
- Primerpaar (forward Primer, reverse Primer)
- Desoxynukleotide (dNTPs)
- hitzestabile DNA-Polymerase
- Magnesium-Ionen
- Puffer

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Abwandlungen der klassischen PCR entwickelt. Die colony PCR stellt eine etwas abgewandelte Version der klassischen PCR dar (Reinard, 2010). Bei einer klassischen PCR wird die DNA-Matrize in gelöster Form dazupipettiert. Im Gegensatz dazu wird bei einer colony PCR keine DNA-Matrize dazupipettiert, sondern eine Bakterienkolonie „gepickt“ (zum Beispiel mit einer sterilen Pipettenspitze), in den PCR-Reaktionsansatz eingetaucht und leicht gerührt. Dabei lösen sich Bakterienzellen ab und verbleiben im PCR-Reaktionsansatz. Bei einer colony PCR werden ganze Bakterienzellen zugegeben – die genomische DNA der Bakterienzellen fungiert hierbei als DNA-Matrize. Zu Beginn einer colony PCR liegen die Bakterienzellen im intakten Zustand vor. Deshalb muss der eigentlichen PCR ein Reaktionsschritt vorgeschaltet werden, durch welchen die Bakterienzellen aufgeschlossen, Enzyme inaktiviert und die DNA-Matrizen für die eigentliche PCR-Reaktion zugänglich gemacht werden. Dieser vorgeschaltete Reaktionsschritt wird oftmals auch als initiale Denaturierung bezeichnet (Reinard, 2010).

Für die Durchführung der colony PCR wurde der VWR® Red Taq DNA Polymerase 2x Mastermix mit 1,5 mM MgCl₂ (VWR Chemicals, Radnor, USA) verwendet. Dieser beinhaltet bis auf Primerpaar und DNA-Matrize alle benötigten Reagenzien inklusive Farbstoff und Ladebuffer.

Die für die colony PCR verwendeten 8f (forward) und 1492r (reverse) Primer sind spezifisch für 16S rRNA-Gene, jedoch universal für Prokaryoten einsetzbar (Buchholz-Cleven et al., 1997; Turner et al., 1999).

Tabelle 5: Übersicht – für die colony PCR verwendeten Primer

Primer	Spezifität	Primer-Sequenz (5' – 3')	Größe des Amplifikats
8f	universal	AGAGTTTGATCCTGG	1 469 bis
1492r	universal	TACCTTGTTACGACTT	1 499 bp

Um die Funktionalität der colony PCR zu verbessern wurde dem PCR-Ansatz außerdem ein Additivum zugesetzt (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die colony PCR (1 Reaktionsansatz à 25 µl)

Komponente	Menge [µl]
VWR® Red Taq DNA Polymerase 2x Mastermix, 1,5 mM MgCl ₂	12,5
1492r Primer	0,5
8f Primer	0,5
2 % BSA (<i>Additivum</i>)	0,5
Template	[1 ng]
PCR H ₂ O	11,0
Gesamt (1 PCR-Reaktionsansatz)	25

Es wurden die Vorbereitungen für zwölf PCR-Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 300 µl) getroffen. Alle benötigten Komponenten werden mittels Pipette zusammengeführt und gemischt. Anschließend wird das Gesamtvolumen auf die einzelnen PCR-Ansätze aliquotiert (vgl. Tabelle 6). Als DNA-Matrize wurden Bakterienkolonien von der Master-Masterplatte verwendet.

Der Thermocycler (T100™ Thermal Cycler, BioRad, Hercules, USA) muss für jede PCR, abgestimmt auf die jeweiligen Anforderungen, programmiert werden. Die Temperatur beziehungsweise die Dauer der einzelnen Schritte

ist abhängig vom verwendeten Primerpaar, der Länge des erwarteten Amplifikats und der verwendeten DNA-Polymerase (Reinard, 2010). Die Einstellungen des Thermocycler-Protokolls für die colony PCR sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Einstellungen des PCR-Thermocycler für die colony PCR

Phase	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	30 sec	35 Zyklen
Primer-Annealing	54	30 sec	
Elongation	72	45 sec	
Finale Elongation	72	10 min	
Ende	12	∞	

Anschließend an die colony PCR wird eine Gelelektrophorese in 1 %-igem Agarosegel (vgl. Tabelle 8) durchgeführt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Die Gelelektrophorese wurde für eine Dauer von 15 Minuten und bei einer Spannung von 150 V durchgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Agarosegels für die Gelelektrophorese

Bestandteil	Menge
Agarose	150 mg
0,5 % TAE Puffer	15 ml
GelGreen®	1 µl

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurden je PCR-Ansatz 3 µl auf das Agarosegel geladen. Zusätzlich wurde 1 µl eines Markers (O'GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use (#SM1563); ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) auf das Agarosegel geladen. Dieser hilft dabei, die Größe

der aufgetrennten Fragmente abzuschätzen, um so feststellen zu können, ob das gewünschte DNA-Fragment im PCR-Ansatz enthalten ist.

2.11 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung von PCR-Produkten dient der Elimination von Störstoffen (Enzyme, Nukleotide, Primer, etc.), die eine weiterführende Analyse stören beziehungsweise ganz blockieren könnten.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem Aufreinigungskit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (NA1020-1KT; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Der Arbeitsablauf wurde nach der mitgelieferten Gebrauchsanleitung durchgeführt.

2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde von Eurofins Genomics über den TubeSeq Service mit vorgemischten Proben durchgeführt. Für die geordnete Sequenzierung ist laut Angaben von Eurofins Genomics ein DNA-Gehalt von 150 ng in 15 µl erforderlich. Dies erfordert die Bestimmung der DNA-Konzentration in den einzelnen PCR-Ansätzen. Die DNA-Konzentration wurde mit NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Zusätzlich liefert die Analyse der Proben via NanoDrop™ Informationen über den Reinheitsgrad der PCR-Produkte.

Die Aliquotierung der Proben erfolgt in 1,5 ml Eppendorfgefäßen. Der DNA-Gehalt der einzelnen Proben wird mittels Verdünnung mit hochreinem Wasser (PCR H₂O) auf eine Endkonzentration von 150 ng DNA pro 15 µl eingestellt. Für die vorgemischten Proben wird nicht nur die zu sequenzierende DNA an die Firma geschickt, sondern ein Gemisch aus zu sequenzierender DNA und Primer (forward Primer). Zu jeder Probe (15 µl)

werden deshalb 2 µl des forward Primers (8f) pipettiert. Das Endvolumen der Proben für die Sequenzierung beträgt 17 µl (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: Schema der Aliquotierung der PCR-Proben für die Sanger-Sequenzierung durch Eurofins Genomics

	Volumen [µl]
PCR-Ansatz	x
PCR-H₂O	15 - x
Forward Primer (8f)	2
Gesamtvolumen vorgemischte Probe	17

Die 1,5 ml Eppendorfgefäße mit den vorbereiteten Proben zur Sequenzierung wurden mit je einem Barcode-Sticker versehen und an Eurofins Genomics versandt. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden mittels BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) mit der Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgeglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Substratzusammensetzungen der unterschiedlichen Fütterungssubstrate

Die Analyse der Substratzusammensetzung der drei unterschiedlichen Fütterungssubstrate ergab, dass sich diese in Hinblick auf Wassergehalt und Anteil organischer und anorganischer Bestandteile deutlich unterscheiden (vgl. Abbildung 5).

