

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ
FACHBEREICH BIOLOGIE
- INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND WEINFORSCHUNG -

Mikrobielle Prozesskontrolle in Biogasanlagen durch Monitoring der Kohlenstoff- Isotopenverhältnisse im Gasbereich

Microbial process control in biogas plants by monitoring the carbon isotope ratios in the gas sector

Dissertation
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

Tobias May
geboren am 31.12.1986 in Frankenthal

Mainz, im Juli 2015

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 2015

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Veröffentlichungen, Vorträgen und Posterpräsentationen veröffentlicht:

May T., Koch-Singenstreu M., Ebling J., Stantscheff R., Müller L., Jacobi F., Polag D., Keppler, F., König H. (2015). Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analysis of microbial communities in a biogas digester. *Applied Microbiology and Biotechnology* (99) 13, DOI 10.1007/s00253-015-6721-z.

May T., (2015). Transferability of isotopic data to methanogenic pathways - an applicable process tool in biogas plants? Vortrag. 2nd Conference Monitoring & Process Control of Anaerobic Digestion Plants, 17.-18.03.2015, Leipzig.

May T., Polag D., Greule M., Keppler F., Jacobi F., Müller L., König H. (2015). Carbon flows during the anaerobic digestion in biogas plants. Poster. VAAM Jahrestagung, 01.-04.03.2015, Marburg.

May T. (2014). Carbon isotope fractionation during anaerobic digestion in biogas plants. Vortrag. BiogasScience conference, 26. - 29.10.2014, Wien, Österreich.

May T., Polag D., Greule M., Keppler F., Jacobi F., König H. (2013). Methanol in der Biogasanlage - das übersehene Methanogenesesubstrat?! Poster, Jahrestagung des Deutschen Biomasseforschungszentrums (DBFZ), 01.-02.10.2014, Leipzig.

May T., Polag D., Greule M., Keppler F., Jacobi F., König H. (2013). Carbon isotope fractionation of CH₄ and CO₂ during anaerobic digestion in biogas plants. Poster. Annual conference of the German Association for Stable Isotope Research (GASIR), 30.9.-01.10.2013, Braunschweig.

May T., Polag D., Greule M., Keppler F., Jacobi F., Müller L., König H. (in Vorbereitung). Methylophilic pathways in biogas plants: methanol and methane as unexpected microbial substrates in anaerobic biogas digesters.

Polag D., **May T.**, Müller L., Jacobi F., Laukenmann S., König H., Keppler F. (2015). Online monitoring of stable carbon isotopes of methane in anaerobic digestion as a new tool for early warning of process instability. *Bioresource Technology* (eingereicht).

Stantscheff R., **May T.**, Cibis K. G., Dröge S., Polag D., Keppler F., König H. (2013). Isolierung und Charakterisierung von methanogenen Archaea aus Biogasanlagen mit Fokus auf der Gattung Methanobacterium. Poster. KTBL-FNR Kongress Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven, 10.-11.09.2013, Kassel.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	4
1.1	Biogasanlagen als erneuerbarer Weg der Energiegewinnung - Potential und gegenwärtige Situation	4
1.2	Mikrobiologische Prozesse in Biogasanlagen	8
1.2.1	Hydrolyse	9
1.2.2	Acidogenese	9
1.2.3	Acetogenese.....	10
1.2.4	Methanogenese.....	11
1.3	Betrieb und Prozessparameter von Biogasanlagen.....	13
1.4	Isotopenanalysen zum Nachweis von Stoffwechselwegen und C-Flüssen	15
1.5	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte und Laborutensilien	18
2.2	Chemikalien.....	19
2.3	Gase für die Kultivierung und Gaschromatographie	21
2.4	Biochemikalien, Enzyme und Kits	22
2.5	Antibiotika.....	23
2.6	Medien für die Kultivierung aerober Bakterien	23
2.6.1	LB-Nährmedium.....	23
2.6.2	Nährmedium für die Anreicherung methanoxidierender Bakterien	24
2.7	Kultivierung anaerober Bakterien und Archaeen	25
2.7.1	Nährmedien für die anaerobe Kultivierung	26
2.7.2	Vitamin-Stammlösung.....	27
2.7.3	Spurenelement-Stammlösung.....	27
2.8	Referenzstämme	28
2.9	Chemische Analysen	29
2.9.1	Analyse von Gasen	29
2.9.2	Analyse von Methanol.....	29
2.9.3	Analyse von Säuren und Alkoholen	30
2.10	Isotopenanalytik	30
2.10.1	Einsatz stabiler Isotope.....	30
2.10.2	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	31
2.11	Betrieb und Untersuchungen an der Forschungsbiogasanlage	31
2.11.1	Anlagen- und Betriebsparameter	31
2.11.2	DNA-Extraktion aus Fermenterproben	32
2.11.3	Kontinuierliche Isotopenanalytik $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) an der Forschungsbiogasanlage.....	33

2.12	Isolierung von Reinkulturen aus der Forschungsbiogasanlage	34
2.12.1	Mikroskopische Untersuchungen	34
2.12.2	DNA-Extraktion aus Reinkulturen	34
2.12.3	Identifizierung und Reinheitskontrolle mittels PCR.....	35
2.12.4	Sequenzierung und Identifizierung mittels Gendatenbanken	36
2.12.5	Isolation eines hydrogenotrophen Archaeons.....	36
2.12.6	Isolation eines methylotrophen Archaeons.....	37
2.12.7	Isolation eines methylotrophen Bakteriums	37
2.12.8	Isolation eines H ₂ / CO ₂ verbrauchenden Bakteriums	38
2.12.9	Isolation eines syntroph acetatoxidierenden Bakteriums	38
2.12.10	Isolation eines pektinolytischen Bakteriums	39
2.13	Messung der natürlichen Isotopenfraktionierung im Biogas.....	40
2.13.1	Analyse der Kohlenstofffraktionierung im CH ₄ methanogener Reinkulturen.....	40
2.13.2	Analyse substratspezifischer δ ¹³ C (CH ₄)-Werte in Reaktorproben	41
2.14	Untersuchung mikrobieller C- und H ₂ -Flüsse in Biogasanlagen.....	42
2.14.1	Isotopischer Nachweis einer an die acetoklastische Methanogenese gekoppelten hydrogenotrophen Methanbildung	42
2.14.2	Evaluation des Einflusses von H ₂ und CO ₂ auf die Stöchiometrie der hydrogenotrophen Methanogenese mit Formiat.....	44
2.14.3	Untersuchung einer bakteriellen Freisetzung von Methanol aus Pektin.....	45
2.14.4	Isotopischer Nachweis methylotropher Methanogenese in Batchreaktoren.....	46
2.14.5	Isotopischer Nachweis methylotropher Methanogenese für das Isolat <i>Methanosarcina mazei</i> Msc1 bei Angebot mehrerer C-Quellen	46
2.14.6	Untersuchung der Stoffwechselprodukte methylotropher Bakterien.....	46
2.14.7	Untersuchung bakterieller und methanogener Konkurrenzen um Methanol.....	47
2.14.8	Anreicherung methanoxidierender Bakterien in Biogasanlagen	49
2.14.9	Molekularbiologische Analyse der methanotrophen Population im Fermenter	49
2.15	Analyse mikrobieller Populationsdynamiken im Fermenter	52
2.15.1	Entwicklung eines einheitlichen Quantifizierungsstandards für qPCR-Analysen	53
2.15.2	Evaluierung des entwickelten qPCR-Quantifizierungsstandards	59
2.15.3	Durchführung der qPCR zur mikrobiellen Analyse der Reaktorproben.....	59
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Isolate aus der FBGA des DBFZ.....	60
3.1.1	Hydrogenotroph: Isolat <i>Methanobacterium formicicum</i> Mbfl	62
3.1.2	Mixotroph: Isolat <i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	62
3.1.3	Methylotroph und homoacetogen: Isolat <i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ButMet1 ...	63
3.1.4	Sulfatreduzierend und acetatoxidierend: Isolat <i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	63
3.1.5	Syntroph acetatoxidierend: Isolat <i>Tepidanaerobacter acetat-oxydans</i> TepAc1.....	64
3.1.6	Pektinolytischer Methanol-Lieferant: Isolat <i>Streptococcus bovis</i> StrepBov1	64

3.2	Nachweis methanogener Stoffwechselwege über Isotopenanalysen.....	66
3.2.1	Substratspezifische $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte von Reinkulturen.....	66
3.2.2	Substratspezifische $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte in Batchreaktoren.....	67
3.2.3	Fütterungsbedingte Isotopenfraktionierung im DBFZ Forschungsfermenter.....	68
3.3	Untersuchung neuartiger Stoffflüsse von C und H_2	70
3.3.1	Acetat: Methanogene Reduktion der Carboxylgruppe von Acetat.....	70
3.3.2	Formiat: Einfluss von H_2 auf die Stöchiometrie des Formiatabbaus.....	73
3.3.3	Methanol: Freisetzung und Abbau von Methanol im Fermenter.....	75
3.3.4	Nachweis methanoxidierender Bakterien in Biogasanlagen.....	80
3.4	Mikrobielle Populationsdynamiken im Fermenter.....	83
3.4.1	Evaluation des synthetischen DNA-Fragments als einheitlichen qPCR-Quantifizierungsstandard.....	84
3.4.2	qPCR-Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung unter variierenden Prozessbedingungen.....	86
3.5	Die Biozönose beeinflusst das Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4).....	90
4	Diskussion.....	93
4.1	Mikrobielle Populationsdynamiken in Biogasanlagen.....	93
4.2	Methylotrophe Stoffwechselwege im Reaktor.....	98
4.3	$\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) als ein neuer Monitoringparameter?.....	104
4.3.1	Methanogene Reinkulturen zeigen stoffwechselspezifische $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte.....	105
4.3.2	Komplexität der Isotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) der Reaktormikrobiota.....	106
4.3.3	Eine Echtzeitanalytik von $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) ermöglicht Einblicke in den Fermentationsprozess.....	108
5	Zusammenfassung.....	112
6	Ausblick.....	115
7	Literaturverzeichnis.....	116
	Abkürzungsverzeichnis.....	129
	Eidesstattliche Erklärung.....	130

1 Einführung

1.1 Biogasanlagen als erneuerbarer Weg der Energiegewinnung - Potential und gegenwärtige Situation

„Verstärktes Nutzen erneuerbarer Energien vermeidet, dass klimarelevante Gase freigesetzt werden, die bei der Verbrennung fossiler Energieträger entstehen. Zudem erhöhen erneuerbare Energien die Versorgungssicherheit, indem sie die Importabhängigkeit verringern und die Öl-, Gas- und Kohlevorräte schonen. International kann die Nutzung der regional verfügbaren erneuerbaren Energiequellen zur Verringerung politischer Konflikte und Minderung der Armut in weniger entwickelten Ländern durch die Verringerung der Importe fossiler Energieträger beitragen.“

Umweltbundesamt, „21 Thesen zur Klimaschutzpolitik und Begründungen“ 2005, S. 116

Als eines der wirtschaftlich stärksten Länder der Welt trägt Deutschland eine besondere Verantwortung, langfristige und klimaneutrale Konzepte für eine zukünftige Energieversorgung zu entwickeln, welche für die kommenden Generationen Arbeitsplätze und Wohlstand, aber auch nachhaltig den Erhalt einer intakten Umwelt sichern. Bedingt durch den enormen Verlust gesellschaftlichen Vertrauens in die Atomenergie seit der nuklearen Katastrophe im März 2011 in Fukushima, einer hohen Abhängigkeit von Ölimporten aus politisch nicht immer verlässlichen Ländern, einer durch CO₂-Emissionen fortschreitenden Erderwärmung sowie einer Verknappung fossiler Rohstoffe bei weltweit steigendem Energiebedarf, sah sich die Bundesregierung in den letzten Jahren gezwungen, den Ausbau und die Erforschung erneuerbarer Energiequellen voranzutreiben. Dabei konnte durch gezielte Fördermaßnahmen ein gewaltiger Aufschwung im Bereich der nachhaltigen Energieträger, insbesondere im Zuwachs von Wind- und Solarenergie, erreicht werden. Ergänzt durch eine steigende Zahl an Biogasanlagen erfolgte im Jahre 2014 bereits 25,7 % der Bruttostromerzeugung aus regenerativen Energieträgern, wobei von der Regierung bis zum Jahre 2035 (BMWI 2015) ein Anteil von 55 - 60 % angestrebt wird (Abbildung 1). Neben Strom benötigt die Bundesrepublik noch einmal zusätzlich rund viermal so viel Energie zur Erzeugung von Wärme sowie zur Gewährleistung von Mobilität (Umweltbundesamt 2014). Der Einsatz von elektrischer Energie zur Deckung des Mobilitäts- oder Wärmebedarfs erfordert sowohl einen massiven Ausbau der Stromnetze als auch die Entwicklung von Speicherkonzepten und ist im Wirkungsgrad einer direkten Versorgung mit Biogas unter Nutzung des Gasnetzes nicht unbedingt überlegen.

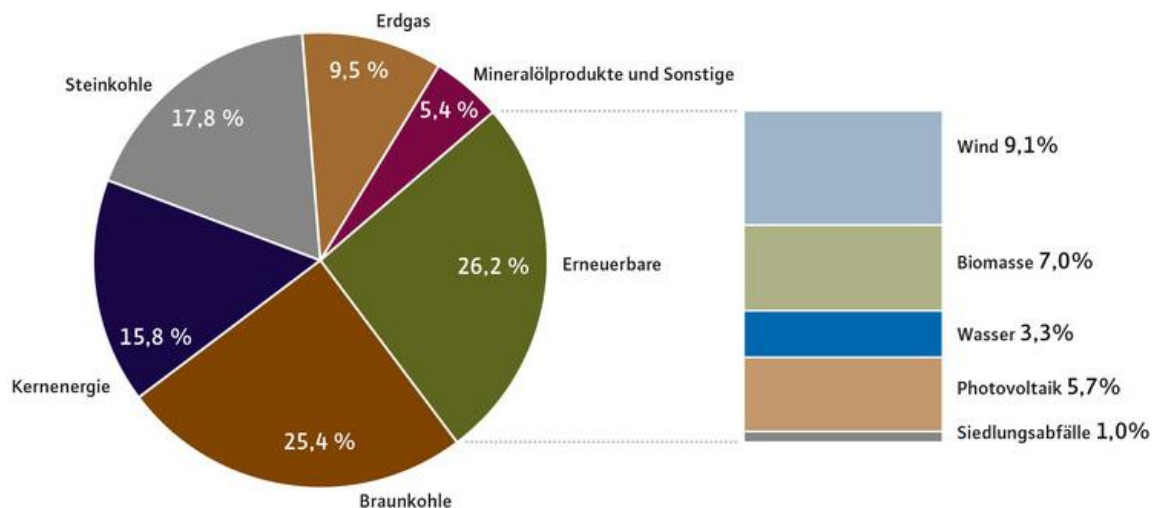


Abbildung 1 Brutto-Stromerzeugung im Jahre 2014 in Deutschland nach Energieträgern (BDEW 2015).

Mit rund 8.000 Biogasanlagen und einer installierten elektrischen Leistung von über 4 MW (Fachverband Biogas 2014), die rund 11 Millionen Haushalte mit Strom versorgen können, ist Deutschland derzeit unangefochtener Marktführer im Bereich der anaeroben Fermentation von Biomasse zur Energiegewinnung. Dabei kann Biogas sowohl als hochwertiger Energieträger zur direkten Verstromung in Blockheizkraftwerken als auch zur Gewinnung von Wärme über Verbrennung oder Kraftwärmekopplung eingesetzt werden. Nach einer weiteren Aufreinigung sowie Reduzierung des CO₂-Anteils kann das Gasgemisch zudem in das örtliche Erdgasnetz eingespeist werden und somit Haushalten zur Verfügung stehen. Aufgrund seiner Speicherbarkeit kann Biogas darüber hinaus auch zum mobilen Antrieb von Gasmotoren in Fahrzeugen eingesetzt werden.

Eine Reduzierung der staatlichen Subventionen seit der Novelle des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes (EEG) im Jahre 2012 führte jedoch zu einem signifikanten Rückgang an Neubauten weiterer Biogasanlagen. Seitdem gilt es, die Effizienz der großen Zahl bestehender Anlagen zu optimieren und für ein „Power-on-demand“-Konzept für die Zukunft umzurüsten. Dabei soll Strom aus Biomasse künftig aufgrund der Speicherbarkeit von Biogas vermehrt zur flexiblen Stromproduktion eingesetzt werden können, um so die Versorgungslücken von Solar- und Windkraftstrom auszugleichen. Auch zu Spitzenlastzeiten dieser beiden erneuerbaren Energieträger, welche insbesondere während windreicher Sonnentage für die Netzbetreiber eine hohe Herausforderung darstellen können, kann über ein „Power-to-Gas“-Verfahren, in dem durch eine elektrisch katalysierte Hydrolyse von Wasser und einer externen Einspeisung von CO₂ in Biogasanlagen energetisch nutzbares CH₄ gewonnen wird, Überschussstrom verbraucht und in Form von Biogas gespeichert werden. Um diese Flexibilität gewährleisten zu können, ist ein effektiver und stabiler Fermentationsprozess notwendig, der eine dynamische Belastung erlaubt, sodass zu Zeiten erhöhter Stromnachfrage eine schnelle elektrische Grundversorgung abgesichert werden kann. Hinzu kommt, dass vermehrt organische Abfälle in Biogasanlagen eingesetzt werden, welche sonst unter Entwicklung klima- und gesundheitsschädlicher Gase verbrannt oder kompostiert werden müssten.

Allerdings gestaltet sich die Steuerung eines so flexiblen Fermentationsprozesses aufgrund der variablen Substratzusammensetzung und einem zunehmenden Einsatz schwer vergärbare Substanzen wie Cellulose und Lignin sehr kompliziert, sodass immer höhere Anforderungen an die Prozessmesstechnik in Biogasanlagen gestellt werden. Dies liegt daran, dass die Mikrobiologie in Fermentern mit variierenden Prozessbedingungen und Substraten deutlich stärker beeinflusst wird als in kontinuierlich befütterten Bioreaktoren mit permanent gleicher Raumbelastung. Dadurch kann es zu spontanen Störungen wie einer Übersäuerung oder der Bildung von Schaum oder Schwimmschichten kommen, welche die Gasproduktion signifikant reduzieren können. Die Folge sind häufig lange Ausfälle, die für den Betreiber einen hohen finanziellen Verlust bedeuten können. Um dies zu vermeiden, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Messmethoden entwickelt, welche eine gezieltere Steuerung und Kontrolle des Gärprozesses ermöglichen sollen. Dabei wird von der Prozessmesstechnik erwartet, dass sie Störungen frühzeitig erkennt, sodass ein zeitnahes Handeln möglich ist. Problematisch ist dabei, dass die meisten fermentationsrelevanten Parameter bislang nur diskontinuierlich überwacht werden können. So erfordert beispielsweise die Analyse des Säurespektrums (VFA), der Pufferkapazität (FOS / TAC) und des Trockenmasseanteils sowie des Gehalts an Spurenelementen und Ammoniumstickstoffs ($\text{NH}_4\text{-N}$) eine teilweise sehr aufwendige Untersuchung des Gärsubstrates im Labor, dessen Ergebnisse dem Betreiber in der Regel erst mehrere Tage versetzt zur Verfügung stehen. Da diese Messungen zudem nur eine Momentaufnahme des Fermentationszustandes abbilden können, kann die Reaktion des Betreibers auf veraltete Laborergebnisse sogar kontraproduktiv sein. So gelten viele Parameter wie etwa ein erniedrigter pH-Wert oder ein Anstieg der Säurekonzentration zwar als zuverlässige Indizien für eine Prozessstörung, sind jedoch aufgrund der hohen Pufferkapazität des Gärsubstrates ein oftmals zu spätes Anzeichen einer bereits stattfindenden Hemmung.

Kontinuierlich überwacht werden können bislang schon die Gaszusammensetzung (CH_4 , CO_2 , H_2S , O_2 , H_2) und -menge, der pH-Wert, das Redoxpotential, die Substrattemperatur, der Reaktorfüllstand sowie der Gasdruck. Vielversprechende Ergebnisse lieferte zudem die Anwendung eines Nahinfrarotspektrometers (NIRS), welches anhand spezifischer Kennlinien im nahinfraroten Bereich die Substratzusammensetzung und Konzentration einiger Säuren sowie $\text{NH}_4\text{-N}$ ermitteln kann (Liane Müller, Daten unveröffentlicht, DBFZ Leipzig, 2015). Allerdings erfordert diese Messtechnik eine aufwendige Anlagen- und substratspezifische Kalibrierung und ist aufgrund der Platzierung des Messkopfes im Gärsubstrat sehr wartungsintensiv.