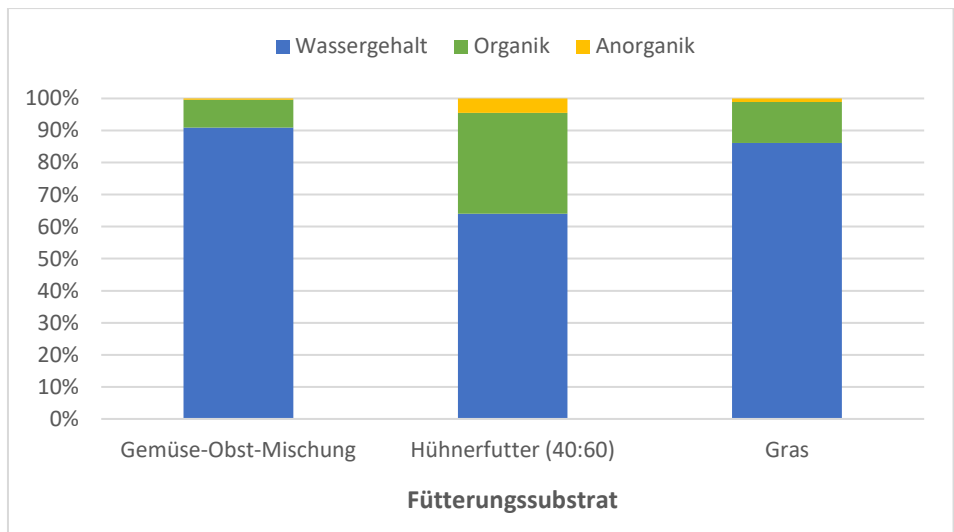


Abbildung 5: Zusammensetzung der drei Fütterungssubstrate bezogen auf die Frischmasse

Den höchsten Anteil an organischen Bestandteilen bezogen auf das Frischgewicht weist das Hühnerfutter auf (31,50 %), gefolgt von Gras (12,80 %) und der Gemüse-Obst-Mischung (8,69 %), weshalb die in der Fütterungsmenge von 100 mg Hühnerfutter pro Larve pro Tag enthaltene organische Masse als Referenzwert für die Berechnung der äquivalenten Fütterung der Fliegenlarven dient (Diener et al., 2009). Der Bezug der Substratzusammensetzung auf die Frischmasse ist deshalb wichtig, da bei

der Fütterung der Larven jeweils das Frischgewicht eingewogen wird und nicht die Trockensubstanz.

Tabelle 10: Verhältnis organischer Bestandteile der Fütterungssubstrate zu Hühnerfutter (40:60 gemischt mit Wasser)

Fütterungssubstrat	Faktor für äquivalente Menge an Organik
Hühnerfutter (40:60)	1
Gras	2,44
Gemüse-Obst-Mischung	3,66

Das berechnete Verhältnis (vgl. Tabelle 10) entspricht dem Faktor, mit dem die Frischmasse des jeweiligen Fütterungssubstrates multipliziert werden muss, sodass den Fliegenlarven täglich dieselbe Menge an Organik verfüttert wird.

Die zweite Größe, die für die Fütterung beachtet werden muss, ist der Wassergehalt. Den höchsten Wassergehalt wies die Gemüse-Obst-Mischung (90,86 %) auf, gefolgt von Gras (86,10 %) und Hühnerfutter (64,00 %). Die Differenz des Wassergehaltes zwischen den einzelnen Fütterungssubstraten wurde berechnet und durch Zugabe von Wasser bei der Fütterung ausgeglichen.

Unter Berücksichtigung des Gehaltes an organischen Verbindungen und des Wassergehaltes der unterschiedlichen Fütterungssubstrate wurden die Fütterungsraten berechnet (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Schema der Fütterung für 50 Larven für 1 Tag

Substrat	Frischgewicht [g]	Trockenmasse [g]	Wassergehalt [g]	Zusätzliches Wasser [g]
Hühnerfutter (40:60)	5,00	1,80	3,20	13,53
Gras	12,22	1,70	10,52	6,21
Gemüse-Obst-Mischung	18,40	1,67	16,73	

Durch die Beprobungen verminderte sich im Laufe des Versuches die Larvenanzahl in den Boxen, was eine regelmäßige Anpassung der Fütterungsmengen erforderte. Ebenso wurden auch die entfernten Puppen bei der Berechnung der Fütterungsmengen berücksichtigt.

3.2 Fütterungsversuch

Aus den selbst angezüchteten Larvenpopulationen konnten 240 Larven geerntet werden. Bei allen drei getesteten Fütterungssubstraten wurde ein gutes Wachstum beobachtet (vgl. Abbildung 6).

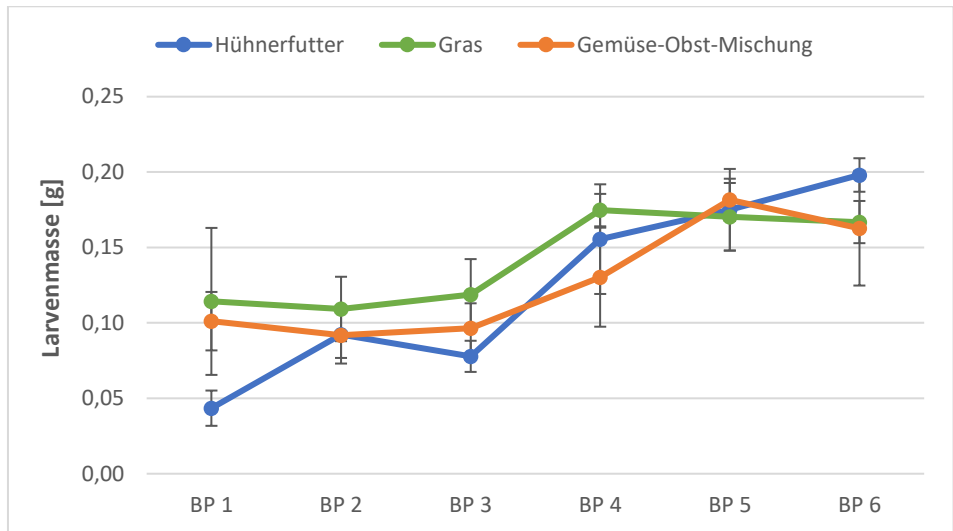


Abbildung 6: Mittlere Masse der für die Beprobungen entnommenen Fliegenlarven (BP ... Beprobung)

Bei der Entnahme der Fliegenlarven für die Beprobungen wurde darauf geachtet, Larven ähnlicher Größe zu entnehmen. Die Beurteilung der Größe der Fliegenlarven erfolgte subjektiv, weshalb es bei den beprobten Larven zum Teil auch zu Größenunterschieden gekommen ist. Dadurch lassen sich die Schwankungen im Diagramm erklären (vgl. Abbildung 6).

Sieht man sich die Gesamtbilanz des Larvenwachstums an, zeigt sich, dass es in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat keine signifikanten Unterschiede in der gebildeten Larvenbiomasse gab ($F_{2,3} = 2,14$; $P = 0,26$). Im Gegensatz dazu konnten in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat signifikante Unterschiede bezüglich der metabolisierten Substratmenge festgestellt werden ($F_{2,3} = 324,34$; $P < 0,001$). Die mit der Gemüse-Obst-Mischung gefütterten Fliegenlarven verstoffwechselten den größten Anteil ihres Fütterungssubstrates. Die geringste Metabolisierung des verfütterten Substrates wiesen die mit Gras gefütterten Fliegenlarven auf (vgl. Abbildung 7).

Ebenso gab es, abhängig von den unterschiedlichen Fütterungssubstraten, deutliche Masseunterschiede bei den verbleibenden Residuen der Larven ($F_{2,3} = 54,80$; $P < 0,05$) (vgl. Abbildung 7).

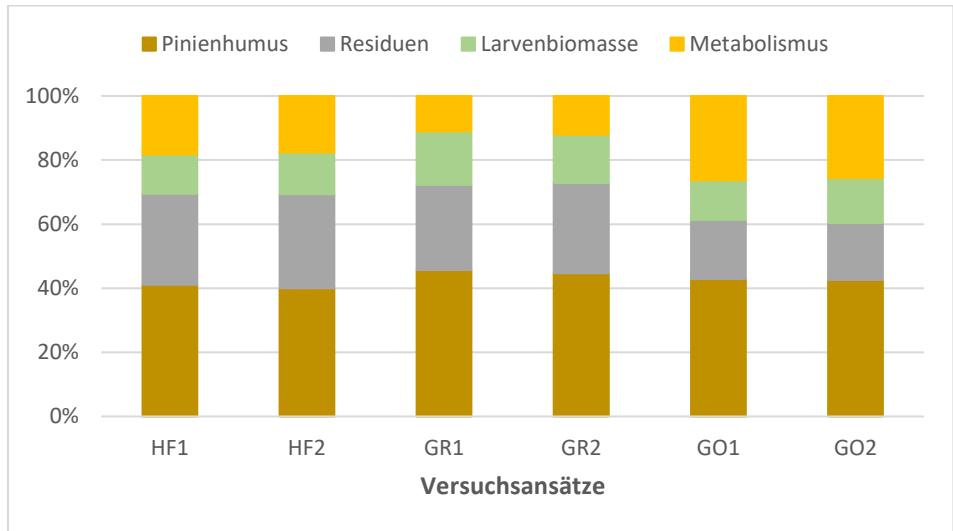


Abbildung 7: Gesamtbilanz der einzelnen Versuchsansätze – Pinienhumus, Residuen, gebildete Larvenbiomasse, Metabolismus (HF ... Hühnerfutter, GR ... Gras, GO ... Gemüse-Obst-Mischung)

Die Residuen umfassen sowohl die Ausscheidungen und Rückstände der Fliegenlarven wie auch jene Substratanteile, die von den Fliegenlarven nicht gefressen wurden (vgl. Abbildung 8).

Bei den Larven, die mit Hühnerfutter gefüttert wurden, war die Masse der Residuen am höchsten. Die geringste Residuenmasse befand sich bei Larven, die mit der Gemüse-Obst-Mischung gefüttert wurden.



Abbildung 8: Boxen der sechs Versuchsansätze mit den Residuen (Hühnerfutter, Gras und Gemüse-Obst-Mischung)

Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Verpuppung der Larven in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat gelegt. Die larvale Entwicklungsphase von *H. illucens* beträgt circa 20 Tage, wobei beachtet werden muss, dass die Dauer in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen (Temperatur, Substrat, Luftfeuchtigkeit) teils stark differieren kann (Tomberlin et al., 2002; Čičková et al., 2015). Ab dem Zeitpunkt der fünften Beprobung – entspricht Tag 14 des Versuchsansatzes – wurden die einzelnen Boxen regelmäßig kontrolliert, ob sich bereits Larven verpuppt haben. Die vorhandenen Puppen wurden aus den Boxen entfernt und die weiteren Bestimmungen (vgl. Kapitel „2 Material und Methoden“) durchgeführt.

Tabelle 12: Anzahl der bei den Kontrollen entfernten Puppen

Zeitpunkt [Versuchsansatz]	Box 1	Box 2	Box 3	Box 4	Box 5	Box 6
Tag 14	6	0	19	14	3	5
Tag 15	0	0	5	3	0	0
Tag 16	6	5	10	12	5	2
Tag 19	13	12	5	7	2	0
GESAMT	25	17	39	36	10	7



Abbildung 9: Erste Kontrolle der Boxen (Tag 14) In den Petrischalen vor den Boxen sind die aussortierten Puppen

In Abhängigkeit des verfütterten Substrats entwickelten sich die Larven unterschiedlich schnell. Die schnellste Entwicklung durchliefen jene Larven, die mit dem Fütterungssubstrat Gras gefüttert wurden. Bei diesen beiden Versuchsansätzen hatten sich alle Larven bis zur Beendigung des Versuchs (Tag 19) verpuppt (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Gesamtbilanz der Larvenentwicklung in den einzelnen Boxen zum Zeitpunkt der Beendigung des Versuchs (Tag 19) (Startpopulation: 50 Larven pro Box)

	beprobte Larven	entfernte Puppen	nicht verpuppte Larven	verbleibende Larven
Box 1	12	25	2	11
Box 2	12	17	10	11
Box 3	12	39	0	-1
Box 4	12	36	0	2
Box 5	12	10	29	-1
Box 6	12	7	36	-5

Die Larven aus den Boxen, die mit dem Substrat Hühnerfutter gefüttert wurden, entwickelten sich etwas langsamer. Man konnte jedoch erkennen, dass auch die verbleibenden Larven nicht mehr viel Zeit bis zu ihrer Verpuppung benötigt hätten. Die langsamste Entwicklung zeigten die Larven, die mit der Gemüse-Obst-Mischung gefüttert wurden. Bei diesen Versuchsansätzen wurden am Ende des Versuchs die meisten nicht verpuppten Larven aussortiert.

Die Werte unter „verbleibende Larven“ (vgl. Tabelle 13) entsprechen jener Larvenanzahl, die nach der Beendigung des Versuchs und Aussortierung der Larven und Puppen noch in den Boxen hätte sein müssen, um auf die insgesamt 50 Larven zu kommen, die zu Beginn des Versuchs in die Larvenboxen gegeben wurden. Ein positiver Wert bedeutet, dass nach Beendigung des Versuchs noch Larven in den Boxen hätten sein müssen, ein negativer Wert bedeutet, dass aus einer Box insgesamt mehr als 50 Larven entnommen worden sind.

3.3 Die Mikrobiota auf Larven von *H. illucens*

Das Oberflächenmikrobiom der Larven entwickelte sich in Hinblick auf die getesteten Fütterungssubstrate unterschiedlich (vgl. Abbildung 10).

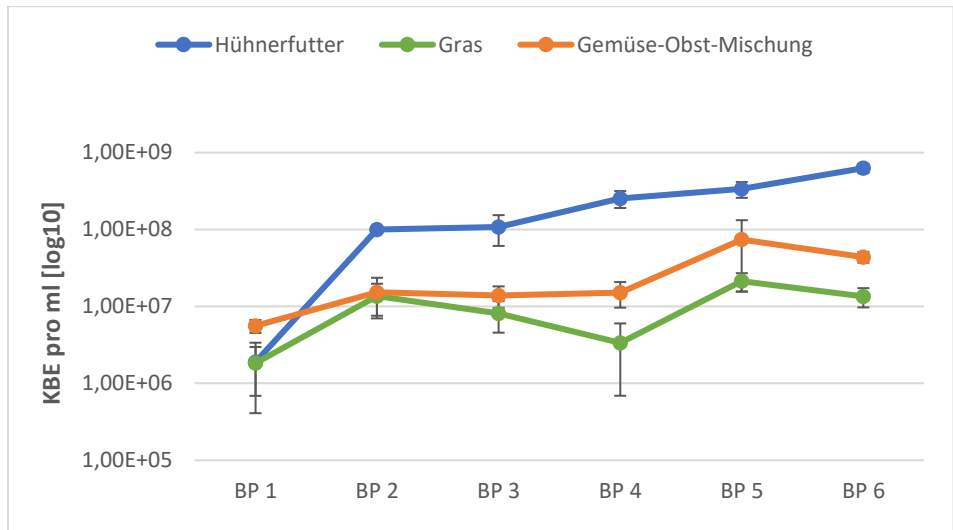


Abbildung 10: Bestimmte Lebendzellzahl auf der Oberfläche der Fliegenlarven in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat und dem Alter der Larven (BP ... Beprobung)

Die größten Veränderungen der Keimdichten auf den Fliegenlarven zeigten sich zwischen den ersten beiden Beprobungszeitpunkten und hierbei insbesondere beim Fütterungssubstrat Hühnerfutter. Bei den folgenden Beprobungen gibt es zwar eine gewisse Schwankungsbreite der Keimdichten, jedoch waren diese deutlich geringer als jene zu Beginn der Beprobungen. Tendenziell ließ sich mit zunehmendem Larvenalter eine Zunahme der Mikroorganismenanzahl erkennen. Es konnte auch festgestellt werden, dass bei den drei verschiedenen Fütterungssubstraten morphologisch teils sehr unterschiedliche Bakterienkolonien vorkommen.