Darüber hinaus konnte durch zahlreiche Studien der vergangenen Jahre ein Einblick in die komplexe Zusammensetzung der Mikrobiologie in Biogasanlagen gewonnen werden. Mithilfe molekularbiologischer Methoden sowie der Isolierung zahlreicher bakterieller und methanogener Spezies aus dem Gärsubstrat gelang es bereits, einen Teil der häufig als „Black Box“ (Collins et al. 2006) bezeichneten Mikrobiota eines Fermenters aufzuklären. Dabei scheint die mikrobielle Zusammensetzung maßgeblich für die Effizienz des Biogasprozesses entscheidend zu sein. Dieser für den Betreiber nur schwer mess-

bare Parameter beschäftigt seit einigen Jahren zahlreiche Genetiker und Mikrobiologen, die mithilfe verschiedener Fingerprint-Techniken wie Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (Hori et al. 2006; Karakashev et al. 2005), Klonierungs- und Sequenzierungsverfahren (Zhu et al. 2011; Klocke et al. 2008), denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (Stantscheff et al. 2014; Weiss et al. 2008), Einzel-Strang konformativen Polymorphismus / SSCP (Kampmann et al. 2012; Bauer et al. 2008), 454-Pyrosequenzierung (Rademacher et al. 2012; Schlüter et al. 2008), specific amplified polymorphic DNA-PCR Verfahren (Stantscheff 2013), terminalem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (Ziganshin et al. 2012) sowie quantitativer real-time PCR (Kampmann et al. 2012; Nettmann et al. 2010; Yu et al. 2005) zu einem näheren Verständnis der mikrobiellen Reaktionen beitragen. Die Kenntnis dieser Prozesse ist für ein Verständnis und eine Interpretation der chemischen Laborparameter, wie beispielsweise dem Säurespektrum oder der Gaszusammensetzung, von hoher Bedeutung, da nur so Prozessstörungen adäquat entgegengewirkt werden kann. Allerdings sind die oben genannten mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden sehr zeitaufwendig und kostspielig, weshalb sie für Routineanalysen des Prozesszustandes nur bedingt geeignet sind.

In diesem Zusammenhang stellt die Analyse der Isotopenverhältnisse von CH_4 ein mögliches, alternatives Verfahren dar, um dominante mikrobielle Reaktionspfade während der Biogasbildung zu identifizieren. So konnte bereits in vielfältigen Habitaten wie in Sedimenten von Seen (Conrad et al. 2007; Graaf et al. 1996), Reisfeldern (Kruger et al. 2002; Fey und Conrad 2000), Sumpfbereichen (Avery et al. 1999), sowie in mit kommunalen Abwässern oder Feststoffabfällen betriebenen Reaktoren (Francioso et al. 2010; Qu et al. 2009) und Biogas-Laborfermentern (Lv et al. 2014; Nikolausz et al. 2013) festgestellt werden, dass sich die Isotopenverhältnisse im Biogas je nach Relevanz der einzelnen methanogenen Reaktionspfade verändern können. Dabei sind die bisherigen Ergebnisse auf Untersuchungen an Laborreaktoren oder Batchansätze begrenzt, wobei zudem meist keine kontinuierliche Messung der Isotopensignaturen erfolgte (Polag et al. 2013; Laukenmann et al. 2010). So könnte die Anwendung einer permanenten Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse im CH_4 des Biogases ein hohes Potential für ein weiteres Verfahren zur Kontrolle des anaeroben Fermentationsprozesses in Biogasanlagen aufweisen, weshalb die Möglichkeiten dieser Technik im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten. Dies erforderte jedoch neben der Entwicklung einer adäquaten Messtechnik zunächst ein tiefes Verständnis der mikrobiellen Stoffwechselwege und ihres Einflusses auf die Isotopenverhältnisse in einer Biogasanlage, sodass die Ergebnisse der Isotopenmessungen hinreichend interpretiert und Handlungsanweisungen für den Betreiber entwickelt werden können.

1.2 Mikrobiologische Prozesse in Biogasanlagen

Die anaerobe Fermentation von organischem Material zu Biogas, einem Gasgemisch, welches aus etwa 50 - 75 Vol.-% CH_4 , 25 - 45 % Vol.-% CO_2 sowie geringen Anteilen Wasserdampf, H_2S , H_2 , O_2 und N_2 zusammengesetzt ist, verläuft im Rahmen eines komplexen, mehrstufigen Abbauprozesses, in denen zahlreiche Bakterien und methanogene Archaeen beteiligt sind (Abbildung 2). Dabei entsteht Biogas durch die mikrobielle Zersetzung von Biomasse bereits seit vielen Millionen Jahren auf natürliche Weise in Sumpflandschaften, Reisfeldern, Meeren, Seen und Intestinaltrakten von Säugern und Termiten (Merlin Christy et al. 2014). Dieser Prozess wird sich in großtechnischen Biogasanlagen industriell zu Nutze gemacht, indem Gülle und Mist aus der Tierhaltung, nachwachsende Rohstoffe („NawaRo“) wie Mais, Zuckerrüben oder Getreide sowie organische Abfälle und Abwässer in einem Fermenter unter anaeroben Bedingungen vergoren werden, um so energetisch wertvolles Biogas zu gewinnen.

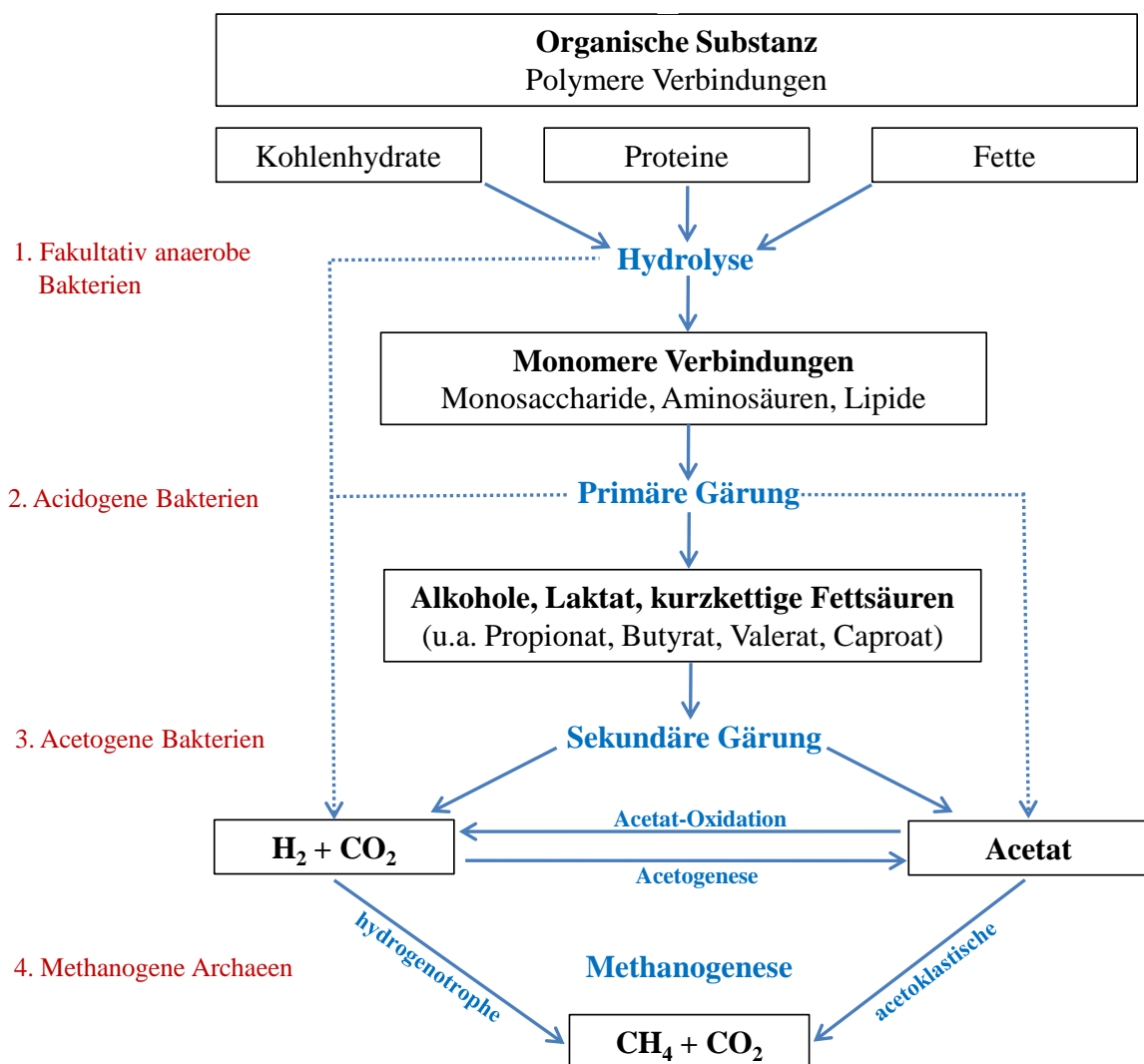


Abbildung 2 Schematische Darstellung des mehrstufigen, anaeroben Fermentationsprozess von Biomasse in Biogasanlagen unter Berücksichtigung der verschiedenen Organismengruppen und Stoffflüsse. Verändert nach Merlin Christy et al. 2014; Schlömann und Reineke 2007.

Grundsätzlich lässt sich der Prozess in vier mikrobiologische Abbauphasen untergliedern, welche durch unterschiedliche Organismengruppen katalysiert und aufgrund ihrer Reaktionen oder Produkte als Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese bezeichnet werden.

1.2.1 Hydrolyse

Während der Hydrolyse werden zunächst die komplexen, polymeren Bestandteile der eingebrachten Gärsubstrate wie Kohlenhydrate, Fette und Proteine in kleinere, mono- und oligomere Spaltprodukte zerlegt. Durch die Aktivität zahlreicher hydrolytischer Bakterien wie beispielsweise Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio* oder *Bacteriodes*, welche in der wässrigen Umgebung zahlreiche Exoenzyme wie Lipasen, Proteasen, Amylasen und Glucosidasen sekretieren, können die hochmolekularen Substrate gelöst und für weitere Organismen erschlossen werden (Schlüter et al. 2008; Cirne et al. 2007). Da insbesondere zelluläre Struktursubstanzen wie Cellulose, Hemicellulose, Pektin und Lignin nur sehr langsam zersetzt werden können, kann die Hydrolysestufe je nach eingebrachten Gärsubstraten zu dem geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt in Biogasanlagen werden (O'Sullivan 1997; Noike et al. 1985), weshalb vermehrt Enzyme sowie mechanische, chemische oder thermische Zerkleinerungsverfahren unterstützend eingesetzt werden. Allerdings weisen hydrolytische sowie acidogene Bakterien signifikant höhere Wachstumsraten als methanogene Archaeen auf, weshalb je nach Gärsubstrat auch die Methanogenese zum limitierenden Reaktionsschritt im anaeroben Biomasseabbau werden kann (Khanal 2011; Bischofsberger 2005). Neben H_2 und CO_2 , welches direkt von hydrogenotrophen methanogenen Archaeen zu CH_4 reduziert werden kann, ist insbesondere während der Fütterung proteinreicher Substrate auch eine Entstehung von NH_3 und H_2S festzustellen. Wie im Laufe der Arbeit zudem gezeigt werden wird, kann in der Hydrolysephase auch Methanol entstehen, welches von methyloptrophen methanogenen Archaeen reduziert werden kann.

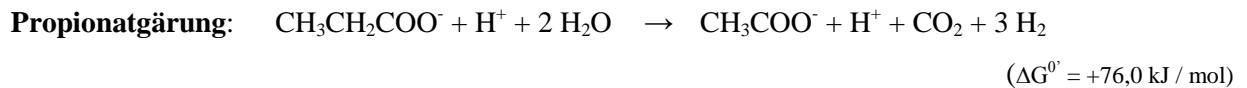
1.2.2 Acidogenese

Aufgrund ähnlicher Spezies und Reaktionsprodukte ist der Übergang zur Acidogenese fließend. Dabei werden Zucker, Aminosäuren und langkettige Fettsäuren, welche während der Hydrolyse gebildet wurden, von primären Gärern in kleinere Produkte wie kurzkettige Fettsäuren (u.a. Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat und Caproat), Laktat, Succinat und Alkohole gespalten. Zudem entsteht erneut H_2 und CO_2 , welche wiederum direkt als Methanogenese substrat genutzt werden können. Je nach H_2 -Partialdruck und pH-Wert kann das Spektrum an Gärprodukten der acidogenen Bakterien variieren, wobei insbesondere bei hohen Fütterungsmengen an leicht fermentierbaren Substraten ein Überschuss an H_2 entstehen kann, welcher zu einer erhöhten Präsenz von Gärungswegen für C3- bis C7-Säuren führen kann. Infolgedessen kann es zu einer Versäuerung des Prozesses kommen, welche die bevorzugt im leicht basischen Milieu agierenden methanogenen Archaeen nachhaltig hemmen kann, sodass eine regelmäßige Überwachung des Säurespektrums für die Gewährleistung eines stabilen Fermentationsprozess unverzichtbar ist. Da hydrolytische und acidogene Bakterien die effektivsten Abbauraten in

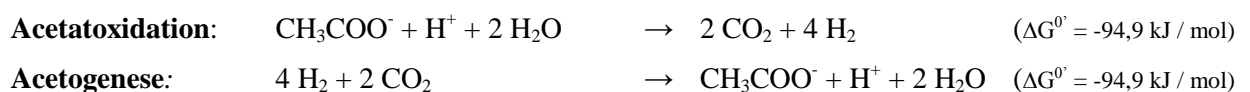
einem sauren pH-Bereich zwischen 4,5 - 5,5 (Merlin Christy et al. 2014) aufweisen, wird in vielen Biogasanlagen die Hydrolyse und Acidogenese in einem eigenen Fermenter durchgeführt, während in einem Folgereaktor mit einem leicht basischen pH-Wert zwischen 6,8 - 7,8 ideale Bedingungen für acetogene sowie methanogene Spezies gewährleistet werden können.

1.2.3 Acetogenese

Im nächsten Schritt werden die Abbauprodukte der Acidogenese von strikt anaeroben Bakterien über verschiedene Gärungswege zu Acetat, H₂ und CO₂ vergoren. Die sekundären Gärer in Biogasanlagen stammen unter anderem aus den Gattungen *Acetobacterium*, *Clostridium*, *Syntrophomonas*, *Propionibacterium*, *Peletomaculum*, *Syntrophospora*, *Smithella*, *Tepidanaerobacter* oder *Eubacterium* und sind aufgrund einiger Enzyme des Acetyl-CoA Weges sehr empfindlich gegenüber O₂. Zudem weisen viele der acetogenen Spezies nur sehr langsame Wachstumsraten auf. Sie benötigen dabei aufgrund einiger thermodynamisch ungünstiger Gärungswege eine produktseitig niedrige H₂-Konzentration (Thauer et al. 2008), weshalb sie auf syntrophe Gemeinschaften mit sulfatreduzierenden Bakterien oder methanogenen Archaeen angewiesen sind, welche über einen „Inter-Species-Hydrogen-Transfer“ das entstehende H₂ entfernen können (Bok et al. 2004; Imachi et al. 2000; Schink 1997; Schmidt und Ahring 1995). Hierbei verläuft insbesondere der Abbau von Propionsäure unter energetischen Gesichtspunkten sehr unvorteilhaft, da pro Molekül Propionsäure drei H₂ entstehen, welche aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden müssen (Felchner-Zwirello 2014):



Aus diesem Grund können die meisten Reaktionen der Acetogenese nur unter niedrigen H₂-Partialdrücken unterhalb von 10⁻⁴ bar exergon erfolgen (Bischofsberger 2005). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von H₂ in der wässrigen Phase ist daher eine nahe, räumliche Lokalisation der acetogenen Bakterien mit den H₂-akzeptierenden Spezies für einen Abbau der Fettsäuren unabdingbar (Sekiguchi et al. 1998), sodass ein schnelles Entfernen des H₂ aus der Reaktion erfolgen kann. Ferner existieren zwei Stoffwechselwege, die auch für die Analyse der Isotopenverhältnisse im CH₄ eine hohe Relevanz haben können, da über sie eine gegenläufige Konversion potentiell methanogener Substrate erfolgen kann. So oxidieren syntrophe Bakterien wie *Tepidanaerobacter acetatoxydans* Acetat zu CO₂ und H₂, während homoacetogene Bakterien wie *Butyribacterium methylotrophicum* wiederum CO₂ und H₂ zu einem Molekül Acetat umsetzen können und somit entweder Substrat für hydrogenotrophe, oder acetoklastische methanogene Archaeen liefern:



1.2.4 Methanogenese

Die finale Biogasbildung findet durch methanogene Archaeen statt, welche die bislang einzigen bekannten Spezies sind, die im Rahmen ihres Stoffwechsels CH_4 bilden können. In Biogasanlagen wurden bislang nur Vertreter der Euryarchaeota nachgewiesen, welche wiederum aus den Ordnungen Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales und Methanosarcinales stammten. Die strikt anaeroben methanogenen Archaeen verfügen über ein Substratspektrum aus C1 und einigen C2 Verbindungen, welche unterschiedliche Methanogesewege metabolisiert werden können (Tabelle 1).

Tabelle 1 Überblick über ausgewählte Stoffwechselreaktionen und Substrate methanogener Archaeen sowie der dabei ermöglichte Energiegewinn als Gibbs'sche freie Energie (ΔG^0) unter Standardbedingungen nach Khanal 2011; Thauer et al. 2008; Keltjens und Vogels 1993.

Methanogenese	Substrate	Reaktion	ΔG^0 (kJ / mol)
hydrogenotroph	$\text{H}_2 + \text{CO}_2$	$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-131,0
	Formiat	$4 \text{HCOO}^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-144,5
acetoklastisch	Acetat	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-36,0
methyloolithotroph	Methanol	$4 \text{CH}_3\text{OH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$	-106,5
		$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-112,5
	Monomethylamin	$4 \text{CH}_3\text{NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	-76,7
	Dimethylamin	$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$	-74,8
	Trimethylamin	$4 (\text{CH}_3)_3\text{N} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	-75,8
	Methanthiol	$(\text{CH}_3)\text{SH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{S}$	-69,3
	Dimethylsulfid	$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S}$	-53,1

Während der hydrogenotrophen Methanogenese wird CO_2 zunächst an Methanofuran gebunden und anschließend über das Coenzym Tetrahydromethanopterin und Coenzym M schrittweise vom Formyl- zum Methenyl-, Methylen- und schließlich Methylniveau reduziert. Die finale Bildung von CH_4 erfolgt anschließend durch die Methyl-Coenzym M-Reduktase, welche die an das Coenzym M gebundene Methylgruppe löst und reduziert, während das nun oxidierte Coenzym M mit Coenzym B einen Heterodisulfidkomplex bilden kann und anschließend durch H_2 wieder regeneriert wird. In der acetoklastischen Methanogenese wird die Methylgruppe des Acetats zu CH_4 reduziert, während die Carboxylgruppe als CO_2 frei wird. Dabei wird Acetat zunächst in der Zelle unter ATP-Verbrauch zu Acetyl-CoA aktiviert, welches im Anschluss zu CoA, CO und Methyleinheiten, welche an das Enzym Kohlenmonooxyd-Dehydrogenase / Acetyl-CoA-Synthase (CODH / ACS) gebunden sind, gespalten wird. Während CO unter Beteiligung von Wasser und einer Reduktion von Ferredoxin in Form von CO_2 frei wird, kann die Methylgruppe über weitere Cofaktoren auf Coenzym M transferiert werden, wobei die finale Reduktion zu CH_4 wie in der hydrogenotrophen Methanogenese erfolgt. Obwohl an drei Stellen der acetoklastischen Methanogenesereaktion ein Gradient durch Protonen- bzw. Na^+ -Ionen erzeugt wird, welche zur Energiegewinn über die ATP-Synthase auf die äußere Membranseite gepumpt werden, ist der Netto-Energieertrag aufgrund der initialen Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA deutlich geringer als in den

anderen Methanogenesereaktionen. Auch in der methylotrophen Methanogenese erfolgt eine Disproportionierung der methylierten Verbindungen, wobei die Methylgruppen des Substrates zunächst über zwei Methyltransferasen und ein Corrinoid-Protein auf Coenzym M übertragen werden. Von dort aus werden drei Viertel der Methylgruppen am Coenzym zu CH₄ reduziert, während ein Viertel der Methylgruppen gegenläufig der hydrogenotrophen Methanogenese schrittweise zu CO₂ oxidiert wird, um Elektronen für die Heterodisulfid-Reduktase vermittelte Regeneration der Coenzyme M und B bereitzustellen (Merlin Christy et al. 2014; Thauer et al. 2008; Schlömann und Reineke 2007).

Innerhalb von Bioreaktoren können die umfangreiche Ordnung Methanobacteriales, welche bis auf die auf H₂ angewiesene, methylotrophe Gattung *Methanosphaera* nur hydrogenotrophe Spezies umfasst, sowie die vorwiegend in marinen Sedimenten vorherrschende Ordnung Methanococcales H₂ / CO₂ und, bzw. oder Formiat als Energiequelle nutzen. Die Ordnung Methanomicrobiales verfügt hingegen, mit Ausnahme von *Methanospirillum hungatei*, nur über heterotrophe Spezies. Des Weiteren besteht die Ordnung Methanosarcinales aus der ausschließlich Acetat verwertenden Familie Methanosaetaceae, sowie der mixotrophen Familie Methanosarcinaceae. Letztere stellt die metabolisch vielseitigste Gruppe methanogener Archaeen, welche in der Regel über mehrere Stoffwechselwege Energie gewinnen können. So kann beispielsweise *Methanosarcina mazei* hydrogenotroph, acetoklastisch sowie methylotroph kultiviert werden.

In der Biogasanlage reduzieren hydrogenotrophe methanogene Archaeen CO₂ aus den vorangegangenen Abbaustufen mithilfe von H₂ zu CH₄. Dabei wird vermutet, dass je nach Substrat rund 70 % des gesamten in Biogasanlagen produzierten CH₄ aus der hydrogenotrophen Methanogenese entstammt, sodass diesem Reaktionsweg eine hohe Bedeutung zukommt (Nettmann et al. 2010; Bauer et al. 2008). Ferner wird Acetat von Methanosarcinales oder in Tandem-Reaktionen aus syntroph acetatoxidierenden Bakterien und hydrogenotrophen Archaeen verwertet, wobei neben CH₄ auch größere Mengen an CO₂ entstehen. Die Bedeutung des methylotrophen Methanogeneseweges in Biogasanlagen ist bislang wenig erforscht und gilt aufgrund einer kaum messbaren Konzentration an kurzkettigen, methylierten Verbindungen als wenig relevant. Die Signifikanz sowie die Kohlenstoffflüsse methylotropher Stoffwechselwege wird am Beispiel von Methanol im Rahmen dieser Studie näher untersucht werden.

Zuletzt können die meisten Substrate der methanogenen Archaeen auch von sulfatreduzierenden Bakterien genutzt werden, welche aufgrund der Möglichkeit, SO₄²⁻ als finalen Elektronenakzeptor zu nutzen, eine höhere Affinität zu den C-Quellen aufweisen und somit direkte Konkurrenten darstellen können (Plugge et al. 2011; Dar et al. 2008; Lovley et al. 1982).

1.3 Betrieb und Prozessparameter von Biogasanlagen

Im Prinzip erfordert die Vergärung von Biomasse zu Biogas nur eine möglichst anaerobe Kammer und Temperaturen von etwa 25 – 55 °C, um den mikrobiellen Fermentationsprozess starten zu können. Auf diese Weise werden von Kleinbauern schon seit vielen Jahrzehnten auf der ganzen Welt einfache Bioreaktoren betrieben, in denen tierische und häusliche Nebenprodukte vergoren werden können, um Dünger sowie wertvolles Biogas zum Kochen, Heizen und Beleuchten zu erhalten. Alleine in China vermutet man über 5 Millionen dieser Biogasanlagen, die häufig nicht mehr als ein mit Folie oder Stroh zugedecktes Loch sind und neben der Bereitstellung von Energie auch für eine verbesserte Hygiene durch die Entsorgung organischer Abfälle sorgen können (Eder und Krieg 2012). Industrielle Biogasanlagen, wie sie vorwiegend in westlichen Ländern zu finden sind, streben hingegen eine maximale und konstante Biogausbeute an und verwandeln den grundsätzlich einfach Gärprozess in ein hochtechnisiertes Verfahren. Fermenter, mit mehreren tausend m³ Volumen, beheizbaren Wandungen und elektrischen Rührwerken gehören mittlerweile zum Standard (Abbildung 3). Um einen möglichst konstanten Fermentationsprozess aufrecht zu erhalten, werden häufig mehrmals am Tag oder kontinuierlich Substrate über einen Feststoffdosierer oder Förderschnecken in den Gärraum eingebracht. Dabei werden bevorzugt Stoffe vergoren, die eine hohe Biogausbeute ermöglichen. Neben tierischen Exkrementen kommen seit etwa 15 Jahren zunehmend größere Anteile pflanzlicher Substrate hinzu, die aufgrund ihrer hohen Trockensubstanz (TS) einen wesentlich höheren Energiegehalt aufweisen. Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe ermöglicht signifikant höhere Biogausbeuten, führt jedoch im Rahmen der häufig geführten „Teller-Tank“-Diskussion zu Kontroversen in der Gesellschaft. Der Einsatz organischer Abfälle wie Grünschnitt, Speisereste, Schlachtabfälle sowie Abwässer werden dabei in Zukunft eine immer höhere Bedeutung erlangen.

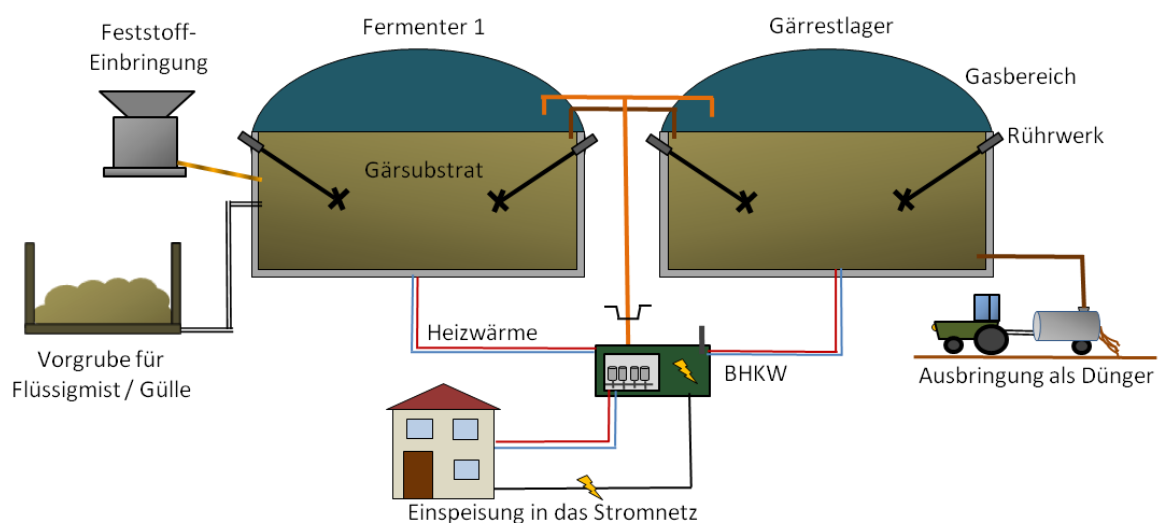


Abbildung 3 Schematische Aufbau einer landwirtschaftlichen Biogasanlage, in der sowohl Flüssigmist als auch feste Gärsubstrate wie nachwachsende Rohstoffe eingebracht werden.

In der Regel erfolgt die anaerobe Vergärung der organischen Substrate in Biogasanlagen bei mesophilen (37 - 42 °C) oder thermophilen (50 - 57 °C) Temperaturen, wobei letzteres Verfahren höhere Umsatzraten, kürzere hydraulische Verweilzeiten des Gärsubstrates sowie schnellere mikrobielle Wachstumsraten ermöglicht. Allerdings gilt der thermophile Betrieb aufgrund einer geringeren Biodiversität als stör anfälliger und weist zudem durch den erhöhten Wärmebedarfs eine schlechtere Energiebilanz auf (Kaltschmitt 2009). Dagegen ist die hydraulische Verweilzeit, ein theoretisches Maß für die Aufenthaltszeit eines Substrates im Fermenter, im thermophilen Betrieb verkürzt. Je nach Reaktortyp kann die Verweilzeit zwischen 10 und mehr als 150 Tagen betragen. Entscheidend ist zudem der Grad der Raumbelastung, welche angibt, wie viel kg organische Trockensubstanz (oTS) in den Fermenter je m³ Nutzvolumen und Zeiteinheit (d) eingebracht werden. Dies kann je nach Substratmischung variieren, wobei sich in NawaRo-Biogasanlagen Raumbelastungen zwischen 3 - 4 kg oTS / (m³ × d) bewährt haben (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 2013). Höhere Raumbelastungen können zwar zu einer größeren Ausbeute an Biogas führen, haben aber die Gefahr, dass es aufgrund einer schnellen Hydrolyse und Acidogenese zu einer vermehrten Bildung kurzkettiger Fettsäuren kommen kann, die sich aufgrund einer zunehmenden Hemmung der letzten beiden Prozessstufen im Reaktor ansammeln und so den Prozess nachhaltig stören können. Dabei reagiert der pH-Wert, welcher in der Regel im leicht basischen Bereich zwischen pH 7 - 8 liegt, aufgrund der hohen Pufferkapazität des Gärsubstrates nur sehr träge und ist daher ein unzureichender Prozessparameter. Alternativ wird häufig die Konzentration an flüchtigen organischen Säuren (FOS) im Verhältnis zur noch vorhandenen Pufferkapazität, dem Gehalt an „total anorganischem Carbonat“ (TAC) betrachtet. Eine weitere Störung kann durch die Fütterung proteinreicher Substrate auftreten, indem die Konzentration an für die Mikroorganismen toxischem, freiem NH₃ zunimmt. Aufgrund dessen wird an den meisten Anlagen routinemäßig der Gehalt an Ammoniumstickstoff (NH₄-N) gemessen, wobei aufgrund des pH- und temperaturbedingten Gleichgewichtes von NH₄⁺ und NH₃ der Gesamtgehalt an N, untersucht wird.

Häufig werden zwei Fermenter in Reihe betrieben, sodass im ersten Reaktor ein für die hydrolytischen und acidogenen Bakterien optimierter, saurer pH-Wert aufrecht erhalten werden kann, während im zweiten Reaktor die wesentliche CH₄-Bildung in für methanogene Archaeen idealen Bedingungen erfolgen kann. Während der Gärrest am Ende der Verweilzeit auf dem Acker als wertvoller, im Vergleich zur unvergorenen Gülle weniger saurer Dünger ausgebracht werden kann, stehen zur Nutzung des Biogases mehrere Optionen zur Verfügung. So kann das Gasgemisch nach einer Entschwefelung und Trocknung direkt in einem Blockheizkraftwerk unter Gewinnung von Strom und Wärme verbrannt werden, oder aber weiter konzentriert und in das bestehende Erdgasnetz oder einen Gasspeicher eingeleitet werden.

1.4 Isotopenanalysen zum Nachweis von Stoffwechselwegen und C-Flüssen

Ziel dieser Arbeit war es, die Ergebnisse einer kontinuierlichen Messung der C-Isotopenverhältnisse im produzierten CH₄ einer Biogasanlagen mikrobiologisch zu interpretieren und zu untersuchen, ob anhand der Isotopensignaturen Rückschlüsse auf potentiell dominierende, methanogene Stoffwechselreaktionen gezogen werden können. Hierzu soll zunächst kurz in das Gebiet der Isotopenanalysen eingeführt werden.

Grundsätzlich bestehen Atome aus einer Elektronenhülle und einem Atomkern, der bei leichten Atomen mit Ausnahme von Wasserstoff in der Regel aus einer gleichen Anzahl positiv geladener Protonen und ladungsfreier Neutronen zusammengesetzt ist. Das Atomgewicht eines chemischen Elements ist dabei maßgeblich durch die Menge der in etwa gleich schweren Protonen und Neutronen bestimmt. Als Isotope (gr. ἴσος τόπος = am gleichen Platz [im Periodensystem]) bezeichnet man chemische Elemente, die bei gleichbleibender Anzahl an Protonen und Elektronen eine variierende Menge an Neutronen aufweisen und dadurch in der Regel eine erhöhte Masse besitzen. In der Natur liegen nahezu alle Elemente als ein Gemisch aus einer oder mehrerer isotopischer Formen vor. So sind beispielsweise neben dem stabilen Isotop ¹²C mit 98,89 % Anteil rund 1,11 % des weltweiten Kohlenstoffs in Form des weiteren stabilen Isotopes ¹³C und etwa 10⁻⁹ % als ¹⁴C zu finden. Letzteres wird jedoch aufgrund seines radioaktiven Zerfalls nicht zu den stabilen Isotopen gezählt (Mortimer et al. 2014; Mook und Rozanski 2000; Lieser 1991). Dabei kann die relative Häufigkeit der Isotope eines Elementes als das Isotopenverhältnis R definiert werden:

$$R = \frac{\text{Häufigkeit des schwereren Isotopes}}{\text{Häufigkeit des leichteren Isotopes}}$$

Bei Übertragung auf Moleküle können z.B. die Isotopenverhältnisse von CH₄ beschrieben werden als

$${}^{13}\text{R}(\text{CH}_4) = \frac{{}^{13}\text{CH}_4}{{}^{12}\text{CH}_4}$$

$${}^2\text{R}(\text{CH}_4) = \frac{\text{C}^2\text{H}_4}{\text{C}^1\text{H}_4}$$

Während die chemische Charakteristik eines Elements und seiner Isotope nahezu identisch ist, weisen Isotope deutlich veränderte physikalische Eigenschaften auf, die wiederum einen erheblichen Einfluss auf die Kinetik biochemischer Reaktionen haben können. Dies ist unter anderem auf eine niedrigere Kollisionsfrequenz sowie auf eine erhöhte Bindungsenergie der schwereren Isotope mit anderen Atomen zurückzuführen, aufgrund dessen eine größere Aktivierungsenergie für Reaktionen mit schweren Isotopen erforderlich ist (Mook und Rozanski 2000; Lieser 1991). Mit Blick auf Stoffwechselforgänge führt dies neben einer veränderten Diffusionsgeschwindigkeit auch zu einem höheren Umsatz isotopisch leichter Substrate in enzymatisch vermittelten Reaktionen. In Folge dieses kinetischen Effektes

kommt es zu einer sogenannten Isotopenfraktionierung, bei der sich zunehmend das schwere, reaktions-träge Isotop im Substrat anreichert, während das leichtere Isotop vermehrt in das Produkt übergeht und so langfristig eine Verschiebung des Isotopenverhältnisses auftritt. Dieses Phänomen betrifft vor allem Elemente mit geringerem atomarem Gewicht, da hier die Massenunterschiede zu den schwereren isotopischen Formen am deutlichsten sind. Da in der Natur die allermeisten Elemente in einer oder mehreren isotopischen Grundformen vorliegen, bezeichnet man diese Verteilungsreaktionen auch als natürliche Isotopenfraktionierung.

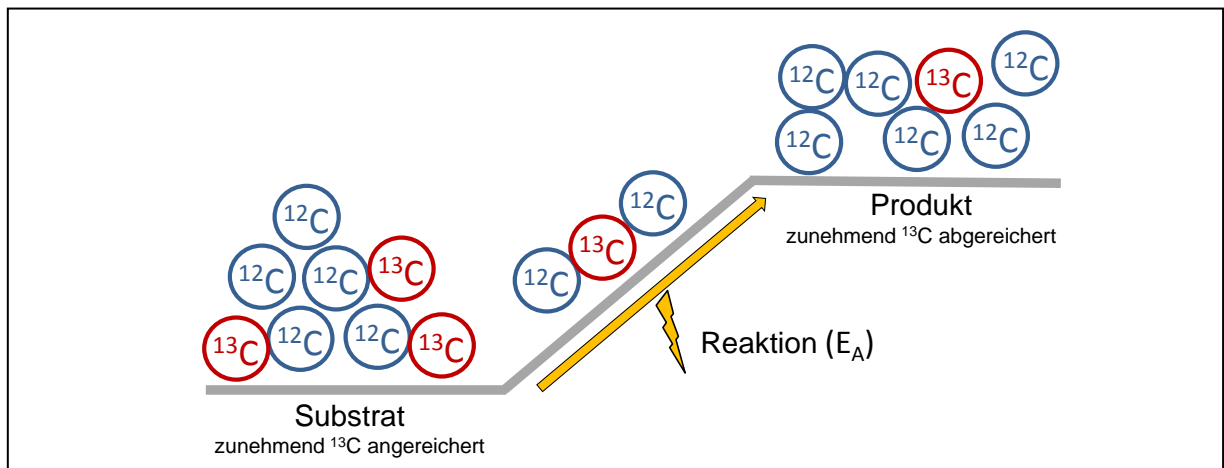


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Kohlenstofffraktionierung in einer enzymatischen Reaktion. Das Enzym setzt bevorzugt das leichtere ^{12}C -Isotop um, sodass es zunehmend zu einer Verschiebung der Isotopenverhältnisse im Substrat und dem Produkt kommt.

Im Falle der Methanogenesereaktionen wurde dabei bereits in Studien an Reinkulturen festgestellt, dass acetoklastische, methanogene Archaeen das ^{13}C -Isotop etwas weniger diskriminieren als etwa hydrogenotrophe Methanbildner. In der Folge treten geringfügig angereichertere Isotopenverhältnisse im CH_4 acetoklastischer Archaeen auf, während bei hydrogenotrophen, methanogenen Spezies ein kleinerer Anteil an $^{13}\text{CH}_4$ im Biogas gemessen wird (Conrad 2005; Whiticar 1999; Balabane et al. 1987). Aufgrund dessen ist es grundsätzlich möglich, über eine massenspektrometrische Analyse von Biogasproben den dominanten methanogenen Stoffwechselweg anhand seiner charakteristischen Isotopenverhältnisse im CH_4 zu identifizieren.

Um selbst minimale Isotopenverhältnisse in einer Probe beschreiben zu können, werden diese häufig mit der bekannten isotopischen Zusammensetzung eines international anerkannten Standards verglichen. Für Kohlenstoff wird in der Regel die Isotopie des Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) Standards, für Wasserstoff- und Sauerstoffisotopenverhältnisse das Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) verwendet. Um das absolute Isotopenverhältnis R in einer Probe mit dem eines anerkannten Isotopenstandards vergleichen zu können, wird häufig der sogenannte Delta-Wert (δ -Wert) in ‰ angegeben:

$$\delta_{\text{Probe}} = \frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Standard}}}{R_{\text{Standard}}} \times 1000 \text{ ‰}$$

So lässt sich beispielsweise das Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) für den Kohlenstoff in CH_4 wie folgt berechnen:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{CH}_4) = \frac{\left(\frac{^{13}\text{CH}_4}{^{12}\text{CH}_4}\right)_{\text{Probe}} \times \left(\frac{^{13}\text{CH}_4}{^{12}\text{CH}_4}\right)_{\text{VPDB}}}{\left(\frac{^{13}\text{CH}_4}{^{12}\text{CH}_4}\right)_{\text{VPDB}}} \times 1000 \text{ ‰}$$

Auch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Isotopenverhältnisse im Biogas werden zur Vereinheitlichung und Vergleichbarkeit in Form der δ -Werte $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4), $\delta^{13}\text{C}$ (CO_2) sowie $\delta^2\text{H}$ (CH_4) dargestellt.