Bezogen auf die Gesamtkeimzahl lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Fütterungsformen feststellen ($F_{2, 69} = 24,12$; $P < 0,001$). Ein signifikanter Unterschied ließ sich sowohl zwischen Hühnerfutter und Gras wie auch zwischen Hühnerfutter und der Gemüse-Obst-Mischung feststellen. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen Gras und der Gemüse-Obst-Mischung. Fliegenlarven, die mit dem Fütterungssubstrat Hühnerfutter gefüttert wurden, wiesen die dichteste Besiedelung mit Mikroorganismen auf.

In weiterer Folge war auch eine etwaige Belastung der Fliegenlarven mit Pathogenen wie zum Beispiel *E. coli* und anderen coliformen Bakterien von Interesse.

Das Vorkommen von *E. coli* und anderen coliformen Bakterien war bei Larven, die mit dem Hühnerfutter gefüttert wurden, signifikant höher als bei den anderen beiden Fütterungssubstraten (vgl. Abbildung 11). Bei allen Fütterungsansätzen konnte zwischen erster und zweiter Beprobung eine starke Zunahme an coliformen Bakterien verzeichnet werden. Sehr interessant ist, dass es bei den beiden Fütterungsansätzen mit Hühnerfutter über den gesamten Beprobungszeitraum zu einer Zunahme der Gesamtcoliformen gekommen ist. Bei den Larven mit dem Fütterungssubstrat Gemüse-Obst-Mischung hingegen änderte sich die Abundanz der Gesamtcoliformen nur mehr geringfügig. Die Veränderungen lassen jedoch keinen Trend – hin zu einer Zunahme oder Abnahme – erkennen – die Keimzahlen schwankten innerhalb eines gewissen Größenbereichs (vgl. Abbildung 11).

Beim Vorkommen und der Zellzahl von coliformen Bakterien in den Fütterungsansätzen mit Gras lässt sich eine andere Dynamik feststellen. Die Abundanzen der Gesamtcoliformen unterscheiden sich zwischen den

einzelnen Beprobungen teils sehr stark. Ein Trend der weiteren Entwicklung kann aufgrund der Schwankungen zwischen den Beprobungen nicht festgestellt werden.

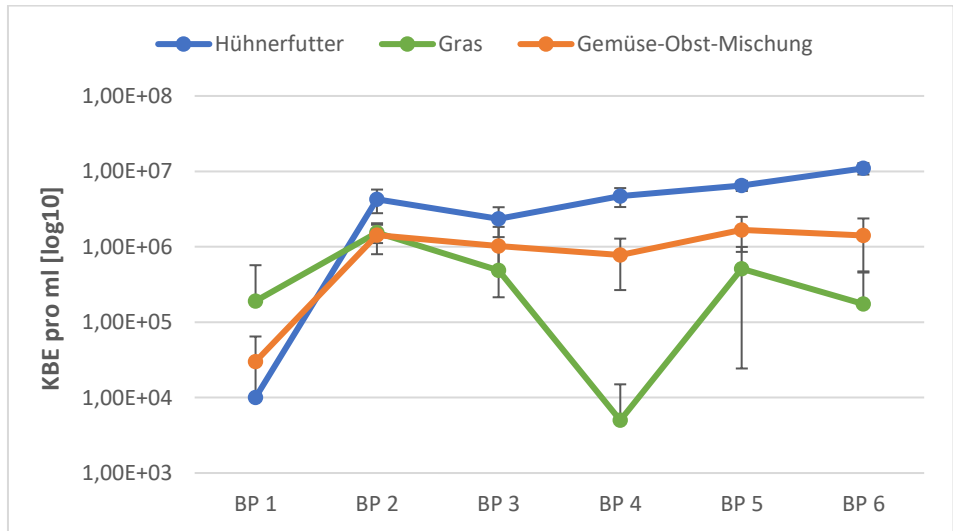


Abbildung 11: Anzahl der Gesamtcoliformen auf der Oberfläche der Fliegenlarven in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat und dem Alter der Larven (BP ... Beprobung)

Betrachtet man lediglich *E. coli*, kann gesagt werden, dass ein Vorkommen in allen sechs Versuchsansätzen festgestellt wurde. Auffallend war, dass *E. coli* bei den mit Hühnerfutter gefütterten Larven ab der zweiten Beprobung ständig nachgewiesen werden konnte. Bei den beiden anderen Fütterungssubstraten konnte eine Belastung mit *E. coli* lediglich bei zwei Beprobungen (Beprobung 2 und 5) festgestellt werden (vgl. Abbildung 12).

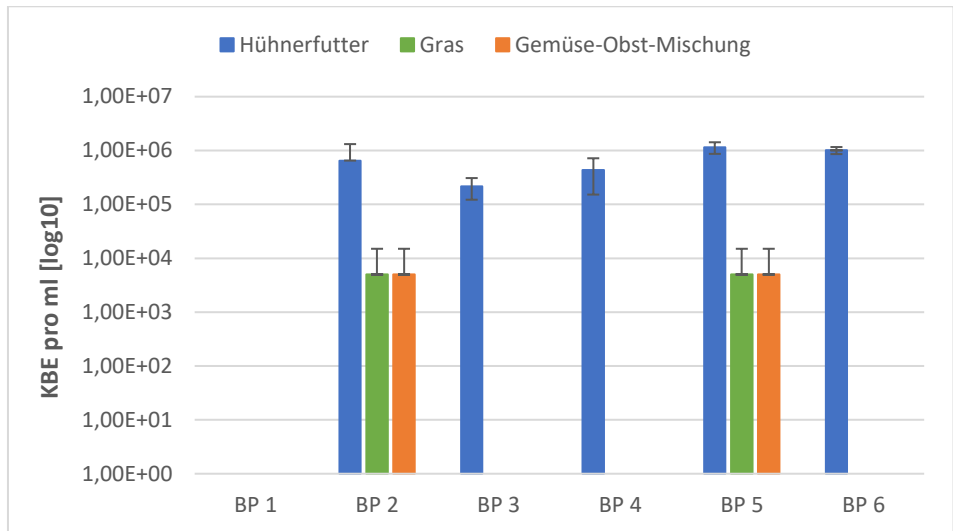


Abbildung 12: Vorkommen von *E. coli* (BP ... Beprobung)

Während der Entwicklungszyklen der Larven und den regelmäßigen Beprobungen konnte keine Kontamination mit *Salmonella* spp. festgestellt werden. Auf XLT4-Selektivmedium konnte zwar Bakterienwachstum nachgewiesen werden, jedoch ergaben sich keine Hinweise auf *Salmonella* spp.

3.4 Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen

Bei jeder durchgeführten Beprobung der Fliegenlarven wurden von allen Agarplatten morphologisch unterschiedliche Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen „gepickt“ und auf eine Masterplatte (MP) übertragen (vgl. Kapitel „2.9 Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen“). Für die insgesamt sechs durchgeführten Waschungen der Fliegenlarven wurden sieben Masterplatten erstellt.

Die sieben Masterplatten der einzelnen Beprobungen wurden nochmals miteinander verglichen und innerhalb der Masterplatten nach den

morphologisch unterschiedlichen Kolonien selektiert. Mit diesen ausgewählten Kolonien wurde eine Master-Masterplatte (MMP) erstellt. Kolonien der Master-Masterplatte 1 (MMP1) dienten als DNA-Matrize (Template) für die durchgeführte colony PCR. Diese Kolonien wurden durch das Entnehmen von Inokulationsmaterial für die colony PCR in ihrer Morphologie zerstört. Deshalb wurden die Kolonien von der Master-Masterplatte 1 (MMP1) nochmals auf eine neue Agarplatte überimpft.



Abbildung 13: Sammlung morphologisch unterschiedlicher Kolonien – Foto der Master-Masterplatte 2 (MMP2)

Die Master-Masterplatte 2 (MMP2) stellt eine Sammlung der morphologisch unterschiedlichen Bakterienkolonien dar, die im Zuge der Beprobungen gefunden wurden (vgl. Abbildung 13).