1.5 Ziele der Arbeit

Mithilfe mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden sollte untersucht werden, ob anhand von kontinuierlich ermittelten Isotopenverhältnissen ($\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)) im Biogas eines Forschungsreaktors Rückschlüsse auf aktuell dominierende mikrobielle Stoffwechselwege gezogen werden können. Ziel war es, die Anwendbarkeit eines Laser-Absorptionsspektrometers als ein neues Verfahren zur Kontrolle des mikrobiellen Fermentationsprozess zu überprüfen. Dabei sollte zunächst in Reinkulturanzuchten verschiedener methanogener Isolate untersucht werden, ob eine substratspezifische C-Isotopensignatur im CH_4 identifiziert werden kann, sodass eine Unterscheidung der hydrogenotrophen, acetoklastischen sowie methylotrophen Methanogenese anhand der Isotopenverhältnisse möglich ist. In einem nächsten Schritt sollten die Ergebnisse mit der Isotopenfraktionierung in mit Reaktorsubstrat beimpften Batchansätzen verglichen werden. Durch eine Kombination verschiedener bakterieller sowie methanogener Isolate aus dem Forschungsreaktor galt es im Anschluss, weitere mikrobielle Interaktionen und C-Flüsse mittels isotopenmarkierter (^{13}C , ^2H) Substrate und chromatographischer Verfahren (GC, HPLC) zu detektieren, sodass zusätzliche, die Isotopenverhältnisse potentiell beeinflussende Reaktionen aufgezeigt werden können. Ein Schwerpunkt sollte dabei insbesondere auf den methylotrophen Stoffwechselwegen liegen, deren Vorkommen und Verlauf in Biogasanlagen bislang ungeklärt ist. Bei verschiedenen Raumbelastungen im Fermenter sollte darüber hinaus durch eine regelmäßige Analyse der Zusammensetzung der Reaktormikrobiota erforscht werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Isotopenverhältnissen im Biogas und der mikrobiellen Populationstruktur vorliegt, sodass Störungen in relevanten methanogenen sowie bakteriellen Prozessen anhand der Echtzeit-Isotopenanalytik frühzeitig erkannt werden können.

2 Material und Methoden

Im Folgenden sind zunächst die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Geräte, Chemikalien, Gase und Reaktionskits aufgeführt. Nicht weiter aufgeführte Laborausstattung entsprach den allgemein üblichen Laborstandards.

2.1 Geräte und Laborutensilien

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete Geräte, Software und Laborutensilien.

Gerät	Hersteller	Modell
Anaerobenzelt	Coy Laboratory Systems	Vinyl Glove Box, Michigan, USA
Autoklaven	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald	FVS/1
	Systec GmbH, Wettenberg	VX
Brutschränke	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen	2736
	Binder, Tuttlingen	BD Serie
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	Sub-Cell [®] Model 96 Wide Mini-Sub [®]
Fluoreszenzfilter	FAHF Analysentechnik, Tübingen	HC-434/17, HC-BS 452, HC-458RS
Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Neu-Isenburg	Biozero BZ8000
Gas Aufbewahrung für Isotopenanalytik	Labco, High Wycombe	3,5 ml Exetainer
Gaschromatographen	Shimadzu, Koyoto, Japan	GC-2010
	Shimadzu, Koyoto, Japan	GC-2014
	Agilent, Santa Clara, USA	HP 6890N
Gassammelsäcke	Supelco Analytical, Bellefonte, USA	Supel [™] Inert Foil Gas sampling bag
Geldokumentationseinheit	Vilber Lourmat, Eberhardzell	Bio Vision CN 300
Heizrührplatte	Variomag, Daytona Beach, FL, USA	Multitherm + 40 ST Thermomodul
HPLC	Shimadzu, Koyoto, Japan	LC14A, RID-10A
IRMS	ThermoQuest Finnigan, Bremen	Delta ^{PLUS} XL
Kulturenschüttler	New Brunswick Scientific, Edison, USA	Excella E24
Laborwaagen	Sartorius AG, Göttingen	Laboratory L610; Analytic A120S
pH-Messelektrode	Mettler Toledo GmbH, Gießen	Inlab Expert
pH-Messgerät	Schott, Hofheim	CG840
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg	BioPhotometer Plus
Pipetten	Starlab International GmbH, Hamburg	ErgoOne
Reinstwasseranlage	Merck-Millipore, Darmstadt	RiOs inkl. Milli-Q Plus 185
Schüttel-Agitatoren	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen	Vibrofix VF1 electronic
	Starlab International GmbH, Hamburg	Vortex Wizard
Schüttel-Heizblöcke	HLC BioTech, Bovenden	HTM 130
	Eppendorf AG, Hamburg	Thermomixer Comfort

Gerät	Hersteller	Modell
Software	CLC bio, Aarhus, Dänemark	CLC Sequence Viewer 7.6
	Geospiza Inc., Seattle, USA	FinchTV 1.4
	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA	NCBI MegaBLAST, NCBI PrimerBLAST
	Shimadzu, Koyoto, Japan	GC Solution 2.32.00
	Eppendorf AG, Hamburg	realplex 2.2.
Spannungsgeber	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	Power Supply Model 3000/300
Thermocycler / PCR	Eppendorf AG, Hamburg	Mastercycler gradient
Thermocycler / qPCR	Eppendorf AG, Hamburg	Realplex ² egradient S Mastercycler
Ultraschallbad	Bandelin Electronics, Berlin	Sonorex RK 106
Vacuum-Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg	Concentrator 5301
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Trenton, NJ, USA	Laboport
Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg	5415D, 5430
	VWR International GmbH, Darmstadt	Micro Star 17

2.2 Chemikalien

Tabelle 3 Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien und ihre Bezugsorte.

Substanz	Bezugsort
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Aminobenzoesäure, p-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromethansulfonsäure Natriumsalz, 2-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Buttersäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Calziumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cetyltrimethylammoniumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cobaltchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cobaltsulfat	Merck KGaA Darmstadt
Cystein-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-Calziumpantothenat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eisenchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Substanz	Bezugsort
Eisensulfatheptahydrat	Merck KGaA Darmstadt
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, reinst (99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fluoracetat, Natrium-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Folsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucopyranose, 3-O-Methyl-D-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Marcor, New Jersey, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumaluminiumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Liponsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lumazin 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mangansulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natrium-DL-Laktat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumselenit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumsulfid x 9 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumthioglykolat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronwasserglas	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nikotinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pektin C, Veresterungsgrad ca. 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Substanz	Bezugsort
Polygalacturonsäure $\geq 85\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Propionsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PVPP K25	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pyridoxin-HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Resazurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Riboflavin	Merck KGaA, Darmstadt
Roti [®] -Mount FluorCare	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schwefelsäure (96 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Thiamin-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vitamin B ₁₂	Merck KGaA, Darmstadt
Zinkdichlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zinksulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.3 Gase für die Kultivierung und Gaschromatographie

Für die Kultivierung methanogener Archaeen und Bakterien wurden verschiedene Reinstgase sowie Gasgemische von der Firma Westfalen AG, Münster, bezogen (Tabelle 4).

Tabelle 4 Gase und ihre Reinheitsgrade für die anaerobe Kultivierung sowie gaschromatographische Analysen.

Gas	Zusammensetzung / Reinheitsgrade
Formiergas	95 % N ₂ , 5 % H ₂
Helium	100 % He 5.0
Kohlendioxid	CO ₂ 4.5
Methan	CH ₄ 4.5
Stickstoff	N ₂ 5.0
Stickstoff / Wasserstoff Gemisch 1	80 % N ₂ , 20 % H ₂
Stickstoff / Wasserstoff Gemisch 2	20 % N ₂ , 80 % H ₂
Stickstoff / Kohlendioxid Gemisch	80 % N ₂ , 20 % CO ₂
Synthetische Luft	21 % O ₂ , 79 % N ₂
Wasserstoff	100 % H ₂ 4.5
Wasserstoff / Kohlendioxid Gemisch	80 % H ₂ , 20 % CO ₂

2.4 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Tabelle 5 Verwendete Biochemikalien, Enzyme und Reaktionskits.

Produkt	Hersteller	Konzentration / Produktname
Desoxynukleotid-Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Je 2,5 mM
DNA-Extraktions Kit	EURx Ltd., Danzig, Polen	GeneMATRIX Stool Purification Kit
DNA-Extraktions Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande	DNeasy Blood & Tissue Kit
DNA-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	GeneRuler™
DNA-Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	6 x
Gel-DNA-Extraktions Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	GenElute™ Gel Extraction Kit
Klonierungs-Kit	Invitrogen™ by life technologies™, Carlsbad, CA, USA	TOPO® TA Cloning® Kit
PCR-DNA-Aufreinigung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	GenElute™ PCR Clean-Up Kit
	Affymetrix, Santa Clara, USA	ExoSAP-IT®
PCR-Reaktionspuffer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Reaktionspuffer Y for high yields
<i>Pfu</i> Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, St-Leon-Rot	2,5 U / µl
Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	FastAP Thermosensitive alkalische Phosphatase, 1 U / µl
Plasmid Präparations Kit	Peqlab, Erlangen	E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit 1
qPCR-Reaktionsgefäße, 8er Streifen, weiß	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	EasyStrip snap tubes, 200 µl
qPCR-Reaktionskit	Bio-Rad, Hercules, USA	SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix
Restriktionsendonuclease <i>HhaI</i>	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	10 U / µl
Restriktionsendonuclease <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>)	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	10 U / µl
Restriktionsendonuclease <i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	10 U / µl
Restriktionspuffer	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot	Tango Puffer
<i>Taq</i> Polymerase	Peqlab, Erlangen	peqGOLD Taq-DNA-Polymerase, 5 U / µl

2.5 Antibiotika

Für die Isolierung methanogener Archaeen aus Reaktorproben wurden verschiedene Antibiotika zur Hemmung des bakteriellen Wachstums eingesetzt. Diese ermöglichten außerdem bei Klonierungsansätzen ein selektives Anziehen von Zellen, die aufgrund einer erfolgreichen Transformation von rekombinanter DNA spezifische Antibiotikaresistenzen besaßen. Sämtliche Antibiotika wurden bei Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, bezogen. Die sterile Antibiotikazugabe erfolgte nach dem Autoklavieren der Nährmedien aus zuvor angesetzten Stammlösungen, deren Konzentrationen in Tabelle 6 angegeben sind.

Tabelle 6 Eingesetzte Antibiotika und Konzentration ihrer Stammlösungen. Diese wurde in einer 1000fach verdünnten Endkonzentration in den Nährmedien eingesetzt.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung
Ampicillin (Natriumsalz)	100 mg / ml, gelöst in Reinstwasser
Cycloserin	50 mg / ml, gelöst in Reinstwasser
Kanamycin	50 mg / ml, gelöst in Reinstwasser
Tetracyclin	15 mg / ml, gelöst in DMSO
Vancomycin-Hydrochlorid	50 mg / ml, gelöst in DMSO

2.6 Medien für die Kultivierung aerober Bakterien

2.6.1 LB-Nährmedium

Die selektive Kultivierung von kompetenten *E. coli* erfolgte im Rahmen von Klonierungen auf flüssigem oder festem LB-Nährmedium bei pH 7,0 (Tabelle 7). Die Zugabe des Antibiotikums Kanamycin erfolgte nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C).

Tabelle 7 Zusammensetzung von LB-Nährmedium mit Kanamycin für die Kultivierung nach Klonierungen.

Substanz	Menge
Pepton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
(Agar)	15 g
Kanamycin (50 µg / ml)	1 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml

2.6.2 Nährmedium für die Anreicherung methanoxidierender Bakterien

Für die Anreicherung methanoxidierender Bakterien aus Fermenterproben wurde Nitratmineralsalz (NMS) 131-Medium (NCIMB 2015) verwendet, dessen Rezeptur in Tabelle 8 aufgeführt ist.

Tabelle 8 Zusammensetzung von NMS 131-Medium (NCIMB 2015) zur Anreicherung methanoxidierender Bakterien.

Lösung	Substanz	Menge
Lösung 1: 10x NMS-Salzlösung	KNO_3	10 g
	$\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	10 g
	CaCl_2	2 g
	dH_2O	1000 ml
Lösung 2: Eisen-EDTA	FeEDTA	3,8 g
	dH_2O	100 ml
Lösung 3: Natriummolybdat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	260 mg
	dH_2O	100 ml
Lösung 4: Spurenelemente	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
	H_3BO_3	0,02 g
	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
	EDTA-diNatriumsalz	0,25g
	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
	$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Lösung 5: Phosphatpuffer (pH 6,8)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	71,6 g
	KH_2PO_4	26 g

Zur Herstellung des NMS 131-Mediums wurden 100 ml der Lösung 1 mit dH_2O auf 1000 ml verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 ml der Lösung 2 sowie je 1 ml der Lösungen 3 und 4. Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min wurden 10 ml des separat autoklavierten Phosphatpuffers (Lösung 5) steril in das abgekühlte Nährmedium hinzugegeben. Zur Anreicherung methanoxidierender Bakterien wurden 12 ml Anaeroben-Kulturröhrchen mit 5 ml Nährmedium und eine Gasatmosphäre aus 80 % CH_4 und 20 % synthetischer Luft bei einem Überdruck von 1 bar gewählt. Die Kultivierung erfolgte anschließend bei 39 °C in Kulturenschüttlern (180 rpm).

2.7 Kultivierung anaerober Bakterien und Archaeen

Die Isolierung und Kulturhaltung anaerober Bakterien und methanogener Archaeen wurde in den Nährmedien DSM 63, 334, 287, 318 und 120 durchgeführt (DSMZ 2015a, 2015b, 2014a, 2014b, 2014c) die von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, empfohlen wurden (Tabelle 9). Diese unterscheiden sich vornehmlich in ihrer Kohlenstoffquelle (C-Quelle) und dienten als Ausgangsbasis für weitere Modifizierungen wie beispielsweise die Zugabe stabiler Isotope oder weiterer C-Quellen. Zur Herstellung wurden sämtliche Substanzen bis auf Methanol und die reduzierenden Agenzien Cystein und $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ in Serumflaschen zusammengeführt und in dH_2O gelöst. Nach einer Entgasung für 1 h unter einem Exsikkator erfolgte die Einstellung des jeweiligen pH-Wertes (Tabelle 9). Unter der Formiergas-Atmosphäre (95 % N_2 , 5% H_2) eines Anaerobenzeltes (Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA) erfolgte die Zugabe der reduzierenden Agenzien. Dadurch kam es zu einem Farbumschlag des blaufarbenen pH- und Redoxindikators Resazurin. Dieser reagiert zunächst irreversibel unter Abspaltung eines Sauerstoffatoms zu dem rosafarbenen Resorufin. Unterhalb eines Redoxpotentials von -110 mV geht diese in die farblose Leukoform Dihydroresorufin über (Ružička et al. 1966). Da letztere Reaktion reversibel ist, konnten spätere Sauerstoffeinträge in die Nährmedien anhand des Farbumschlages identifiziert werden – eine Maßnahme, die insbesondere bei der Kultivierung der strikt anaeroben methanogenen Archaea unabkömmlich erschien.

In der Regel wurden 20 ml Anaeroben-Kulturröhrchen mit 5 bzw. 10 ml Nährmedium verwendet, welche mithilfe von Butylstopfen und Schraubverschlüssen gasdicht verschlossen wurden. Größere Anzuchten erfolgten zu 20 ml in 100 ml Serumflaschen mit Butylstopfen und Aluminiumkrampe. In allen Ansätzen wurde eine Gasatmosphäre von 1,5 bar eingestellt, die je nach Nährmedium variierte (Tabelle 9). Für die Kultivierung hydrogenotropher Archaeen sowie homoacetogener Spezies wurde die C-Quelle in Form eines H_2 / CO_2 -Gasgemisches (Tabelle 4) angeboten, welche in täglichen bis wöchentlichen Abständen erneuert wurde. Die Begasung der Kulturmedien erfolgte an einer in Kooperation mit der Fa. Dräger, Lübeck, entwickelten Begasungseinheit, über welche ein flexibles Zuführen verschiedener Gase und Drücke möglich war. Die Begasung fand durch sterile Gasfiltereinheit über Einweg-Kanülen statt, mit welchen die Butylstopfen der Kulturgefäße durchstochen werden konnten.

2.7.1 Nährmedien für die anaerobe Kultivierung

Tabelle 9 Zusammensetzung der Nährmedien für die anaerobe Kultivierung auf Basis der von der DSMZ, Braunschweig empfohlen Konzentrationen (¹DSMZ 2015a, ²2015b, ³2014a, ⁴2014b, ⁵2014c, ⁶2014d). Diese wurden in den meisten Fällen leicht modifiziert („-mod“). DSM 287-mod diente als Grundmedium für die Zugabe weiterer C-Quellen wie Pektin, Glucose oder Formiat, wobei dann eine N₂-Gasatmosphäre eingestellt sowie auf die Zugabe von Natriumacetat verzichtet wurde.

Substanz	DSM 287-mod ³	DSM 318-mod ⁴	DSM 334-mod ²	DSM 120-mod ⁵	DSM 63 ¹
K ₂ HPO ₄	0,3 g	-		0,35 g	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g	0,3 g	0,3 g	0,23 g	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,15 g	-		0,5 g	2,0 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		0,1 g	0,1 g		
NaCl	0,5 g	0,6 g	0,6 g	2,250 g	
NaHCO ₃	4,0 g			2,0 g	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O				2,0 mg	0,5 g
Natriumacetat	(2,0 g)		6,8 g	2,5 g	
Na ₂ -EDTA			1,0 mg		
Na ₂ SO ₄					1,0 g
NH ₄ Cl	2,0 g	1,0 g	1,0 g	0,5 g	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 g			-	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g	0,08 g	0,08 g	0,25 g	0,1 g
KHCO ₃		2,0 g	4,0 g		
Methanol		5,0 ml		10,0 ml	
Na-DL-Laktat					2,0 g
Cystein-HCl	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	
Natriumthioglykolat					0,1 g
Ascorbinsäure					0,1 g
Vitaminlösung (DSM 141)	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml
Spurenelementlösung	10,0 ml (DSM 141 ⁶)	10,0 ml (DSM 318 ⁴)	10,0 ml (DSM 141 ⁶)	10,0 ml (DSM 141 ⁶)	10,0 ml (DSM 141 ⁶)
Resazurin	1,0 mg	1,0 mg	1,0 mg	1,0 mg	1,0 mg
dH ₂ O	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Gasatmosphäre (1,5 bar)	(80 % H ₂ , 20 % CO ₂)	100 % N ₂	100 % N ₂	80 % H ₂ , 20 % CO ₂	80 % N ₂ , 20 % CO ₂
pH-Wert	7,0	6,8	7,0	6,8	7,8

2.7.2 Vitamin-Stammlösung

Tabelle 10 Vitamin-Stammlösung, nach DSMZ Nährmedium 141 (DSM 2014d). Einwaagen für 1,0 l. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Substanz	Menge
Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-HCl	10,0 mg
Thiamin-HCl	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nikotinsäure	5,0 mg
DL-Calcium-Pantothenat	5,0 mg
Vitamin B ₁₂	0,1 mg
p-Aminobenzoesäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg
Wasser (MilliQ, R = 18,2 mΩ)	1000 ml

2.7.3 Spurenelement-Stammlösung

Tabelle 11 Spurenelement-Stammlösungen, nach den DSMZ-Nährmedien 141 (DSMZ 2014d) und 318 (DSMZ 2014b). Einwaagen für 1,0 l. Die Lösungen wurden steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Substanz	nach DSM 141	nach DSM 318
Nitrilotriessigsäure	1,5 g	12,8 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,0 g	
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O		0,1 g
NaCl	1,0 g	1,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	
FeCl ₃ x 6 H ₂ O		1,35
CoSO ₄ x 6 H ₂ O	0,18 g	
CoCl ₂ x 6 H ₂ O		24,0 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10 g	0,1 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O		0,25 g
ZnCl ₂		0,1 g
ZnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,18 g	
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	10,0 mg	
Kal(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	20,0 mg	
H ₃ BO ₃	10,0 mg	10,0 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10,0 mg	24,0 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	25,0 mg	0,12 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3 mg	26,0 mg
Wasser (MilliQ, R = 18,2 mΩ)	1000 ml	1000 ml

Sämtliche Kultivierungsarbeiten fanden in der sauerstofffreien Gasatmosphäre des Anaerobenzeltes statt, wobei die Nährmedien in der Regel mit Inokula zwischen 2,5 - 10 % v / v mithilfe steriler 1 ml Spritzen und 1 ¼ Kanülen beimpft wurden. Sofern gasförmige C-Quellen (CO₂, CH₄) appliziert wurden, erfolgte die Kultivierung in einem Kulturschüttler bei 39 °C und 180 rpm. Alle übrigen Spezies wurden als Standkultur bei 39 °C im Brutschrank angezogen.

2.8 Referenzstämme

Als Referenzstämme für molekularbiologische Analysen sowie zur isotopengestützten Untersuchung von Kohlenstoffflüssen wurden methanogene Archaea aus vier Ordnungen bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen GmbH, Braunschweig, bezogen (Tabelle 12). Dabei wurden Organismen ausgewählt, deren Vorkommen in Biogasanlagen bereits häufig detektiert worden war (Stantscheff et al. 2014; Kampmann et al. 2012; Klocke et al. 2008; Zhu et al. 2011; Klocke et al. 2008). Ferner wurde das *Methanosaeta concilii* verwandte Isolat Mst1.3 (Stantscheff 2013) hinzugezogen. Die Kultivierung erfolgte wie in Abschnitt 2.7 beschrieben. Dabei wurden die Spezies *Methanobacterium formicicum* MF, *Methanobacterium formicicum* MF und *Methanococcus thermolithotrophicus* SN-1 in Nährmedium DSM 287-mod, *Methanosarcina mazei* S-6 in den Medien DSM 318-mod sowie DSM 120-mod und *Methanosaeta concilii* FE bzw. Isolat Mst1.3 im Nährmedium DSM 334-mod kultiviert (Tabelle 9).

Tabelle 12 Überblick und Charakteristika der verwendeten Referenzorganismen.

H = hydrogenotrophe, A = acetoklastische und M = methylotrophe Methanogenese, ^T = Typstamm.

Referenzstamm	DSMZ-Nr.	Morphologie	Methanogenese
<i>Methanobacterium formicicum</i> MF	1535 ^T	Stäbchen, oft in Ketten	H
<i>Methanobacterium formicicum</i> MF	3045 ^T	Unregelmäßige Kokken	H
<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> SN-1	2095 ^T	Kokken	H
<i>Methanosarcina mazei</i> S-6	2053 ^T	Kokken in Paketen	H, A, M
<i>Methanosaeta concilii</i> FE	3013	Lange Filamente	A
<i>Methanosaeta concilii</i> Isolat Mst1.3 ¹	-	Lange Filamente	A

¹Stantscheff 2013

2.9 Chemische Analysen

2.9.1 Analyse von Gasen

Der Nachweis gasförmiger Substrate und Produkte von Isolaten und Anreicherungen erfolgte mittels Gaschromatographie (GC), wobei eine Methode entwickelt wurde, die eine präzise Detektion und Quantifizierung der Gase H₂, N₂, CH₄ und CO₂ ermöglichte. Dadurch konnte die Aktivität methanogener Archaea sowie methanotropher, syntropher und homoacetogener Bakterien anhand der CH₄- und CO₂-Konzentration in den Kulturgefäßen und Batchreaktoren ermittelt werden. Die Messung erfolgte an einem Gaschromatographen (GC 2014, Shimadzu, Duisburg) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor und Autosampler über eine Supelco SII 100 / 120 Carbosieve Säule (30 m × 0,25 mm, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Hierfür wurde folgendes isotherme Programm verwendet: Injektor 170 °C, Säule 170 °C, Detektor 200 °C; Trägergas 25 ml / min He. Dabei wurden jeweils 3 ml Gasprobe über eine gasdichte 10 ml Spritze mit Absperrventil (Hamilton, Reno, NV, USA) aus den Kulturgefäßen entnommen und unter Einstellen eines leichten Überdrucks in gasdichte 1,5 ml Probengefäße (Gewindeflaschen N 9 mit PTFE / Silikon-Septum, Macherey-Nagel, Düren) transferiert. Hiervon wurde über einen Autosampler 0,2 ml in die Säule injiziert. Dabei konnte H₂ nach 1:15 min, CH₄ nach 4:55 min und CO₂ nach 8:40 min Retentionszeit quantifiziert werden.

2.9.2 Analyse von Methanol

Um neben den acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogenesewegen auch methylotrophe Stoffwechselforgänge im Fermenter untersuchen zu können, wurde eine gaschromatographische Methode entwickelt, die einen Nachweis von Methanol im Promille-Bereich ermöglichte. Die Auftrennung fand hierbei an einer Optima WaxPlus (30 m × 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren) Kapillarsäule mit einer polaren Phase aus Polyethylenglykol, in einem Gaschromatographen (GC2010 Plus, Shimadzu, Duisburg) mit Optic-4 Injektor und Flammenionisationsdetektor (FID) statt.

Die Messung erfolgte bei 260 °C Injektor- und Detektortemperatur, während die Säule mit einem Gradienten von 12 °C / min von 40 °C auf 260 °C temperiert wurde. Zur Analyse wurden 0,1 µl der Probe von einem Autosampler in den Injektor eingespritzt und ein Split von 1:50 eingestellt. He diente als Trägergas, für den FID wurden zusätzlich 40 ml / min H₂, 400 ml / min synthetische Luft und 30 ml / min N₂ als Make-up Gas verwendet. Nach einer Retentionszeit von 2:35 min konnte Methanol und nach 2:45 min Ethanol getrennt und quantifiziert werden.

Vor der Messung mussten die Proben zunächst aufgereinigt werden. Hierzu wurden 1 ml der flüssigen Kulturmedien oder Reaktorproben für 2 min bei 16.000 × g (5415D, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand über einen 0,2 µm Cellulosefilter weiter bereinigt und in 1,5 ml Probengefäße (Macherey-Nagel, Düren) überführt. Für spätere Analysen wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt. Wurden höhere Methanolkonzentrationen (> 0,1 g / l) erwartet, wurden die Messungen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt (2.9.3).

2.9.3 Analyse von Säuren und Alkoholen

Zur Charakterisierung verschiedener bakterieller Isolate wurde auch das fermentationstypische Säurespektrum analysiert. Dabei standen vor allem die Bildung bzw. der Abbau von Essigsäure im Interesse. Bei Batchversuchen mit Reaktorsubstrat konnte zudem noch der Anteil an Propion- und Buttersäure, Laktat sowie in geringerer Sensitivität Methanol und Ethanol ermittelt werden. Die Analyse fand hierbei mittels HPLC (LC14A, Shimadzu, Duisburg) an einer Aminex HPX87H Säule (300 x 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, USA) und einem Brechungsindexdetektor (RI-Detektor, RID-10A, Shimadzu, Duisburg) statt. Dabei erfolgte die Auftrennung isokratisch mit 0,005 M H₂SO₄ als Laufmittel, welches die auf 65 °C temperierte Säule bei einer Flussrate von 0,6 ml / min durchlief. Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie in 2.9.2 beschrieben.

2.10 Isotopenanalytik

2.10.1 Einsatz stabiler Isotope

Während dieser Arbeit wurden zur Identifizierung der Kohlen- und Wasserstoffflüsse ebenfalls isotope-markierte Substanzen eingesetzt (Tabelle 13), die an definierten Atompositionen mit Isotopen besetzt sind. Dadurch war es möglich, den Weg der C-/H-Atome während einer Reaktion nachzuverfolgen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden diese immer in einem Masseanteil von 5 % eingesetzt, indem sie mit der gleichen, unmarkierten Substanz vermischt wurden. Isotopenmarkierte Gase wurden zu 0,1 bar Überdruck in den Kulturgefäßen vorgelegt und anschließend durch eine Zugabe von 2 bar unmarkierten Gases verdünnt.

Tabelle 13 Eingesetzte ¹³C und ²H markierte Verbindungen für isotopische Analysen der Kohlen- und Wasserstoffflüsse. Sämtliche isotope-markierte Substanzen wurden bei der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen.

Substanz	Markierung	Formel
¹⁻¹³ C Acetat	¹³ C	CH ₃ ¹³ COONa
²⁻¹³ C Acetat	¹³ C	¹³ CH ₃ COONa
¹⁻¹³ C Formiat	¹³ C	H ¹³ CHOONa
¹⁻¹³ C Methanol	¹³ C	¹³ CHOH
¹³ CO ₂	¹³ C	¹³ CO ₂
² H ₂	² H	² H ₂
² H ₂ O	² H	² H ₂ O
Formiat- ² H	² H	² HCOONa
Ameisensäure ² H	² H, 2fach	² HCOO ² H

2.10.2 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Die Isotopenverhältnisse in den Biogasproben verschiedener methanogener Spezies wurden am Institut für Geowissenschaften der Universität Heidelberg (Prof. Dr. Frank Keppler) gemessen. Dabei wurden mithilfe einer gasdichten, verschließbaren 10 ml Spritze (Hamilton, Reno, NV, USA) Gasproben à 5 ml aus den Kulturröhrchen oder Batchfermentern entnommen und bis zur Analyse in evakuierten 3,5 ml Glasgefäßen mit Septum (Exetainer, Labco, High Wycombe, Großbritannien) aufbewahrt, wobei ein leichter Überdruck in den Gefäßen angestrebt wurde. Die Analyse von $\delta^{13}\text{C}$ und $\delta^2\text{H}$ im Biogas erfolgten an einem Gaschromatographen (HP 6890N, Agilent, Santa Clara, CA, USA) mit CP-PoraPLOT Q Kapillarsäule (Varian, Palo Alto, CA, USA) (27.5 m \times 0.25 mm), der über ein GC Combustion III Interface (ThermoQuest Finnigan, Bremen) mit einem Delta^{PLUS}XL (ThermoQuest Finnigan, Bremen) Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS) verbunden war. Die Messung wurde isotherm bei einem Split von 10:1, einer Temperatur von 200 °C im Injektor und 30 °C im Säulenofen und einem Flow von 1,8 m / min He als Trägergas durchgeführt. Weitere Details zur Analytik können in Keppler et al. 2010 eingesehen werden.

2.11 Betrieb und Untersuchungen an der Forschungsbiogasanlage

Sämtliche Untersuchungen im Rahmen des Forschungsprojektes wurden an der Forschungsbiogasanlage (FBGA) des Deutschen Biomasseforschungszentrums (DBFZ), Leipzig, durchgeführt. Neben der Isolation von Reinkulturen aus Gärproben und quantitativen, molekularbiologischen Analysen der Reaktormikrobiota diente der Fermenter zur Erprobung eines Massenspektrometers für die Echtzeitanalyse des Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) im Biogas.

2.11.1 Anlagen- und Betriebsparameter

Der Betrieb des kontinuierlich durchmischten, 207 m³ großen Forschungsfermenters (CSTR-Typ) des DBFZ erfolgte im mesophilen Bereich bei 40 °C. Mehrmals täglich wurde Maissilage (TS - 29,4 %) und flüssige Rindergülle (TS 7,6 %) als Gärsubstrate zugeführt. Zur Untersuchung des Einflusses variierender Raumbelastungen (OLR) auf die Zusammensetzung der Mikrobiologie sowie auf die Isotopenverhältnisse im Biogas wurde der Fermenter über einen mehrmonatigen Zeitraum bei unterschiedlichen Raumbelastungen betrieben. Dabei wurden sowohl mehrtägige Hungerperioden als auch starke fütterungsbedingte Stoßbelastungen getestet, wobei Raumbelastungen zwischen 0.4 - 13.5 kg_{oTS} / (m³ \times d) erreicht wurden. Ferner wurden unterschiedliche Anteile von Maissilage (0 - 7.000 kg / d) und Rindergülle (0,5 - 2 m³ / d) bei der täglichen Substratzufuhr erprobt. Die durchschnittliche Verweildauer (HRT) des Gärsubstrates betrug 41 Tage.

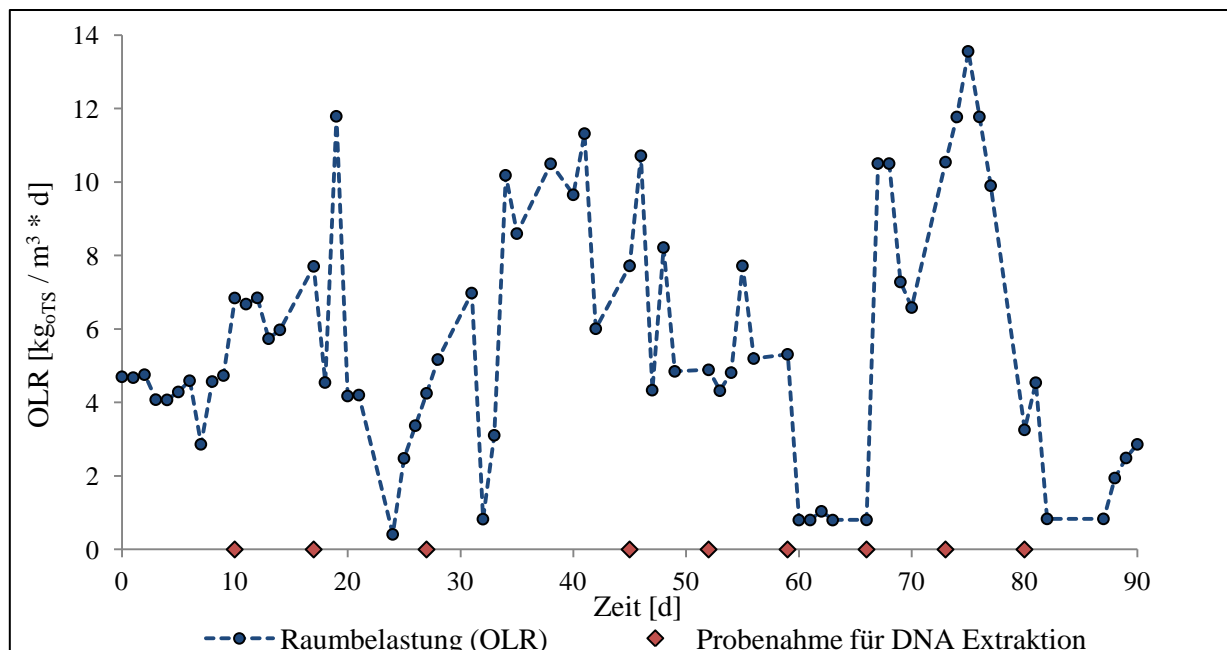


Abbildung 5 Tägliche Substratzufuhr (Maissilage und Rindergülle) in $\text{kg}_{\text{OTS}} / (\text{m}^3 \times \text{d})$ in den Fermenter der Forschungsbiogasanlage des Deutschen Biomasseforschungszentrums, Leipzig.

Neben einer permanenten Analyse der Gaszusammensetzung (CH_4 , CO_2 , O_2 , H_2 , H_2S) und der Gasproduktionsrate wurden an allen Werktagen Laboranalysen des Fermenterinhalt durchgeföhrt. Seitens des DBFZ wurden dabei die Parameter pH-Wert, $\text{NH}_4\text{-N}$, TS, oTS, das Säurespektrum und das FOS / TAC-Verhältnis bestimmt. Die Zeitpunkte der Probennahmen für molekularbiologische quantitative Untersuchungen (2.15) sind in Abbildung 5 orange markiert. Hierfür wurden die Reaktorproben direkt nach der Beprobung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in sterilen 50 ml Zentrifugenröhren (Labcon North America, Petaluma, CA, USA) gelagert. Zusätzlich wurden für die Isolation von Reinkulturen in regelmäßigen Abständen Reaktorproben entnommen und binnen weniger Stunden als Inokulum verwendet.

2.11.2 DNA-Extraktion aus Fermenterproben

Für die DNA-Extraktion aus Reaktorproben wurde sowohl eine Vielzahl kommerzieller Kits als auch klassischer DNA-Extraktionsmethoden evaluiert. Ziel war es, neben einer maximalen Ausbeute an DNA ein möglichst repräsentatives Abbild der Fermenter-Mikrobiologie während molekularbiologischer Analysen zu erhalten. Dabei wurde festgestellt, dass DNA-Extrakte SDS- und Lysozym basierter Aufschlussmethoden vornehmlich DNA der Gattung *Methanoculleus* aufwiesen, während die stabilen Zellstrukturen von *Methanosarcina* hingegen weitestgehend ungeöffnet blieben. Die besten Resultate wurden über die kombiniert mechanische und chemische Aufschlussmethode des GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit (Eur_x Ltd., Danzig, Polen) erzielt. Für die Extraktion wurden die Reaktorproben bei Raumtemperatur aufgetaut, auf einem Vortex-Schüttler für 30 s homogenisiert und zu 200 mg in die Bead-Tubes des Kits überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben, wobei die finale Elution der DNA in 200 μl des beiliegenden Elutionspuffers stattfand.

2.11.3 Kontinuierliche Isotopenanalytik $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) an der Forschungsbiogasanlage

Seitens des Institut für Geowissenschaften der Universität Heidelberg (AG Prof. Dr. Frank Keppler) wurde ein portables $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) Spektrometer (Isometric Instruments, Victoria, Kanada) an der Biogasleitung des Fermenters 3.1 der FBGA des DBFZ installiert (Abbildung 7). Anhand spezifischer Absorptionslinien im nahinfraroten Bereich konnte so die relative Häufigkeit der $^{12}\text{CH}_4$ - und $^{13}\text{CH}_4$ -Isotopologe im Biogas gemessen werden (Baer et al. 2002). Die Messung erfolgte alle 20 s, sodass auch kurzfristige fütterungs- und prozessbedingte Veränderungen im Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) detektiert werden konnten. Insgesamt zeichnete das Gerät in einem Zeitraum von sechs Monaten kontinuierlich Isotopendaten auf, wobei gezielt der Einfluss verschiedener Raumbelastungen und Substratzusammensetzungen (2.11) auf die Isotopie untersucht wurde.

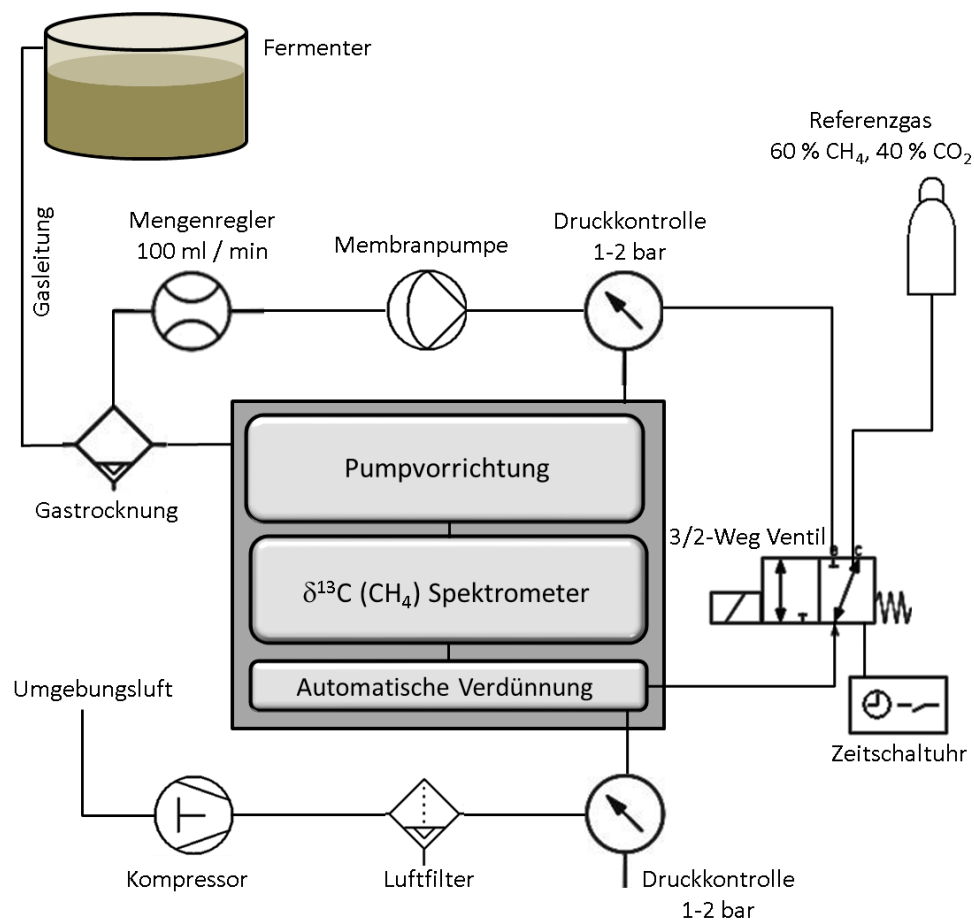


Abbildung 6 Versuchsaufbau zur kontinuierlichen Analyse von $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) an der Forschungsbiogasanlage des Deutschen Biomasseforschungszentrums, Leipzig. Das Biogas wurde zunächst entfeuchtet und dann über eine Membranpumpe in das Isotopen-Spektrometer bei einer Flussrate von 100 ml/min und 1-2 bar Überdruck überführt. Aufgrund der hohen CH_4 -Konzentration musste das Biogas zuvor über ein automatisches Verdünnungssystem (Isometric Instruments, Victoria, Kanada) mit Umgebungsluft auf den Messbereich (≈ 9000 ppm) des Spektrometers verdünnt werden. Über eine Zeitschaltuhr wurde alle drei Stunden für 10 min ein Referenzgas (60% CH_4 , 40% CO_2) mit bekannter Isotopensignatur ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} = 41,6 \text{‰} \pm 0,3 \text{‰}$) zur Kalibrierung der Messdaten in das Spektrometer zugeführt.