3.5 Colony PCR

Insgesamt wurden zwölf PCR-Ansätze durchgeführt, wovon einer als Negativkontrolle diente. Die Negativkontrolle enthielt keine DNA-Matrize (Template).

Mit Hilfe der durchgeführten Gelelektrophorese in 1 %-igem Agarosegel wurde der Erfolg der PCR kontrolliert.

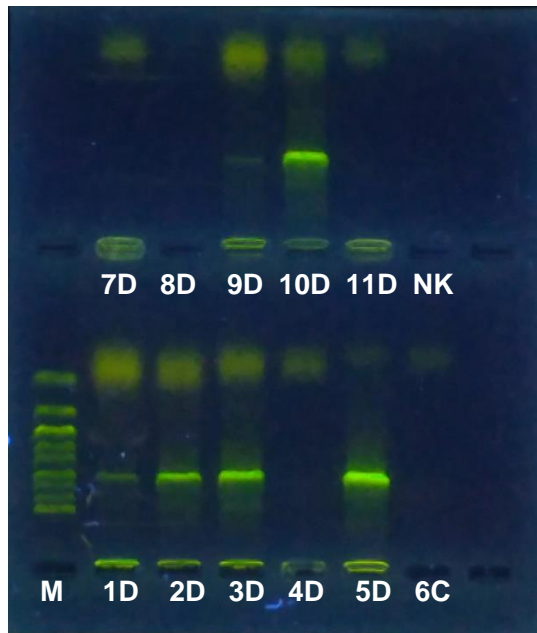


Abbildung 14: Agarosegel der Kontroll-Gelelektrophorese der durchgeführten colony PCR (M ... Marker; NK ... Negativkontrolle)

Auf dem Foto des Agarosegels (Abbildung 14) ist zu erkennen, dass es bei sechs PCR-Produkten zur Bildung eines spezifischen PCR-Produktes gekommen ist. Vier PCR-Ansätze (Ansatz 2D, 3D, 5D und 10D) zeigen deutliche und starke Banden, bei zwei weiteren PCR-Ansätzen (1D und 9D) sind diese nur schwach zu erkennen.

Mit Hilfe des aufgetragenen Markers konnten die Größen der PCR-Produkte abgeschätzt werden. Die PCR-Produkte liegen, verglichen mit dem Marker, circa auf einer Höhe, die einer Fragmentgröße von 1500 Basenpaaren entspricht, was mit der Größe der zu erwartenden PCR-Produkte übereinstimmt (vgl. Tabelle 5).

3.6 DNA-Sequenzierung – Identifikation der Reinkulturen

Die erhaltenen Sequenzierergebnisse wurden in Hinblick auf ihre Qualität kontrolliert. Die einzelnen Chromatogramme wurden überprüft und nicht aussagekräftige Sequenzabschnitte (vor allem Anfang und Ende) maskiert. Die maskierten Bereiche enthielten viele Interferenzen, sodass eine genaue Beurteilung der tatsächlichen Sequenz nicht möglich war. Dies könnte unter Umständen das Ergebnis des Datenbankabgleiches verfälschen.

Der Datenbankabgleich erfolgte auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Für die erhaltenen Sequenzen der 16S rRNA-Gene wurde eine Nucleotide-BLAST-Suche durchgeführt.

Leider konnte für Probe 9D kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden.

Die Ergebnisse des Nucleotide-BLAST sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Ergebnisse des Nucleotide-BLAST auf NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Isolat	PCR-Ansatz	Accession	Ident	Organismus
1	1D	NR_026468.1	95 %	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
2	2D	NR_117626.1	99 %	<i>Acinetobacter guillouiae</i>
3	3D	NR_153688.1	99 %	<i>Microbacterium sorbitolivorans</i>
4	5D	NR_118298.1	99 %	<i>Kurthia gibsonii</i>
5	10D	NR_041978.1	95 %	<i>Pantoea agglomerans</i>

Tabelle 15: Informationen zu den sequenzierten Isolaten
 Morphologie: KR...Kolonierand, P...Profil, K...Konsistenz, OBFL...Oberfläche, F...Form

Isolat	Herkunft	Morphologie
1	Standardagar, Hühnerfutter; 1. Beprobung	KR: glatt; P: flach; K: schleimig; OBFL: glänzend; F: rund; weiß
2	Standardagar, Hühnerfutter; 1. Beprobung	KR: glatt; P: flach; K: schleimig; OBFL: glänzend; F: leicht undulat; weiß, leicht gelblich
3	Standardagar, Hühnerfutter; 1. Beprobung	KR: wellig; P: erhaben; K: wattig; OBFL: rau; F: rund/leicht undulat; weiß
4	Standardagar, Hühnerfutter; 4. Beprobung	KR: gelappt; P: flach; K: schleimig; OBFL: glänzend, glatt; F: filamentös; gelb
5	Standardagar, Gras; 6. Beprobung	KR: glatt; P: flach; K: schleimig; OBFL: glänzend, glatt; F: rund; gelb

4 Diskussion

4.1 Fütterungsversuch

Die Zusammensetzungen der drei verwendeten Fütterungssubstrate (Hühnerfutter, Gras und Gemüse-Obst-Mischung) unterscheiden sich deutlich. Auch der Bioabfall, der bei einer potentiellen Anwendung der Larven von *H. illucens* für dessen Prozessierung als Fütterungssubstrat dienen könnte, kann sich in Abhängigkeit von der Herkunft teils stark unterscheiden. Deshalb ist es auch wichtig zu wissen, welche Auswirkungen unterschiedliche Fütterungssubstrate auf das Wachstum der Fliegenlarven haben.

Der Fütterungsversuch mit den drei unterschiedlichen Substraten zeigte, dass die Larven von *H. illucens* das ihnen verabreichte Substrat gut verwerten können. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung differierten die täglich verfütterten Mengen an Substratfrischmasse und auch die Menge der darin enthaltenen anorganischen Anteile. Tomberlin et al. (2002) testeten bereits den Einfluss unterschiedlicher Substrate auf die Schwarze Soldatenfliege und stellten im Zuge ihrer Studie fest, dass es bei den drei von ihnen getesteten Substraten bezüglich des finalen Larvengewichts keine signifikanten Unterschiede gab. Das hier vorliegende Ergebnis bezüglich der gebildeten Larvenbiomasse stimmt mit den Ergebnissen von Tomberlin et al. (2002) überein. Wichtig zu beachten ist, dass durch die durchgeführten Beprobungen in regelmäßigen Abständen die Larvenanzahlen in den Boxen reduziert wurden. Die entnommenen Larven befanden sich noch im Wachstum und hätten in weiterer Folge zur gebildeten Biomasse beigetragen.

Der vergleichbare Biomasse-Output aus den getesteten Fütterungssubstraten deutet darauf hin, dass die Fliegenlarven diese sehr

gut verwerten können. Bei allen drei Fütterungssubstraten haben die Larven annähernd dieselbe Menge an organischen Bestandteilen verwertet und in Biomasse investiert, allerdings in unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

Bereits mehrere Forschungsgruppen haben sich mit dem Einfluss unterschiedlicher Substrate auf die Entwicklung der Larven von *H. illucens* beschäftigt. Nguyen et al. (2013) und Tomberlin et al. (2002) stellten unter anderem fest, dass das Substrat einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung der Larven hat. Die Larven wiesen in Abhängigkeit von deren Fütterungssubstrat eine unterschiedlich schnelle Entwicklung sowie unterschiedlich hohe Mortalitätsraten auf (Tomberlin et al., 2002; Nguyen et al., 2013).

Die Beschaffenheit und Zusammensetzung des Substrats beeinflussen zudem weitere wichtige Faktoren wie zum Beispiel das Paarungsverhalten der Fliegen und deren Eiablage (Tomberlin und Sheppard, 2001).

Gewichtsbilanz zum Zeitpunkt der Beendigung des Versuchs

Wie im Diagramm (vgl. Abbildung 5) zu erkennen ist, wies das Fütterungssubstrat Hühnerfutter den höchsten Anteil an anorganischen Bestandteilen auf. Zugleich war die Masse der Residuen am Ende des Versuches auch bei diesen beiden Versuchsansätzen am höchsten. Im Gegensatz dazu wurde bei den Larven, die mit der Gemüse-Obst-Mischung gefüttert wurden, die geringste Masse an Residuen festgestellt. Die Gemüse-Obst-Mischung wies auch den geringsten Anteil anorganischer Bestandteile auf (vgl. Abbildung 5 und 7).

Aus dieser Beobachtung könnte man schließen, dass die Zusammensetzung der Substrate die Residuenmasse maßgeblich beeinflusst. Der durch die vorliegenden Daten gewonnene Eindruck, lässt eine positive Korrelation zwischen dem Anteil an anorganischen Bestandteilen im Substrat und der

verbleibenden Residuenmasse erahnen. Eine Korrelation kann mit den im Zuge des durchgeführten Versuchs erhobenen Daten nicht verlässlich berechnet werden. Mit Hilfe weiterführender Versuche mit einer höheren Anzahl an unterschiedlichen Fütterungssubstraten sowie einer höheren Anzahl an Parallelen kann der Zusammenhang zwischen Anorganik im Fütterungssubstrat und Residuenmasse näher untersucht werden.

Das Wissen über einen solchen Zusammenhang und über die Stärke der Korrelation ist für eine großtechnische Anwendung von Bedeutung. Durch die Fliegenlarven nicht verwertbare Bestandteile des Bioabfalls müssen im Nachhinein auf anderem Wege entsorgt werden. Die Entsorgung der verbleibenden Residuen ist wiederum mit zusätzlichen Kosten verbunden, die bei der Kalkulation in einem Betrieb mitberücksichtigt werden müssen.

Aufgrund der Tatsache, dass die mit der Gemüse-Obst-Mischung gefütterten Fliegenlarven einen deutlich größeren Anteil des ihnen verfütterten Substrats metabolisiert haben, bezüglich der gebildeten Larvenbiomasse aber keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die mit der Gemüse-Obst-Mischung gefütterten Fliegenlarven einen größeren Teil des aufgenommenen Substrats in ihren Energiestoffwechsel investiert haben.

Larvenanzahlen zum Zeitpunkt der Beendigung des Versuchs

Zu Beginn des Versuchs sollten 50 Larven in die einzelnen Boxen abgezählt werden. Allerdings verzeichneten bei der Beendigung des Experiments einige Boxen einen Überschuss beziehungsweise ein Defizit an Larven, was auf Fehler bei der Abzählung zurückzuführen ist. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit sind einige Larven während der Versuchsdurchführung gestorben und haben folglich nicht das Stadium einer ausgewachsenen Larve beziehungsweise das einer Puppe erreicht. Aufgrund dessen kann es sein, dass zum Zeitpunkt der Beendigung des Versuchs weniger Larven aus den Boxen ausgezählt wurden als zu Beginn des Versuchs in die Boxen gegeben wurden. Nguyen et al. (2013) testeten den Einfluss unterschiedlicher Substrate auf die larvale Entwicklung von *H. illucens* und konnten feststellen, dass sich die Mortalität der Larven in Abhängigkeit vom Substrat sehr stark unterscheiden kann. Bei dem von ihnen getesteten Substrat Fisch zum Beispiel konnte eine Mortalitätsrate von beinahe 100 % verzeichnet werden (Nguyen et al., 2013). Zum Zeitpunkt der Auszählung waren die Fliegenlarven circa sechs bis neun Tage alt und daher noch sehr klein. Die geringe Größe der Larven erschwerte das Abzählen dieser und hätte zur Folge haben können, dass anstatt einer einzelnen Larve versehentlich mehrere Larven zugleich in eine Box überführt wurden. In diesem Fall hätten am Ende des Versuchs mehr Larven aus den Boxen ausgezählt werden können, als es entsprechend der ursprünglichen Versuchsplanung und Abzählung sein hätten dürfen.

Holmes et al. (2013) beschäftigten sich mit dem Einfluss unterschiedlicher Substrate auf das Puppenstadium sowie auf adulte Fliegen von *H. illucens*. Sie stellten fest, dass sowohl die Dauer des Puppenstadiums wie auch der Anteil der geschlüpften Fliegen deutlich vom verfütterten Substrat abhängig

ist. Zusätzlich beeinflusste das Substrat auch das Überleben und die Fortpflanzung der adulten Fliegen.

Einen weiteren wichtigen Einflussfaktor, der nicht vergessen werden darf, stellt die Beschaffenheit des Substrats dar. Besonders frisch geschlüpfte und sehr junge Fliegenlarven können Probleme damit haben, grobes Substrat aufzuschließen und es sich zugänglich zu machen. Bereits etwas größer gewachsene Larven besitzen stärkere Mundwerkzeuge und können ihr Substrat dementsprechend besser aufschließen (Oliveira et al., 2015). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die Effizienz der Substratverwertung erhöht werden könnte, indem Fliegenlarven in Mischpopulationen unterschiedlichen Alters gezüchtet werden.

Für die großtechnische Anwendung von *H. illucens* in der Bioabfallprozessierung können diese Erkenntnisse von großer Bedeutung sein und unter Umständen die Effektivität der Bioabfallprozessierung maßgeblich gesteigert werden.

4.2 Die Mikrobiota auf Larven von *H. illucens*

Im Zuge der durchgeführten Beprobungen zeigte sich deutlich, dass es bei Larven von *H. illucens* zur Etablierung eines Oberflächenmikrobioms kommt. Die Etablierung des Oberflächenmikrobioms ist, wie auch beim Menschen, ein gradueller Prozess und wird höchstwahrscheinlich ebenfalls von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich das Oberflächenmikrobiom der Larven in Abhängigkeit vom Substrat unterschiedlich etabliert hat. Untersuchungen anderer Forschungsgruppen zeigten, dass sich auch die Zusammensetzung und Komplexität des Darmmikrobioms in Abhängigkeit vom Substrat der Larven unterscheiden kann (Jeon et al., 2011). Dadurch könnte es auch bei

einer großtechnischen Anwendung von *H. illucens* in der Bioabfallprozessierung zu sehr unterschiedlichen Mikrobiomen kommen.

Die Larven aus den unterschiedlichen Fütterungsansätzen unterscheiden sich nicht nur im Hinblick auf die Gesamtanzahl der Mikroorganismen auf ihren Oberflächen, sondern auch im Vorkommen von coliformen Bakterien und *E. coli*.

Erickson et al. (2004) stellten im Zuge ihrer Untersuchungen fest, dass durch eine Prozessierung von Mist mit Soldatenfliegenlarven die Bakterienzahl im Mist verringert werden konnte. Bei Hühnermist zum Beispiel konnte durch den Einsatz von Soldatenfliegenlarven eine signifikante Reduktion von potentiell pathogenen Mikroorganismen wie *E. coli* und *Salmonella enterica* erreicht werden (Erickson et al., 2004).

Mist wird in der Landwirtschaft sehr häufig als Dünger verwendet und auf die Felder ausgebracht. Mit dem Mist werden zugleich aber auch die darin enthaltenen Mikroorganismen verbreitet. Die Prozessierung des Mistes mit Larven von *H. illucens* könnte demnach eine Möglichkeit bieten, die Keimbelastung mit potentiell pathogenen Mikroorganismen wie zum Beispiel *E. coli* und *Salmonella spp.* relativ einfach zu verringern.