2.12 Isolierung von Reinkulturen aus der Forschungsbiogasanlage

Im Rahmen der Forschungsarbeiten wurden verschiedene bakterielle und methanogene Stämme aus den Reaktorproben des DBFZ-Versuchsfermenters isoliert. Ziel war es, die Kohlenstoffflüsse im Reaktor mit Organismen aus der tatsächlich vorherrschenden Reaktor-Mikrobiota durchzuführen. Isolate aus Biogasanlagen weisen oftmals eine bessere Anpassung an die dynamischen Umweltbedingungen eines Fermenters auf, wobei sie sich selbst auf genetischer Ebene im Laufe der Zeit verändern können (Stantscheff et al. 2014). Um möglichst anlagenspezifische, prozessnahe Bedingungen zu gewähren, wurden aus diesem Grund in sämtlichen Kulturexperimenten nur Eigenisolate aus der FBGA eingesetzt. Mit einem Fokus auf die Substrate der letzten Stufe des anaeroben Fermentationsprozesses wurden neben methanogenen Archaeen auch Bakterien isoliert, die methanogene C1- (Formiat, CO₂, Methanol) und C2- (Acetat) Substrate bilden können. Ferner wurden bakterielle Spezies isoliert, die aufgrund eines ähnlichen Substratspektrums mögliche Konkurrenten für die methanogenen Archaeen darstellen könnten. Durch eine breite Auswahl verschieden metabolisch aktiver Isolate sollte so das Verständnis des Zusammenspiels der verschiedenen mikrobiellen Stoffwechselwege wie Methanogenese, Homoacetogenese oder syntropher Acetatoxidation ermöglicht werden.

2.12.1 Mikroskopische Untersuchungen

Die Isolierung von Reinkulturen wurde durch mikroskopische Überprüfungen des Reinheitsgrades und der Morphologie begleitet. Parallel zu einer Phasenkontrastmikroskopie wurde das Vorkommen methanogener Archaea mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Biozero BZ8000, Keyence, Neu-Isenburg) untersucht. Hierfür wurde die Autofluoreszenz des bei der Methanogenese essentiellen und damit bei Methanbakterien ubiquitär verbreiteten Cofaktors F₄₂₀ genutzt. Wird dieser mit Licht einer Wellenlänge von 420 nm angeregt, emittiert der Cofaktor charakteristisch blaugrünes Licht einer Wellenlänge von 520 nm (Cheeseman et al. 1972), sodass selbst in komplexen, teils Chlorophyll bedingt fluoreszierenden Matrices wie Reaktorproben eine Detektion von Methanbakterien möglich ist. Neben einer Differenzierung von Bakterien und methanogenen Archaea in Mischkulturen gewährt diese Methode auch eine grobe Einschätzung der Vitalität methanbildender Kulturen, da die F₄₂₀ vermittelte Redoxreaktion ausschließlich in lebenden Zellen stattfindet. Eine Ausnahme bilden dabei strikt acetoklastische Vertreter wie *Methanosaeta concillii*, die aufgrund ihres geringen Anteils von F₄₂₀ eine geringere Fluoreszenz-Intensität aufweisen.

2.12.2 DNA-Extraktion aus Reinkulturen

Für molekularbiologische Arbeiten sowie zur Identifizierung der Eigenisolate wurde zunächst die genomische DNA aus den Flüssigkulturen extrahiert. Hierfür wurden je nach Zelldichte 0,5 - 1 ml bewachsenen Nährmediums entnommen und in sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 10 min bei 10.000 × g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet zweimal mit einer sterilen Ringerlösung bei erneuter Zentrifugation für 3 min bei 10.000 × g gewaschen wurde. Das

gereinigte Zellpellet konnte anschließend für die DNA-Extraktion eingesetzt werden. Für methanogene Archaea wurde das Aufschlussverfahren des GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit (Eur_x, Danzig, Polen) gewählt, während bakterielle DNA mithilfe des auf SDS, Proteinase K und Lysozym basierenden Qiagen Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert wurde. Die Vorgehensweise entsprach dabei den jeweiligen Herstellerprotokollen.

2.12.3 Identifizierung und Reinheitskontrolle mittels PCR

Zur Identifizierung der Isolate auf molekularbiologischer Ebene wurde die konservierte Region des 16S rRNA Genes hinzugezogen. Dies erforderte zunächst die Amplifikation der 16S rDNA innerhalb der genomischen DNA-Extrakte (2.12.2) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung domänenspezifischer Primerkombinationen (Tabelle 14 - Tabelle 17).

Tabelle 14 Charakteristika der verwendeten Primern zur spezifischen Amplifizierung der 16S rRNA-Gensequenz von Archaea und Bakterien.

Domäne	Primer	Sequenz	T _M	Produkt	Referenz
Archaea	Met86f	GCT CAG TAA CAC GTG G	51 °C	1444 bp	Wright und Pimm 2003
	Ar1530r	GGA GGT GAT CCA GCC G	56 °C		Mori et al. 2008
Bakterien	PurEubak3	AGA AAG GAG GTG ATC C	54 °C	1536 bp	Pfannebecker 2008
	PurEubak5	AGA GTT TGA TCM TGG CT	53 °C		

Tabelle 15 Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Reaktionsansatzes.

Komponente	Menge [µl]	Finale Konzentration
DEPC-Wasser	37,8	
10 × High Yield Puffer (20 mM MgCl ₂)	5,0	1 x
Primer forward (10 µM)	2,0	0,4 µM
Primer reverse (10 µM)	2,0	0,4 µM
dNTP-Mix (40 mM)	1,0	0,2 mM
Taq Polymerase (5 U / µl)	0,2	0,02 U
DNA-Extrakt	2,0	10 - 40 ng

Tabelle 16 PCR-Programm für die Amplifizierung der 16S rDNA von Archaeen.

T [°C]	Dauer [min]	Zyklen
95	05:00	1
95	00:30	
55 ↗ 56,5	00:45	15
72	01:30	
95	00:30	
56	00:45	20
72	01:30	
72	05:00	1

Tabelle 17 PCR-Programm für die Amplifizierung der 16S rDNA von Bakterien.

T [°C]	Dauer [min]	Zyklen
95	05:00	1
95	01:00	
56	01:00	35
72	01:30	
72	10:00	1

Der Erfolg einer PCR wurde durch eine 1 % TBE Agarosegelelektrophorese bei 100 V und 40 min Laufzeit überprüft. Dabei wurde zusätzlich ein DNA-Größen- und Konzentrationsstandard zur Kontrolle der Amplifikatlängen mitgeführt. Die Visualisierung der DNA-Banden im Gel erfolgte nach einer 30-minütigen Anfärbung in 1 % (v / v) Ethidiumbromid unter dem UV-Licht einer Geldokumentationseinheit.

Anschließend wurde die DNA von überschüssigen PCR-Reagenzien mithilfe des GenElute™ PCR Clean-Up Kits (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt und schließlich bei -20 °C aufbewahrt.

2.12.4 Sequenzierung und Identifizierung mittels Gendatenbanken

Sequenzierungsaufträge wurden extern an die Firma StarSEQ GmbH, Mainz, vergeben. Da erfahrungsgemäß die Genauigkeit von Sequenzierungen mit zunehmender Amplifikatlänge abnimmt, wurden die PCR-Produkte auf beiden Strangseiten unter Verwendung des forward bzw. reverse Primers sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte zunächst mithilfe der Software FINCH TV 1.4.0 (Geospiza inc., Seattle, USA, <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>, zuletzt abgerufen am 26.06.2015). Sofern eine eindeutige Sequenz vorlag, konnte die Identifizierung mittels in silico Gendatenbankabgleich über die BLAST Funktion des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, zuletzt abgerufen am 26.06.2015) durchgeführt werden.

2.12.5 Isolation eines hydrogenotrophen Archaeons

Die Anreicherung und Isolierung eines methanogenen Archaeons der Gattung *Methanobacterium* erfolgte im direkten Anschluss an eine Beprobung der FBGA des DBFZ. Zuvor durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der frischen Reaktorproben ließen bereits aufgrund einer hohen Präsenz an fluoreszierenden Stäbchen ein potentielles Vorkommen von *Methanobacterium* erwarten,

weshalb eine zielgerichtete Isolation auf diese Art vorgenommen wurde. Als selektiv hydrogenotrophe C-Quelle wurde Formiat gewählt, welches zu 0,1 mol als Natriumformiat in DSM 287-mod Medium (Tabelle 9) eingewogen wurde. Auf eine Zugabe von Acetat wurde hingegen für eine erhöhte Selektivität verzichtet, wobei zusätzlich bakterielles Wachstum durch die Zugabe von 15 µg / ml Tetracyclin und 100 µg / ml Vancomycin unterbunden wurde. Die Beimpfung erfolgte zu einem Inokulum von 5 % mit homogenisiertem Reaktorsubstrat, wobei 20 ml Anaeroben-Kulturröhrchen mit einer Gasatmosphäre von 1 bar Überdruck N₂ / H₂ (v / v 80 / 20) eingesetzt wurden. Hiervon ausgehend wurden Verdünnungsreihen zu 10⁻² - 10⁻⁶ angesetzt, die bei 39 °C und 180 rpm im Schüttler kultiviert wurden.

Unter Begleitung regelmäßiger mikroskopischer Untersuchungen wurden die Anreicherungen alle zwei Wochen je zu 5 % in frisches Nährmedium überimpft, wobei sich bereits nach dem zweiten Überimpfungsintervall zunehmend eine einheitliche Morphologie durchsetzte. Nach acht Wochen und insgesamt vier Überimpfungsschritten konnte eine Reinkultur vermutet werden, weshalb eine DNA-Extraktion zur molekularbiologischen Identifizierung durchgeführt wurde (2.12.2 - 2.12.4).

2.12.6 Isolation eines methylo-trophen Archaeons

Frisches Reaktorsubstrat aus dem Fermenter der Biogasanlage des DBFZ Leipzigs wurde zu 5% Inokulum auf DSM 318-mod (Tabelle 9) Nährmedium in 20 ml Kulturgefäßen gesetzt. Zur Selektion gegen Bakterien wurden die Antibiotika Tetracyclin (15 µg / ml) und Vancomycin (100 µg / ml) nach dem Autoklavieren eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in 100 ml Serumflaschen mit 20 ml Nährmedium unter 1 bar N₂ Gasatmosphäre als Standkultur im 39 °C Brutschrank. Im Zeitraum von acht Wochen wurden diese Vorkulturen alle 14 Tage erneut zu 5 % Inokulum in das gleiche, antibiotikahaltige Nährmedium überimpft. Auch hier konnten bereits nach vier Wochen zahlreiche, in größeren Zellpaketen wachsende Zellen einheitlicher Morphologie identifiziert werden, die sich im weiteren Verlauf weiter durchsetzten.

2.12.7 Isolation eines methylo-trophen Bakteriums

Neben der Isolierung eines methylo-trophen Archaeon (2.12.6) aus dem Forschungsreaktor wurden ebenfalls Bakterien gesucht, die zur methylo-trophen Lebensweise befähigt sind. Um diesem Stoffwechselweg und etwaigen Organismen nachzugehen, wurde wiederum methanolhaltiges DSM 318-mod Medium (Tabelle 9) mit 5 % Reaktorsubstrat beimpft. Statt Antibiotika wurde diesmal zur Hemmung von methanogenen Archaea 2-Bromethansulfonsäure (BES) zu 50 mM in die Nährmedien hinzugegeben. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Isolierung von methylo-trophen Archaeen (2.12.6), wobei zunehmend ein stäbchenförmiger Organismus auftrat. Nach vier weiteren Überimpfungsschritten konnte eine Reinkultur vermutet werden, sodass eine DNA-Extraktion und die genetische Identifizierung anhand der 16S rRNA Gensequenz erfolgen konnte.

2.12.8 Isolation eines H₂ / CO₂ verbrauchenden Bakteriums

Ein Großteil des CH₄ aus Biogasanlagen entsteht während der methanogene Reduktion von CO₂. Einige Bakterien sind auch in der Lage, unter Angebot von H₂ und CO₂ zu wachsen und dabei Acetat zu bilden (Homoacetogenese), wovon wiederum acetoklastische methanogene Archaeen profitieren können. Dies kann einen Einfluss auf das Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄) im Biogas haben, sodass statt der Isotopensignatur der hydrogenotrophen die der acetoklastischen Methanogenese zu messen ist. Um dies in Mischkulturexperimenten zu untersuchen, wurde gezielt die Isolierung eines H₂ / CO₂ verbrauchenden Bakteriums aus Reaktorschlamm angestrebt. Die Isolierung erfolgte wie zuvor für methylo trope Bakterien (2.12.7) beschrieben wurde, jedoch in acetatfreiem DSM 287-mod Nährmedium (Tabelle 9) unter einer regelmäßigen Begasung mit 2 bar H₂ / CO₂. Die Anreicherung wurde bei 39 °C Schüttler bei 180 rpm kultiviert. Weitere Überimpfungen wurden im zweiwöchigen Intervall durchgeführt, bis nach etwa zehn Wochen eine einheitliche Morphologie erhalten werden konnte. Die genetische Identifizierung erfolgte wieder nach einer Sequenzierung der 16S rRNA Gensequenz über einen Gendatenbankabgleich. Die anschließende Kultivierung des Isolates erfolgte in Nährmedium DSM 63-mod (Tabelle 9).

2.12.9 Isolation eines syntroph acetatoxidierenden Bakteriums

Aus Bioreaktoren wurden bereits einige syntroph acetatoxidierende Bakterien isoliert, wie beispielsweise *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Westerholm et al. 2011), *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm et al. 2010), *Thermacetogenium phaeum* (Hattori et al. 2000) und *Clostridium ultunense* (Schnurer et al. 1996). Da die Isolierung dieser Spezies über ein reines Anbieten der C-Quelle Acetat ohne die externe Zugabe eines Elektronenakzeptors nicht möglich ist, wurde im Folgenden die Aminosäure Cystein, welche als Substrat für alle oben aufgeführten Isolate beschrieben wurde, als selektives Substrat für die Isolierung erprobt.

Als Ausgangsbasis für die Isolierung diente DSM 287-mod Medium (Tabelle 9), welches ohne die Zugabe von Acetat hergestellt wurde. Bei einer Gasphase von 1 bar N₂ lag somit, bis auf das regulär eingesetzte Cystein, keine weitere C-Quelle im Nährmedium vor. Die Kultivierung erfolgte bei 39 °C in 100 ml Kulturgefäßen mit je 20 ml Nährmedium, welche mit 2 - 5 % Inokulum mit einer Reaktorprobe beimpft worden waren. Methanogenes Wachstum wurde erneut durch 50 mM BES gehemmt. Aufgrund der oben beschriebenen, potentiellen Vielzahl Cystein verwertender Bakterien erfolgte die weitere Isolierung mithilfe der Tiefagar-Verdünnungsmethode. Diese ermöglicht durch das Separieren von Kulturen innerhalb eines agarhaltigen, festen Nährmediums das Picken einzelner Kolonien und damit etwaiger Reinkulturen. In 20 ml Rollrandreagenzgläsern wurden unter der sauerstofffreien Atmosphäre des Anaerobenzeltes je 5 ml acetatfreies DSM 287-mod Medium vorgelegt. Dabei wurden zusätzlich 75 mg Agar in jedes Röhrchen eingewogen, sodass eine finale Endkonzentration von 1,5 % (w / v) Agar erreicht wurde. Danach wurden die Rollrandgefäße mit einem Butylstopfen und einer Aluminium-Lochkappe verschlossen und eine Gasatmosphäre von 1 bar N₂ eingestellt. Bei der anschließenden Autoklavierung wurden die Nährmedien während des Abkühlvorgangs nach beendeter Sterilisations-

phase bereits bei 80 °C entnommen. Die Medien mit dem durch den Erhitzungsprozess noch flüssigen Agar wurden direkt in einen auf 50 °C vorgeheizten Brutschrank im Anaerobenzelt übertragen, sodass eine Beimpfung zu 5 % mit der Vorkultur erfolgen konnte. Diese wurde durch ein kurzes Schütteln in den Nährmedien verteilt und anschließend in seriellen Verdünnungsreihen bis 10^{-4} in ebenfalls noch flüssigen Medien weiter verteilt. Zur Verfestigung des Agars wurden die Kulturgefäße für wenige Sekunden in einem Eisbad abgekühlt. Bereits nach einer Woche Kultivierung bei 39 °C konnten zahlreiche Kolonien im Agar identifiziert werden. Um ein weiteres Transferieren einzelner Kolonien zu ermöglichen, wurden die Rollrandgefäße vorsichtig im Anaerobenzelt aufgebrochen. Unter Verwendung steriler Kanülenspitzen wurden jeweils fünf Kolonien aus dem Agar gepickt und in flüssiges DSM 287-mod Medium ohne Acetat übertragen. Diese wurden wiederum für eine Woche kultiviert, wobei sich zunehmend der Bewuchs einer einheitlichen, stäbchenförmigen Morphologie durchsetzte. Um einen höheren Reinheitsgrad zu gewährleisten, wurden diese Flüssigkulturen erneut als Inokulum für Tiefagar-Verdünnungsreihen eingesetzt. Erneut konnten nach einer Woche Kolonien gepickt und in flüssiges Nährmedium übertragen werden, sodass nach einer weiteren, mehrtägigen Kultivierung und einer finalen Reinheitskontrolle mittels Mikroskopie die DNA-Isolierung und Sequenzidentifizierung erfolgen konnte.

2.12.10 Isolation eines pektinolytischen Bakteriums

Die pflanzliche Gerüstsubstanz Pektin gilt als eine der bedeutendsten natürlichen Quellen von Methanol, welches durch die Aktivität der Pektin-Methylesterase gelöst werden kann (Mohnen 2008; Nultsch 2001; Palmisano und Barlaz 1996; Siragusa et al. 1988; Schink und Zeikus 1980). Da viele Biogasanlagen mit nachwachsenden Rohstoffen wie Mais, Zuckerrüben und Getreide betrieben werden, wurden der mikrobielle Abbau von Pektin und damit die Entstehung von Methanol näher untersucht. Zur Isolierung eines potentiell pektinolytischen Stamm wurde acetatfreies DSM 287-mod (Tabelle 9) mit 5 g/l Citrus-Pektin (Pectin C, Veresterungsgrad ca. 70 %, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) hergestellt. Um zu vermeiden, dass die Methoxygruppen des Pektins bereits während des Autoklavierens der Nährmedien abgespalten werden könnten, wurde das Pektin getrennt sterilisiert. Hierfür wurden je 0,5 g Pektin in 2 ml Eppendorfgefäßen eingewogen, mit 1 ml 99 % Ethanol überschichtet und bei maximaler Umdrehung auf einem Vortex vermischt. Anschließend wurde das Ethanol durch 3 min Zentrifugation bei $18.000 \times g$ separiert und verworfen. Nach einer Wiederholung dieses Waschschrattes konnte das Pektin in einem SpeedVac Konzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) bei 45 °C und $240 \times g$ für 45 min getrocknet werden. Abschließend erfolgte eine UV-Bestrahlung für dreimal 30 min.

Das pektinhaltige Nährmedium wurde zu 5 % mit einer Reaktorprobe beimpft. Die Isolierung erfolgte bei 39 °C als Standkultur in 20 ml Anaeroben-Kulturröhrchen mit 1 bar N_2 -Gasatmosphäre. Wachstum methanogener Archaeen wurden durch 50 mM BES gehemmt. Aufgrund eines sehr schnellen Bewuchses der Medien wurden wöchentliche Überimpfungen bei 2,5 % Inokulum sowie Verdünnungsreihen bis 10^{-10} durchgeführt, bis sich nach rund sechs Wochen ein einheitlicher Zelltypus durchzusetzen schien.