Für die Fütterung der Larven wurden drei selbst hergestellte Fütterungssubstrate verwendet (vgl. Kapitel „2.2 Herstellung der unterschiedlichen Fütterungssubstrate“). Man kann davon ausgehen, dass die Abundanz von Mikroorganismen in den selbst hergestellten Substraten im Vergleich zu Bioabfall niedriger ist. Bioabfall stellt ein geeignetes Habitat für viele unterschiedliche Mikroorganismen dar, in dem sie sehr hohe Abundanzen erreichen können. Für die Abundanz von Mikroorganismen ist nicht nur die Art des Bioabfalls ein wichtiger Faktor, sondern auch dessen Alter. Frischer Bioabfall weist noch eine geringere Keimbelastung auf als

jener, der schon älter ist und bei welchem bereits Abbauprozesse eingesetzt haben. In diesem Zusammenhang kann es wichtig sein, die mikrobielle Gemeinschaft in Bioabfall zu untersuchen, um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Mikroorganismen zusammen mit dem Bioabfall in das System der Bioabfallprozessierung eingebracht werden und welchen Einfluss Soldatenfliegenlarven auf diese Mikroorganismen im Bioabfall haben. Es stellt sich demnach die Frage, ob die Soldatenfliegenlarven wie im Mist (Erickson et al., 2004; Liu et al., 2008) auch im Bioabfall eine effiziente antimikrobielle Wirkung aufweisen, wodurch die Abundanz von potentiell pathogenen Mikroorganismen verringert werden kann.

Für die Prozessierung von Bioabfall ist das Darmmikrobiom von größter Bedeutung. Sollten die Larven von *H. illucens* in weiterer Folge auch für die Futter- und Lebensmittelindustrie verwendet werden, muss auch die Mikrobiota der Larvenoberfläche unbedingt berücksichtigt werden. Bei der Verwendung der Larven als Nahrungsmittel müssen die Bakterien, sowohl auf der Oberfläche wie auch im Darm der Larven, abgetötet werden, um die Sicherheit der Konsumentinnen und Konsumenten gewährleisten zu können (Schäfer et al., 2016).

4.3 Isolation von Kolonien und Gewinnung von Reinkulturen

Bereits die Isolation morphologisch unterschiedlicher Kolonien aus den einzelnen Beprobungen zeigt, dass die Mikrobiota auf den Larven von *H. illucens* durch eine Vielzahl unterschiedlicher Arten von Mikroorganismen gebildet wird. Die Unterscheidung von Mikroorganismen anhand ihrer Morphologie ist keine ausreichend genaue Methode, um die Artenvielfalt in einem Habitat zu bestimmen. Auch zwei sehr unterschiedliche Arten von Mikroorganismen können in ihrer Morphologie ähnlich sein. Für die

Bestimmung der Artenzusammensetzung in einer mikrobiellen Gemeinschaft kommen deshalb andere Methoden zum Einsatz. Die methodische Vielfalt ist groß – sie reicht von klassischen kulturtechnischen Verfahren, zum Beispiel der physiologischen Charakterisierung, bis hin zu molekularbiologischen Techniken (Madigan et al., 2013).

Aufgrund der Tatsache, dass die Waschlösungen, die auf den unterschiedlichen Nährmedien ausplattiert wurden, verdünnt wurden, konnten einerseits die einzelnen Kolonien auf den Agarplatten gut ausgezählt werden, andererseits waren die meisten Kolonien bereits vereinzelt, sodass für die Isolation von morphologisch unterschiedlicher Kolonien beziehungsweise Reinkulturen keine zusätzlichen Vereinzlungsschritte mehr durchgeführt werden mussten.

4.4 DNA-Sequenzierung – Identifikation von Reinkulturen

Insgesamt wurden sechs Proben zur Sequenzierung an Eurofins Genomics geschickt. Drei Proben (2D, 3D und 5D) lieferten zufriedenstellende Ergebnisse. Die Proben 1D und 10D stellten sich als „Grenzfall“ zwischen zufriedenstellend und nicht zufriedenstellend heraus. Das Ergebnis der Probe 9D war unzureichend, weshalb dieses in den Ergebnissen nicht angeführt ist.

Neben den Rohdaten der Sequenzen liefert Eurofins Genomics dem Kunden auch bereits maskierte Sequenzen („clipped sequence“). Die Maskierung durch Eurofins Genomics erfolgte in diesem Fall relativ restriktiv, weshalb die geclippten Sequenzen deutlich kürzer waren als die Rohsequenzen. Je kürzer die abzugleichende Sequenz ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine in Wahrheit nicht korrekte Sequenzhomologie – bezogen auf die wahre Gesamtsequenz – in der Datenbank gefunden wird. Die Rohsequenzen wurden deshalb nochmals selbstständig und händisch

kontrolliert und maskiert. Für den Nucleotide-BLAST auf NCBI wurden die selbst maskierten Sequenzen verwendet.

Die schlechte Qualität der Sequenzdaten bei den Proben 1D, 9D und 10D hatte zur Folge, dass die Sequenzen auch noch nach der selbst durchgeführten Maskierung nur mehr 500 bis 700 Basenpaare lang waren. Dies entspricht lediglich der Hälfte der in der colony PCR erwarteten Produktlänge (vgl. Tabelle 5).

Die BLAST-Ergebnisse der Probe 1D lieferte lediglich eine Übereinstimmung von 95 % beziehungsweise 86 %. Bei einem solchen Ergebnis kann nicht mehr garantiert werden, dass die Identifikation bis auf Artniveau korrekt ist. Dies muss beim Betrachten der Tabelle mit den BLAST-Ergebnissen (Tabelle 14) beachtet werden. Das Ergebnis kann für eine Identifikation bis auf Genus-Level ausreichend sein. Eine der beiden Sequenzen der Probe 9D hatte eine Länge von knapp über 1000 Basenpaaren mit einer Übereinstimmung von 96 %. Aufgrund der Tatsache, dass die zweite Sequenz keine signifikante Übereinstimmung mit der Datenbank lieferte, ist auch dieses Ergebnis als nicht zuverlässig einzuschätzen und wurde verworfen. Der „Grenzfall“ von Probe 10D lieferte eine Übereinstimmung von 94 % beziehungsweise 96 %. Das Ergebnis ist nicht zur Gänze zufriedenstellend. Aufgrund der geringeren Übereinstimmung mit der Datenbank ist das BLAST-Ergebnis zu hinterfragen. Es kann nicht garantiert werden, dass das Ergebnis für eine Auflösung auf Artniveau reicht. Die restlichen drei Proben (2D, 3D und 5D) lieferten Übereinstimmungen von 99 % und damit durchaus zuverlässige Ergebnisse.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fütterungssubstrat Gras (Grasschnitt, gemischt mit Wasser)	16
Abbildung 2: Zutaten für das Fütterungssubstrat Gemüse-Obst-Mischung	17
Abbildung 3: Foto einer Agarplatte mit Chromocult®-Nährmedium. Unterschiedliche Farben der Kolonien: <i>E. coli</i> violett, anderer coliforme Bakterien rosarot, andere gramnegative Bakterien weiß.....	21
Abbildung 4: Verwendetes Zahlenraster	27
Abbildung 5: Zusammensetzung der drei Fütterungssubstrate bezogen auf die Frischmasse	34
Abbildung 6: Mittlere Masse der für die Beprobungen entnommenen Fliegenlarven (BP ... Beprobung)	37
Abbildung 7: Gesamtbilanz der einzelnen Versuchsansätze – Pinienhumus, Residuen, gebildete Larvenbiomasse, Metabolismus (HF ... Hühnerfutter, GR ... Gras, GO ... Gemüse-Obst-Mischung).....	38
Abbildung 8: Boxen der sechs Versuchsansätze mit den Residuen (Hühnerfutter, Gras und Gemüse-Obst-Mischung).....	39
Abbildung 9: Erste Kontrolle der Boxen (Tag 14) In den Petrischalen vor den Boxen sind die aussortierten Puppen	40
Abbildung 10: Bestimmte Lebendzellzahl auf der Oberfläche der Fliegenlarven in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat und dem Alter der Larven (BP ... Beprobung)	42
Abbildung 11: Anzahl der Gesamtcoliformen auf der Oberfläche der Fliegenlarven in Abhängigkeit vom Fütterungssubstrat und dem Alter der Larven (BP ... Beprobung)	44
Abbildung 12: Vorkommen von <i>E. coli</i> (BP ... Beprobung)	45
Abbildung 13: Sammlung morphologisch unterschiedlicher Kolonien – Foto der Master-Masterplatte 2 (MMP2)	46
Abbildung 14: Agarosegel der Kontroll-Gelelektrophorese der durchgeführten colony PCR (M ... Marker; NK ... Negativkontrolle).....	47

Alle Abbildungen dieser Arbeit wurden selbst erstellt (Diagramme) oder selbst aufgenommen (Fotos).

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht – Vorbereitung der einzelnen Larvenboxen für die weitere Larvenzucht	14
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung – Standardmedium	20
Tabelle 3: Arbeitsablauf – Waschen der Larven	24
Tabelle 4: Übersicht – Beprobungszeitpunkte und ausplattierte Verdünnungsstufen	25
Tabelle 5: Übersicht – für die colony PCR verwendeten Primer	30
Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die colony PCR (1 Reaktionsansatz à 25 µl)	30
Tabelle 7: Einstellungen des PCR-Thermocycler für die colony PCR	31
Tabelle 8: Zusammensetzung des Agarosegels für die Gelelektrophorese	31
Tabelle 9: Schema der Aliquotierung der PCR-Proben für die Sanger-Sequenzierung durch Eurofins Genomics	33
Tabelle 10: Verhältnis organischer Bestandteile der Fütterungssubstrate zu Hühnerfutter (40:60 gemischt mit Wasser)	35
Tabelle 11: Schema der Fütterung für 50 Larven für 1 Tag	36
Tabelle 12: Anzahl der bei den Kontrollen entfernten Puppen	39
Tabelle 13: Gesamtbilanz der Larvenentwicklung in den einzelnen Boxen zum Zeitpunkt der Beendigung des Versuchs (Tag 19) (Startpopulation: 50 Larven pro Box)	40
Tabelle 14: Ergebnisse des Nucleotide-BLAST auf NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	48
Tabelle 15: Informationen zu den sequenzierten Isolaten Morphologie: KR...Kolonierand, P...Profil, K...Konsistenz, OBFL...Oberfläche, F...Form	49

Alle Tabellen dieser Arbeit wurden selbst erstellt.

7 Literaturverzeichnis

- Bisutti I, Hilke I, Raessler M (2004): Determination of total organic carbon – an overview of current methods. *Trends in Analytical Chemistry* 23, 716–726.
- Buchholz-Cleven B, Rattunde B, Straub K (1997): Screening for Genetic Diversity of Isolates of Anaerobic Fe(II)-oxidizing Bacteria Using DGGE and Whole-cell Hybridization. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 301–309.
- Čičková H, Newton G, Lacy R, Kozánek M (2015): The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Management* 35, 68–80.
- Clariza Samayoa A, Chen W-T, Hwang S-Y (2016): Survival and Development of *Hermetia illucens* (Diptera Stratiomyidae). A Biodegradation Agent of Organic Waste. *Journal of Economic Entomology* 109, 2580–2585.
- Diener S, Studt Solano N, Roa Gutiérrez F, Zurbrügg C, Tockner K (2011): Biological Treatment of Municipal Organic Waste using Black Soldier Fly Larvae. *Waste and Biomass Valorization* 2, 357–363.
- Diener S, Zurbrügg C, Tockner K (2009): Conversion of organic material by black soldier fly larvae. Establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research* 27, 603–610.
- Elhag O, Zhou D, Song Q, Soomro A, Cai M, Zheng L, Yu Z, Zhang J (2017): Screening, Expression, Purification and Functional Characterization of Novel Antimicrobial Peptide Genes from *Hermetia illucens* (L.). *PLOS ONE* 12.
- Erickson M, Islam M, Sheppard C, Liao J, Doyle M (2004): Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *Journal of Food Protection* 67, 685–690.
- Europäische Union (Hrsg.) (2015): Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 1852/2001 der Kommission.

- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2283&from=DE>. Zugegriffen am: 17.05.2018.
- Heussler C, Walter A, Oberkofler H, Insam H, Arthofer W, Schlick-Steiner B, Steiner F (2018): Influence of three artificial light sources on oviposition and half-life of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae): Improving small-scale indoor rearing. PLOS ONE 13.
- Holmes L, Vanlaerhoven S, Tomberlin J (2013): Substrate effects on pupation and adult emergence of *Hermetia illucens* (Diptera Stratiomyidae). Environmental Entomology 42, 370–374.
- Jeon H, Park S, Choi J, Jeong G, Lee S-B, Choi Y, Lee S-J (2011): The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. Current Microbiology 62, 1390–1399.
- Liu Q, Tomberlin J, Brady J, Sanford M, Yu Z (2008): Black Soldier Fly (Diptera Stratiomyidae) Larvae Reduce *Escherichia coli* in Dairy Manure. Environmental Entomology 37, 1525–1530.
- Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D (2013): Brock Mikrobiologie. 13. aktualisierte Auflage. München [u.a.]: Pearson, 1648 Seiten.
- Merck KGaA (Hrsg.) (2007): Microbiology Manual 12th Edition. https://www.analytics-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/millipore-de/Merck_Microbiology_Manual_12th_edition.pdf. Zugegriffen am: 18.04.2018.
- Mülhardt C (2013): Der Experimentator. Molekularbiologie / Genomics. 7. aktualisierte Auflage. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum, 298 Seiten.
- Munk K (2001): Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 500 Seiten.
- Newton G, Booram C, Barker R, Hale O (1977): Dried *Hermetia Illucens* Larvae Meal as a Supplement for Swine. Journal of Animal Science 44, 395–400.
- Nguyen T, Tomberlin J, Vanlaerhoven S (2013): Influence of Resources on *Hermetia illucens* (Diptera Stratiomyidae) Larval Development. Journal of Medical Entomology 50, 898–906.
- Oliveira F, Doelle K, List R, O'Reilly J (2015): Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. Journal of Entomology and Zoology Studies 3, 147–152.

- Park K, Kwak K, Nam S, Choi J, Lee S, Kim H, Kim S (2015): Antibacterial activity of larval extract from the black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera Stratiomyidae) against plant pathogens. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3, 176–179.
- Pastor B, Velasquez Y, Gobbi P, Rojo S (2015): Conversion of organic wastes into fly larval biomass. Bottlenecks and challenges. *Journal of Insects as Food and Feed* 1, 179–193.
- Reinard T (2010): *Molekularbiologische Methoden*. 1. Aufl. Stuttgart: Ulmer.
- Schäfer B, Bandick N, Epp A, Hirsch-Ernst K-I, Pucher J, Schumann R, Spolders M, Wagner B, Lampen A (2016): BfR-Symposium „Insekten als Lebens- oder Futtermittel Nahrung der Zukunft?“. Bericht zum Symposium am 24. Mai 2016. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 11, 281–289.
- Sprangers T, Ottoboni M, Klootwijk C, Ovyne A, Deboosere S, Meulenaer B de, Michiels J, Eeckhout M, Clercq P de, Smet S de (2017): Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 2594–2600.
- St-Hilaire S, Sheppard C, Tomberlin J, Irving S, Newton L, McGuire M, Mosley E, Hardy R, Sealey W (2007): Fly Prepupae as a Feedstuff for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society* 38, 59–67.
- Tomberlin J, Sheppard D (2001): Lekking Behavior of the Black Soldier Fly (Diptera Stratiomyidae). *The Florida Entomologist* 84, 729–730.
- Tomberlin J, Sheppard D, Joyce J (2002): Selected Life-History Traits of Black Soldier Flies (Diptera Stratiomyidae) Reared on Three Artificial Diets. *Annals of the Entomological Society of America* 95, 379–386.
- Turner S, Pryer K, Miao V, Palmer J (1999): Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 327–338.