2.13 Messung der natürlichen Isotopenfraktionierung im Biogas

2.13.1 Analyse der Kohlenstofffraktionierung im CH₄ methanogener Reinkulturen

Bislang wurde in den meisten Isotopenstudien auf bekannte $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte von Isolaten aus Reisfeldern oder Böden zurückgegriffen. Um die habitatspezifischen Isotopenverhältnisse im CH₄ eines anaeroben Reaktors zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst grundlegende Untersuchungen der natürlichen Kohlenstofffraktionierung an Isolaten aus Biogasanlagen durchgeföhrt. Dabei sollte überprüft werden, ob sich die drei Methanogenesewege (hydrogenotroph, acetoklastisch, methylotroph) anhand ihrer Kohlenstofffraktionierung im CH₄ unterscheiden lassen. Diese womöglich für jeden Methanogenese-pfad spezifischen $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte sollten später für eine Interpretation der in Echtzeit an der Biogasanlage des DBFZ ermittelten Isotopendaten (2.11.3) hinzugezogen werden können, sodass quantitative Rückschlüsse über den Anteil der drei Stoffwechselwege ermöglicht werden. Im Labor wurden daher verschiedene methanogene Isolate mit je einer spezifischen C-Quelle kultiviert, um so eine etwaige spezies- und substratspezifische Isotopenfraktionierung im CH₄ zu erhalten. Repräsentativ für den hydrogenotrophen Weg wurden das Isolat *Methanobacterium formicicum* Mbf1 (3.1.1.1) sowie *Methanoculleus bourgensis* Stamm MS2 (DSM 3045^T, Tabelle 12) in Triplikaten unter H₂ / CO₂-Atmosphäre in DSM 287-mod (Tabelle 9) angezogen. Um eine durch Substratlimitation bedingte Veränderung der Kohlenstoffisotopie zu vermeiden, wurden die 100 ml KulturgefäÙe täglich ohne Entfernen der vorherrschenden Gasatmosphäre auf 1 bar Überdruck begast. Die Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese von *Methanobacterium formicicum* Mbf1 wurde zusätzlich auch mit Wachstum auf Formiat untersucht, wobei DSM 287-mod Medium (Tabelle 9) mit 5 g / l Natriumformiat für die Kultivierung eingesetzt wurde. In diesen Medien wurde eine Gasphase von 1 bar N₂ aufrecht gehalten.

Die Isotopenfraktionierung der methylotrophen und acetoklastischen Methanogenese wurde an den Isolaten *Methanosarcina mazei* Msc1 (3.1.2) bzw. dem *Methanosaeta concilii* verwandten Isolat Mst1.3 (Stantscheff 2013) untersucht. Die Anzucht erfolgte in den Nährmedien DSM 318-mod und DSM 334-mod (Tabelle 9) unter 1 bar N₂, wobei mit rund 4 g / l Methanol bzw. 6,8 g / l Acetat eine Substratlimitation während des Versuchszeitraums ausgeschlossen werden sollte.

Die Organismen wurden je nach Wachstumsrate für mindestens 14 Tage, ab der ersten messbaren CH₄-Bildung im Schnitt alle zwei Tage beprobt. Hierbei wurde zunächst die Gasbildung der einzelnen Kulturen gaschromatographisch ermittelt (2.9.1), bevor anschließend je 5 ml Gasprobe für die Isotopenanalyse entnommen wurden. Um konstante Drücke in den KulturgefäÙen zu gewährleisten, erfolgte nach den Probenahmen eine erneute Begasung auf den Ausgangsdruck.

2.13.2 Analyse substratspezifischer $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte in Reaktorproben

Neben der Analyse der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte von methanogenen Isolaten auf spezifischen C-Quellen (2.13.1) wurde die Isotopenfraktionierung von Reaktorproben und somit der „gesamten“ Fermenter-Mikrobiologie unter Angebot selektiver Methanogenese-Substrate untersucht. Dies erschien notwendig für eine Evaluation der Übertragbarkeit von Reinkultur-Isotopenexperimenten auf das komplexe, hochdiverse Habitat eines Fermenters, in welchem neben dem Vorkommen einer Vielzahl verschiedener Spezies auch die methanogenen Reaktionen beeinflussenden Stoffwechselwege homoacetogener syntroph Acetat oxidierender oder sulfatreduzierender Bakterien vorherrschen können. Hierzu wurden 100 ml Gärsubstrat aus dem Fermenter des DBFZ entnommen, anaerob in eine 1.000 ml Serumflasche mit Butylstopfen und Gassammelbehälter überführt und für drei Tage bei 39 °C im Wasserbad inkubiert. Dies sollte gewährleisten, dass die Reaktorprobe aushungert und die Konzentration von noch im Gärsubstrat vorhandener methanogener Substrate abnimmt. Ein weiteres Verdünnen erfolgte mit dem Beimpfen der Nährmedien, wobei 5 g Reaktorprobe in 45 ml DSM 287-mod Medium (Tabelle 9) ohne Carbonaten und Acetat in einer 150 ml Serumflasche mit Rührfisch zusammengeführt wurden. Anschließend wurde repräsentativ für je einen Methanogeneseweg eine spezifische C-Quelle zugeführt (Tabelle 18). Zur Untersuchung des Einflusses bakterieller Acetatoxidation sowie homoacetogener Reaktionen auf die Isotopie von CH_4 wurden zudem Antibiotika in drei Ansätzen mit Acetat als C-Quelle eingesetzt. Nach der Substratzugabe erfolgte eine Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,0 mittels 2 M H_2/SO_4 . Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Um Verdünnungseffekte aufgrund zunehmender Biogasbildung in den Batchgefäßen zu vermeiden, wurden über Kanülen und Tygon®-Schläuche (Tygon, Saint-Gobain, Frankreich) flexible 1 l Gassammelsäcke angeschlossen, so dass ein konstant niedriger Druck in den Serumflaschen gewährleistet werden konnte. Diente eine Gasphase aus H_2/CO_2 als Substrat, wurde auf diese Maßnahme verzichtet, wobei diese Ansätze täglich auf 1 bar Überdruck begast wurden. Die Kultivierung erfolgte auf einer beheizbaren Magnetrührplatte bei 39 °C unter 120 rpm Durchmischung.

Tabelle 18 Zugabe methanogener Substrate zur Analyse stoffwechselspezifischer $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) mit Reaktorproben beimpften Nährmedien. Hierfür wurden 5 g Reaktorprobe in 45 ml DSM 287-mod Medium (Tabelle 9) ohne Carbonaten und Acetat in einer 150 ml Serumflasche mit Rührfisch zusammengeführt und über 7 Tage hinweg Gasproben für die Messung der Isotopenverhältnisse entnommen.

Methanogenese	Substrat	Gasphase	Antibiotika
Acetoklastisch	Acetat, 2 g / l	N_2 , 0,1 bar	-
Acetoklastisch	Acetat, 2 g / l	N_2 , 0,1 bar	15 μg / ml Tetracyclin 100 μg / ml Ampicillin
Methylotroph	Methanol, 2 g / l	N_2 , 0,1 bar	-
Hydrogenotroph	H_2/CO_2 , 1 bar	H_2/CO_2 , 1 bar	-

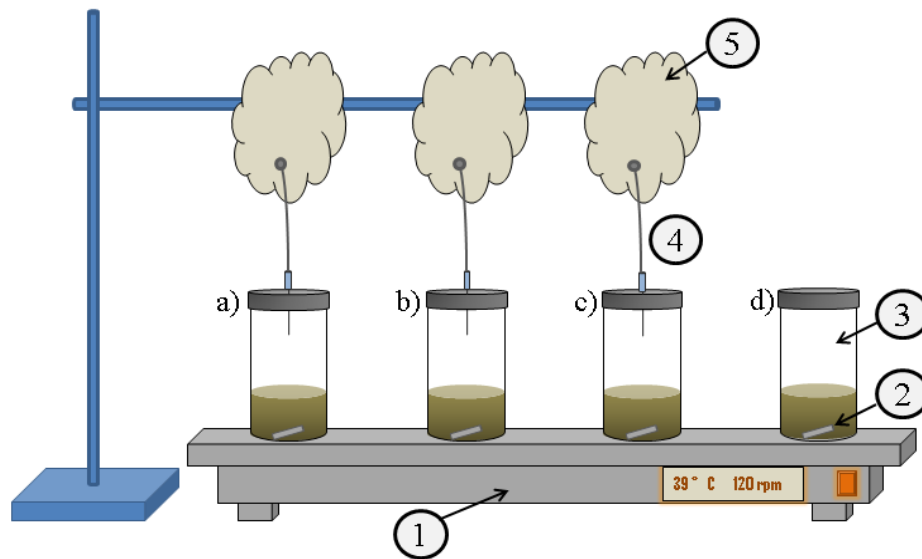


Abbildung 7 Versuchsaufbau zur Untersuchung einer substratspezifischen Isotopenfraktionierung $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) in Batchreaktoren mit 5 % Reaktorsubstrat unter Angebot einer methanogenen C-Quelle.
 a) Acetat, b) Acetat und Antibiotika, c) Methanol, d) H_2/CO_2 .
 1) Heizrührplatte, 2) Magnetstabsgefäß, 3) Serumflasche, gasdicht verschlossen mit einem Butylstopfen, 4) Kanüle mit Gasschlauch, 5) Gassammelsack zum Druckausgleich (Supelco Analytical, Bellefonte, USA).

Zur $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Analyse wurden in einem Zeitraum von sieben Tagen Gasproben aus den Gefäßen gezogen und zur Aufbewahrung in 3,5 ml Exetainern überführt. Die Isotopenanalyse erfolgte mittels GC-C-IRMS (2.10.2).

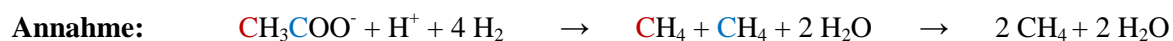
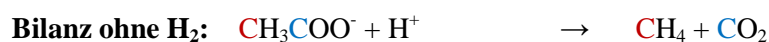
2.14 Untersuchung mikrobieller C- und H_2 -Flüsse in Biogasanlagen

Bisherige Studien, die sich mit den komplexen mikrobiellen Stoffwechselvorgängen in Biogasanlagen beschäftigen, stützen sich in der Regel auf stöchiometrische Abbaubilanzen einzelner Gärprodukte sowie auf die Konzentration quantitativ nachweisbarer Substrate und Produkte im Reaktor. Ein Biogasfermenter ist jedoch aufgrund seiner hohen mikrobiellen Diversität und Interaktionen, kurzfristiger metabolischer Zwischenprodukte, Substratvielfalt und Störanfälligkeit ein so hochdynamisches System, dass bisherige, rechnerisch entwickelte stöchiometrische Bilanzen aus der Literatur nur teilweise übertragbar sind. Im Folgenden sollten daher mithilfe von Rein- und Mischkulturen aus Biogasanlagen, dem Einsatz stabiler Isotope sowie molekularbiologischer Methoden einige bislang gültige Annahmen auf ihre Übertragbarkeit im System Biogasanlage überprüft werden.

2.14.1 Isotopischer Nachweis einer an die acetoklastische Methanogenese gekoppelten hydrogenotrophen Methanbildung

Ausgehend von der stöchiometrischen Annahme, dass Acetat während der Methanogenese zu gleichen Teilen in CH_4 und CO_2 gespalten wird, kam während der Isotopenanalyse am Fermenter die Vermutung auf, dass die freiwerdende Carboxylgruppe grundsätzlich einer daran anschließenden, hydrogenotrophen

Methanogenese zur Verfügung stehen könnte, da H₂ aufgrund einer Vielzahl syntropher Reaktionen, in denen H₂ entsteht, konstant im Reaktor verfügbar ist. In diesem Falle würde H₂ die Stöchiometrie der Methanbildung aus Acetat deutlich beeinflussen:



Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden verschiedene Experimente mit markiertem ¹³C Acetat (CH₃¹³COOH) durchgeführt, um das C-Atom der Carboxylgruppe und sein vermuteter Übergang in CH₄ massenspektroskopisch zu verfolgen. Hierzu wurde das obligat acetoklastisches Isolat, *Methanosaeta concilii* Mst1.3 in Kokultur mit je einer strikt hydrogenotrophen Spezies kultiviert (Tabelle 19). Als gemeinsames Nährmedium diente eine 1:1 Mischung der Nährmedien DSM 287-mod und DSM 334-mod (Tabelle 9) unter Zugabe von 6,8 g / l Natriumacetat mit einem Anteil 5 % ¹³C Markierung. Als Gasphase wurde ein Gemisch aus 50 % H₂ und 50 % N₂ mit 1 bar Überdruck auf die 20 ml Kulturgefäße gegeben. Weiterhin wurde *Methanosarcina mazei* Msc1 (3.1.2), der aufgrund seiner Fähigkeit zur acetoklastischen sowie hydrogenotrophen Methanogenese auch alleine das vermutete Schema bestreiten könnte, in selbigem Medium kultiviert. Zur Kontrolle wurde dabei ein Triplikat-Ansatz ausschließlich mit 100 % N₂ begast, sodass kein H₂ für eine etwaige hydrogenotrophe Methanogenese zur Verfügung stand.

Tabelle 19 Rein- und Mischkulturansätze zur Untersuchung einer hydrogenotrophen Reduktion der bei der acetoklastischen Methanogenese freiwerdenden Carboxylgruppe. Die Kultivierung erfolgte in einer 1:1 Mischung der Nährmedien DSM 287-mod und DSM 334-mod (Tabelle 9) unter Zugabe von 6,8 g / l Natriumacetat mit einem Anteil 5 % ¹³C Markierung. ¹Stantscheff 2013, ²vgl. 3.1.1, ³vgl. 3.1.2.

Kultur 1	Kultur 2	Gasphase
<i>Methanosaeta concilii</i> Isolat Mst1.3 ¹	- (Kontrolle)	H ₂ / N ₂
<i>Methanosaeta concilii</i> Isolat Mst1.3	<i>Methanobacterium formicicum</i> Isolat Mbf1 ²	H ₂ / N ₂
<i>Methanosaeta concilii</i> Isolat Mst1.3	<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSM 3045 ^T	H ₂ / N ₂
<i>Methanosarcina mazei</i> Isolat Msc1 ³	- (Kontrolle)	N ₂
<i>Methanosarcina mazei</i> Isolat Msc1	-	H ₂ / N ₂

Um den hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen in den Mischkulturansätzen eine Mindestmenge an CO₂ zu bieten, wurde *Methanosaeta concilii* Mst1.3 zunächst für vier Wochen alleine im isotope modifizierten Nährmedium kultiviert. An Tag 29 und Tag 40 wurden mit einem Inokulum von 5 % die jeweiligen hydrogenotrophen Spezies (Tabelle 19) in die bereits dicht angewachsenen *Methanosaeta concilii* Mst1.3 Kulturen beimpft und erneut mit dem H₂ / N₂-Gemisch begast. Als Kontrolle wurde in drei Ansätzen zu *Methanosaeta concilii* Mst1.3 keine weitere Kultur überimpft. Für die Isotopenanalyse wurden in regelmäßigen Abständen Gasproben gezogen.

2.14.2 Evaluation des Einflusses von H₂ und CO₂ auf die Stöchiometrie der hydrogenotrophen Methanogenese mit Formiat

Obwohl kaum in Reaktorproben nachweisbar wird die Bedeutung von Formiat als kurzfristiges Intermediat und Elektronencarrier schon seit einiger Zeit diskutiert. Formiat entsteht in Biogasanlagen unter anderem während der Oxidation von Butter- und Propionsäure durch acetogene Bakterien sowie aufgrund der Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase zahlreicher Spezies, welche in Gegenwart von CoA die Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat katalysiert (Cralbe et al. 2011; Bok et al. 2006; Dong und Stams 1995). Seitens hydrogenotropher Archaeen erscheint die Stöchiometrie bezüglich der erforderlichen Substratmenge für die Bildung eines CH₄ Moleküls vergleichsweise ungünstig, liefert ein Molekül Formiat doch nur ein H⁺ bzw. e⁻ für die methanogene Reduktion von CO₂:



Aufgrund der Verfügbarkeit von H₂ in Biogasanlagen wurde vermutet, dass die Reaktion darüber hinaus auch anderen Schemata folgen könnte. Im Folgenden sollte daher der Einfluss von externem H₂ auf die Stöchiometrie untersucht werden, wobei zu prüfen galt, ob hydrogenotrophe Archaeen H⁺ und e⁻ nur aus dem Formiat selbst, oder auch aus der Gas- oder wässrigen Phase ziehen können. Dabei wurde das Isotopenverhältnis δ²H (CH₄) sowie δ¹³C (CH₄) des Isolates *Methanobacterium formicicum* Mbf1 (3.1.1) bei Wachstum in Nährmedien mit unterschiedlich isotopisch markiertem Formiat untersucht. Als Ausgangsmedium diente DSM 287-mod (Tabelle 9), wobei auf die Zugabe von NaHCO₃ verzichtet wurde, um ein mögliches Abfangen von H₂ und CO₂ im Carbonatpuffer zu verhindern. Dabei wurden jeweils 5 % des eingesetzten Formiats in der isotopenmarkierten Form zugegeben (Tabelle 20).

Tabelle 20 Zugabe von stabilen Isotopen (¹³C, ²H) in DSM287-mod Nährmedium ohne NaHCO₃ (Tabelle 9) zur Untersuchung der Kohlen- und Wasserstoffflüsse bei der hydrogenotrophen Methanogenese ausgehend von Formiat. 5 % der Gesamtmenge an Formiat wurden in der jeweiligen isotopenmarkierten Form im Medium eingesetzt. Zur Isotopenmarkierung der wässrigen Phase wurde 1 % des Wassers als ²H₂O zugeben, bei Markierung mit ²H₂ wurde selbiges mit 0,05 bar vorgelegt, anschließend mit 0,8 bar H₂ und schließlich auf 1 bar mit N₂ begast.

Formiat / Markierung	Gasphase (1 bar)
H ¹³ COONa	N ₂
H ¹³ COONa	80% H ₂ / 20% N ₂
² HCOONa	N ₂
² HCOO ² H	N ₂
HCOONa + ² H ₂ O	N ₂
HCOONa + ² H ₂	5% ² H ₂ / 75% H ₂ / 20% N ₂

Die Kultivierung erfolgte in anaeroben 15 ml Kulturröhrchen bei 39 °C im Kulturschüttler bei 180 rpm. Als Inokulum diente eine einheitliche, auf Formiat angezogene Vorkultur, welche jeweils zu

5 % in die Triplikate überimpft wurde. Zu Beginn („Startwert“) und nach 14 Tagen wurden je 5 ml aus der Gasphase der Kulturröhrchen entnommen und anschließend mittels GC-C-IRMS (0) $\delta^2\text{H}$ sowie $\delta^{13}\text{C}$ in CH_4 analysiert.

2.14.3 Untersuchung einer bakteriellen Freisetzung von Methanol aus Pektin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vermutet, dass Methanol als kurzfristiges, schnelles Metabolit mit kurzer Verweilzeit in Biogasanlagen eine Relevanz haben könnte. Um einen tieferen Einblick in den Weg von Methanol in einem Reaktor zu bekommen, galt es, vier Fragestellungen nachzugehen:

Zunächst wurde untersucht, ob das Isolat die veresterten Methoxygruppen ($-\text{OCH}_3$) an der Polygalacturonsäurekette des Pektins abspalten und dadurch Methanol freisetzen kann. In Triplikaten wurde hierzu das Isolat *Streptococcus bovis* StrepBov1 (3.1.6) mit 2,5 % Inokulum in DSM 287-mod Medium (Tabelle 9) unter Zugabe von 5 g / l sterilisiertem Citrus-Pektin (2.12.10) beimpft und bei 39 °C und 1 bar N_2 Gasatmosphäre anaerob kultiviert. Direkt nach dem Beimpfen, sowie nach 1, 4, 6 und 24 Stunden wurden je 0,5 ml der Flüssigkultur zur Untersuchung der Methanolkonzentration im Nährmedium entnommen. Die Analyse erfolgte gaschromatographisch wie zuvor unter Abschnitt 2.9.2 beschrieben. Weitere Fermentationsprodukte des Isolates *Streptococcus bovis* StrepBov1 bei Anzucht auf pektinhaltenen Nährmedien wurden mittels HPLC (2.9.3) sowie GC (2.9.1) ermittelt.

Während bei Pektin die Methoxygruppe über eine Esterbindung an der Polygalacturonsäurekette verknüpft ist, können Methylgruppen zudem auch über Etherbindungen an Moleküle gebunden sein (Abbildung 8). Ob *Streptococcus bovis* StrepBov1 auch letztere Bindungsart in Form von Methanol abspalten kann, wurde in parallelen Ansätzen auf 3-O-Methylglucose untersucht. Die Kultivierung erfolgte auf DSM 287-mod Nährmedium mit 5 g / l 3-O-Methylglucose, wobei in den gleichen Zeitintervallen wie zuvor in den Anzuchten mit Pektin, die Freisetzung von Methanol sowie weiterer Stoffwechselprodukte analysiert wurde.

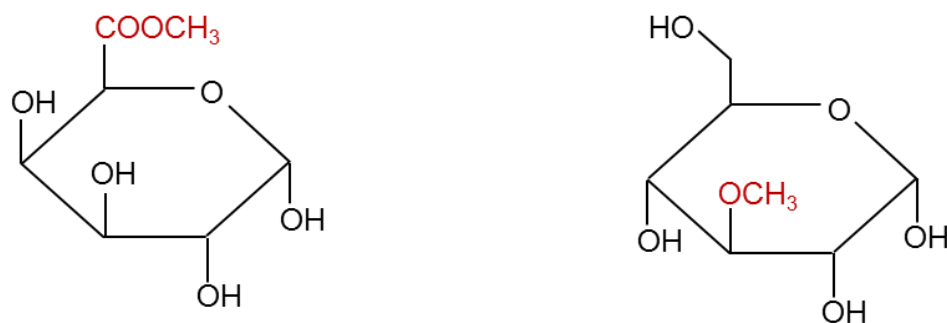


Abbildung 8 links: α -D-Galacturonsäure mit veresteter O-Methylgruppe, rechts: 3-O-Methylglucose mit Etherbindung zu einer Methylgruppe.

2.14.4 Isotopischer Nachweis methylotropher Methanogenese in Batchreaktoren

Um zu untersuchen, ob und wie schnell Methanol zur Methanbildung in Biogasanlagen beitragen kann, wurde ein Batchexperiment mit einer über drei Tage ausgehungerten Reaktorprobe durchgeführt. In 120 ml Anaeroben-Kulturgefäßen wurden je 45 ml acetatfreies DSM 287-mod Medium (Tabelle 9) und 0,4 g Methanol als selektive C-Quelle gegeben. Zum Nachvollziehen der Kohlenstoffflüsse von Methanol zu CH₄ wurden dabei 5 % des eingesetzten Methanols in ¹³C markierter Form eingesetzt. Nach der Zugabe von je 5 g Reaktorprobe als Inokulum wurde die Gasphase der Kulturgefäße mit N₂ gespült und anschließend ein leichter Überdruck von 0,2 bar eingestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 39 °C unter 180 rpm im Kulturschüttler, wobei über einen Zeitraum von 21 Tagen je 5 ml Gasprobe zur Analyse von δ¹³C (CH₄) und δ¹³C (CO₂) entnommen wurden.

2.14.5 Isotopischer Nachweis methylotropher Methanogenese für das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 bei Angebot mehrerer C-Quellen

Darüber hinaus wurde untersucht, ob das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 (3.1.2), welches sowohl methylotroph als auch hydrogenotroph und acetoklastisch Energie gewinnen kann, auch dann Methanol reduziert, wenn neben diesem zusätzlich H₂ / CO₂ und Acetat in großen Mengen zur Verfügung stehen. Dies war von besonderem Interesse, da in Biogasanlagen in der Regel parallel mehrere methanogene C-Quellen verfügbar sind, welche wiederum in ihrer Konzentration je nach eingebrachten Gärsubstrat, Fütterungsintervall und Verweildauer im Fermenter deutlich variieren können. Zur methylotrophen Charakterisierung des Isolates unter diesem Gesichtspunkt wurde daher ein Nährmedium auf Basis von DSM 120-mod (Tabelle 9) mit je 5 g / l Acetat und Methanol hergestellt. Zusätzlich wurde durch regelmäßiges Begasen eine Gasphase von 2 bar H₂ / CO₂ aufrecht gehalten. Somit standen dem Isolat parallel drei C-Quellen, repräsentativ für je einen Methanogeneseppfad zur Verfügung. Methanol wurde zur isotopischen Verfolgung im entstehenden CH₄ zu 5 % ¹³C-markiert hinzugegeben. Sofern Methanol als Methanogenesesubstrat genutzt werden sollte, wäre dieses daher isotopisch im Biogas identifizierbar. Die Kultivierung erfolgte nach 5 % Inokulum in 5 ml Nährmedium in anaeroben 12 ml Kulturröhrchen bei 39 °C und 180 rpm. Die Gasbeprobung zur anschließenden Isotopenuntersuchung fand über 21 Tage hinweg statt, wobei in der ersten Woche zunächst täglich und in den Folgewochen alle zwei Tage Proben entnommen wurden.

2.14.6 Untersuchung der Stoffwechselprodukte methylotropher Bakterien

Mit dem Isolat *Butyribacterium methyilotrophicum* ButMet1 (3.1.3) wurde ein methylotrophes Bakterium über das Angebot von Methanol als selektive C-Quelle aus dem Biogasfermenter isoliert werden. Zur Identifizierung weiterer möglicher methylotropher Bakterien wurden daher auch das Isolat *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 (3.1.4) und das Isolat *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc1 (3.1.5) auf methylotrophes Wachstum untersucht. Hierfür wurden diese Isolate zu 2,5 % Inokulum in das methanolhaltige Nährmedium DSM 318-mod (Tabelle 9) überimpft und unter 1 bar N₂-Gasatmosphäre in 12 ml Kulturröhrchen bei 39 °C kultiviert. Neben regelmäßigen mikroskopischen Untersuchungen

des Wachstums wurde auch der Abbau des Methanols im Nährmedium sowie die dabei entstehenden Stoffwechselprodukte (Säuren, Gase) mittels HPLC und GC (2.9) untersucht. Hierfür wurden je 0,5 ml aus den Flüssigkulturen entnommen, abzentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Autosampler-Probengefäße überführt. Sämtliche Kulturansätze und Messungen erfolgten in Triplikaten.

2.14.7 Untersuchung bakterieller und methanogener Konkurrenzen um Methanol

Sollte Methanol tatsächlich als Substrat in Biogasreaktoren entstehen, so stellte sich die Frage, ob bei dessen ohnehin niedriger Konzentration im Gärsubstrat eine bakterielle oder methanogene Verwertung dieser C1-Verbindung erfolgt. Um dies zu erforschen, wurden Kokulturen aus den bakteriellen Isolaten *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 bzw. *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 und *Methanosarcina mazei* Msc1 bzw. *Methanobacterium formicicum* Mbf1 angesetzt (3.1.1 - 3.1.4). Für die gemeinsame Kultivierung wurde hierfür ein „Kokultur“-Nährmedium (Tabelle 21) entwickelt, welches eine optimale Vitamin- und Spurenelementversorgung für das Wachstum von Archaeen als auch (sulfatreduzierenden) Bakterien gewährleisten sollte.

Tabelle 21 Zusammensetzung des entwickelten „Kokultur“-Nährmediums für die gemeinsame Kultivierung von methylotrophen Bakterien und Archaeen zur Untersuchung einer möglichen Konkurrenz um die C-Quelle Methanol. Dargestellt sind die Einwaagen für 1 l. Die Herstellung erfolgte wie für anaerobe Nährmedien in 2.7 beschrieben, die Spurenelement- und Vitaminsammlösungen entsprechen DSM 141 Medium nach ¹DSMZ 2014d (Tabelle 10Tabelle 11)

Substanz	Menge
K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,6 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
Methanol	5,0 g
Cystein-HCl	0,5 g
Natriumthioglykolat	0,05 g
Ascorbinsäure	0,07 g
Vitaminlösung DSM 141 ¹	10,0 ml
Spurenelementlösung DSM 141 ¹	10,0 ml
Resazurin	1,0 mg
dH ₂ O	1,0 l
Gasatmosphäre (1,5 bar)	80 % H ₂ , 20 % CO ₂
pH-Wert	7,0

Als einzige C-Quelle wurde 5 g / l Methanol eingesetzt. Dabei wurden jeweils zwei Isolate gemeinsam kultiviert, wobei die bakteriellen Spezies zu 5 %, die Archaeen zu 10 % Inokulum hinzugegeben wurden. Ferner wurde als Kontrolle das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 ohne eine bakterielle Kokultur, sowie das Isolat *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 ohne eine weitere methanogene Spezies auf der C-Quelle Methanol kultiviert. Sämtliche Anzuchten erfolgten in 5 ml Nährmedium in anaeroben 12 ml Kulturgefäßen unter 1 bar N₂-Gasatmosphäre bei 39 °C.

Zusätzlich wurden mögliche Konkurrenzen zwischen Kokulturen aus dem Sulfatreduzierer *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 oder dem syntroph acetatoxidierenden *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc1 und einer methanogenen Spezies auf den C-Quellen Acetat bzw. H₂ / CO₂ untersucht (Tabelle 22). Statt Methanol wurde in diesen Ansätzen 5 g / l Natriumacetat bzw. eine H₂ / CO₂ Gasphase von 1 bar, welche regelmäßig erneuert wurde, angeboten. Dadurch sollte überprüft werden, ob eine mögliche Konkurrenz zwischen den beiden Domänen nur bei einer Kultivierung auf Methanol, oder zusätzlich auch bei den C-Quellen Acetat oder H₂ / CO₂ zu verzeichnen ist.

Tabelle 22 Bakterielle und methanogene Kokulturen zur Untersuchung einer möglichen Konkurrenz um eine C-Quelle. Methanol bzw. Natriumacetat wurden zu 5 g / l, H₂ / CO₂ mit 1 bar Überdruck als jeweils einzige C-Quelle in „Kokultur“-Medium (Tabelle 21) angeboten. Die Isolate sind in 3.1 näher beschrieben.

Bakterielles Isolat	Methanogenes Isolat	C-Quelle
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ButMet1	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol
- (Kontrolle)	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ButMet1	- (Kontrolle)	Methanol
<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> TepAc1	<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	Acetat
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Acetat
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	H ₂ / CO ₂
- (Kontrolle)	<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	H ₂ / CO ₂

Neben regelmäßigen hellfeld- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde zusätzlich das methanogene Wachstum anhand der Bildung von CH₄ in den Kulturröhrchen bestimmt.. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurden hierfür wöchentlich 3 ml Gasphase entnommen und mittels GC analysiert (2.9.1). Um zu identifizieren, ob *Methanosarcina mazei* Msc1 die Stoffwechselprodukte von *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 bei Anzucht auf Methanol nutzen kann, wurde für diese Ansätze zusätzlich eine HPLC Messung am letzten Versuchstag durchgeführt.

2.14.8 Anreicherung methanoxidierender Bakterien in Biogasanlagen

In Biogasanlagen hat man bislang aufgrund der nahezu anoxischen Bedingungen ($O_2 \ll 1\%$) ein Vorkommen methanoxidierender Bakterien ausgeschlossen. Da diese Arbeit jedoch auch einen Fokus auf bislang unerwartete mikrobielle Kohlenstoffflüsse im Umfeld der Methanogenese legen möchte, wurde zunächst versucht, eine Anreicherung methanotropher Bakterien aus Reaktorsubstrat durchzuführen. Hierzu wurden 100 ml Kulturgefäßen mit je 20 ml Nitratmineralsalz-Medium NMS 131 (Tabelle 8) eingesetzt, welche zu 2 - 5 % Inokulum mit einer Reaktorprobe beimpft wurden. Die methanotrophe C-Quelle wurde in Form eines Gasgemisches aus CH_4 und synthetischer Luft (v / v, 80 / 20) bei einem Überdruck von 2 bar angeboten. Die Anreicherung erfolgte bei 39 °C in Kulturschüttlern bei 180 rpm, wobei die Gasphase wöchentlich erneuert wurde.

Bereits nach 14 Tagen konnte ein zunehmender Bewuchs mit verschiedenartiger Morphologie in den Nährmedien festgestellt werden. Für eine weitere Anreicherung wurden diese Ansätze als Inokulum zu 2 % in unbeimpftes DSM 131-Medium eingesetzt. Zur Untersuchung einer potentiellen Abnahme von CH_4 aufgrund des Wachstums methanoxidierender Bakterien wurden zusätzlich regelmäßig Gasproben entnommen, um gaschromatographisch die CH_4 -Konzentration in den Kulturgefäßen zu ermitteln.

2.14.9 Molekularbiologische Analyse der methanotrophen Population im Fermenter

Um zu prüfen, ob es sich bei den Anreicherungskulturen tatsächlich um methanotrophe Bakterien handelt und zusätzlich zu untersuchen, welche methanotrophen Spezies in einem Biogasfermenter zu finden sind, wurde eine Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) durchgeführt. Durch diese Methode können selbst komplexe Umweltproben, in denen eine Vielzahl verschiedener Spezies vorliegt, auf Artniveau aufgelöst werden. Dabei wird zunächst eine spezifische Gensequenz innerhalb der Probe mittels PCR amplifiziert, diese anschließend in einen Vektor ligiert und in einen kompetenten Stamm transformiert. Da in der Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors jeweils nur ein zufälliges DNA-Fragment aus dem PCR-Produkt binden kann, trägt jeder Vektor die spezifische Gensequenz eines bestimmten Zielorganismus. Wächst die kompetente Zelle, wird auch der Vektor mit dem dort eingefügten DNA-Abschnitt vervielfältigt, sodass sich auf einer Agarplatte Kolonien ausbilden, die sich jeweils nur im DNA-Insert der MCS des Vektors unterscheiden. Die Kolonien können daraufhin gepickt, die in den Vektor ligierte DNA erneut amplifiziert und anschließend über eine Sequenzierung einer bestimmten Art zugeordnet werden, sodass komplexe mikrobielle Populationen charakterisiert werden können.

Für die Analyse der methanotrophen Population der beprobten Biogasanlage wurden zunächst 20 ml der ersten, 14 Tage alten Anreicherungskultur über einen Faltenfilter vorfiltriert, sodass die pflanzlichen Anteile aus den mit Reaktorsubstrat beimpften Nährmedien entfernt werden konnten. Anschließend wurde das Filtrat mit Hilfe eines 0,45 µm Cellulose-Filters weiter bereinigt und bei $10.000 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Im Zentrifugenröhrchen konnte dabei ein bräunliches Zellpellet gewonnen werden, wel-

ches über zwei weitere Waschstreite mit steriler Ringerlösung (0,9 % NaCl) und Zentrifugation erneut gelöst und weiter aufgereinigt werden konnte. Dies erschien notwendig, um die Vielzahl natürlicher PCR-Inhibitoren wie etwa Huminsäuren aus der Reaktor-anreicherungskultur zu entfernen. Das hierbei entstandene Zellpellet konnte nun für die DNA-Extraktion mit dem GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit eingesetzt werden.

Spezifisch für methanoxidierende Bakterien ist der Besitz der Methan-Monooxygenase (*pMMO*), einem aus vier Untereinheiten aufgebauten Multiproteinkomplex, der den Oxidationsschritt von CH₄ zu Methanol katalysiert (Basch et al. 1999; Lieberman und Rosenzweig 2005). Die für die Untereinheiten codierenden Gensequenzen gelten als ähnlich konserviert wie die Sequenzen des 16S rRNA Gens und sind bislang nur in methanotrophen Bakterien detektiert worden. Für die Charakterisierung der methanotrophen Mikrobiota des Fermenters wurde daher die Gensequenz der *pMMO* Untereinheit A, kurz *pmoA*, hinzugezogen (Pester et al. 2004; Kolb et al. 2003; Cheng et al. 1999; McDonald und Murrell 1997). Die Amplifizierung der *pmoA* Gensequenz im DNA-Extrakt der methanotrophen Anreicherung erfolgte mit den Primern pmof1 und pmor (Cheng et al. 1999) und dem PCR-Programm nach Pester et al. 2004 (Tabelle 15, Tabelle 23 und Tabelle 24).

Tabelle 23 Charakteristika der Primer zur Amplifizierung der spezifischen *pmoA* Gensequenz zur Identifizierung methanoxidierender Bakterien (Cheng et al. 1999). Die Primerpaar pmof1 / pmor wurde für die Klonierung, Primerpaar pmof2 / pmor2 für die nested-PCR eingesetzt.

Zielgen	Primer	Sequenz 5' – 3'	T _M °C	Amplifikatlänge
<i>pmoA</i>	pmof1	GGG GGA ACT TCT GGG GIT GGA C	71,5	330 bp
	pmof2	TTC TAY CCD RRC AAC TGG CC	59,0	178 bp
	pmor	GGG GGR CIA CGT CIT TAC CGA A	62,2	.

Tabelle 24 PCR-Programm zur Amplifizierung der *pmoA* Gensequenz.

T [°C]	Dauer [min]	Zyklen
95	05:00	1
94	01:00	
45	01:00	35
72	01:00	
72	10:00	1

Für eine Erhöhung der DNA-Ausbeute wurden vier parallele PCR-Ansätze miteinander vereinigt und gemeinsam über eine Säule des GenElute™ PCR Clean-Up Kits (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgereinigt, wobei die finale Elution in 40 µl Elutionspuffer erfolgte. Cheng et al. 1999 empfehlen eine nested-PCR zum definitiven Nachweis, ob die amplifizierte 330 bp Sequenz dem *pmoA* Gene entstammt, weshalb 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes als Template für eine PCR mit einem weiteren

forward-Primer, pmof2, aber gleichbleibenden reverse-Primer pmor durchgeführt wurde (Tabelle 23 und Tabelle 24). Mittels Gelelektrophorese konnte ein distinktes 178 bp Amplifikat identifiziert werden, welches die Spezifität des ersten, 330 bp langen PCR-Produktes verifiziert. Da sich gezeigt hatte, dass eine hohe Reinheit der DNA den Klonierungserfolg deutlich verbesserte, wurde das PCR-Produkt über eine Gelelektrophorese in einem 1,5 % Agarosegel bei 80 V und 1,5 h Laufzeit erneut aufgetrennt. Die dabei entstandene Gelbande auf der Höhe von 330 bp wurde nun mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und eine DNA-Extraktion mit dem GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vorgenommen.

Die Klonierung erfolgte mit dem TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen™ by life technologies™, Carlsbad, CA, USA) über pCR® II-Topo® Vektoren in chemisch kompetente *E. coli*. Für die Klonierung wurden 4 µl PCR-Produkt und 1 µl Vektor zusammengeführt, diese für 5 min bei Raumtemperatur ligiert und anschließend 2 µl der Reaktion zu den kompetenten Zellen gegeben. Die Transformation erfolgte nach einem 30 min Eisbad über einen Hitzeschock, indem das Zell-Vektorgemisch für 30 s in einen auf 42 °C vorgeheizten Heizblock überführt und anschließend zügig zurück in das Eisbad gestellt wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben, wobei die Zellen in verschiedenen Inokula von 15 - 100 µl auf LB-Platten (

Tabelle 7) mit 50 µg / ml Kanamycin ausplattiert wurden. Nach einer Kultivierung bei 37 °C über Nacht wurden am Folgetag insgesamt 72 Klone gepickt und in jeweils 30 µl hochreinem Wasser eluiert. Zur Amplifizierung der klonierten DNA-Sequenz in den Vektoren wurden 10 µl dieser Zellsuspension als Template für eine PCR eingesetzt, wobei mit den Primern T3 und T7 zwei die MCS flankierende Primerpaare verwendet wurden (Tabelle 25 und Tabelle 26).

Tabelle 25 Charakteristika der Primer zur Amplifizierung des klonierten DNA-Fragments im pCR® II-Topo® Vektor. Die Primer flankieren die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors. Die PCR-Produktlänge ist bedingt durch die Länge der klonierten Sequenz.

Ziel	Primer	Sequenz 5' – 3'	T _M	Referenz
MCS	T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	47,7 °C	(Invitrogen™ 2014)
	T7	AAT ACG ACT CAC TAT AGG G	46,8 °C	

Tabelle 26 PCR-Programm zur Amplifikation des klonierten DNA-Fragments im pCR® II-Topo® Vektor.

T [°C]	Dauer [min]	Zyklen
95	10:00	1
95	01:00	40
45	01:00	
72	02:00	
72	10:00	

Zum Vergleich der klonierten *pmoA* Gensequenzen wurden anschließend ein zweifacher Restriktionsverdau mit den Enzymen *MspI* (C[^]CGG) und *HhaI* (GCG[^]C) (beide Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) durchgeführt, wobei 10 µl des PCR-Produktes, 1 µl Enzym und 1 µl Tango-Puffer zusammengeführt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 80 °C für 20 min. Der gesamte 12 µl Ansatz wurde anschließend mit 5 µl Ladepuffer vermischt und zur Analyse der Schnittmuster auf ein 2 % TBE-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 60 V für 3 h, sodass nach einer 30 min Färbung im 1 % Ethidiumbromidbad die Auswertung der Fragmente erfolgen konnte. Alle Klonierungsansätze, die in mindestens einer der beiden Restriktionsverdau ein neuartiges Schnittmuster ergaben, ließen eine weitere Art vermuteten, weshalb 5 µl der jeweiligen PCR-Produkte mit dem Primer pmof1 sequenziert wurden.

2.15 Analyse mikrobieller Populationsdynamiken im Fermenter

Die Isotopensignatur von CH₄ wird weitestgehend durch die beteiligten methanogenen Archaeen und ihren Methanogenesewegen bestimmt. Mithilfe von Isolaten aus Biogasanlagen (2.13.1) sowie Batchfermentern (2.13.2) wurde bereits die natürliche Isotopensignatur der hydrogenotrophen, acetoklastischen sowie methylotrophen Methanogenese untersucht. Für ein besseres Verständnis der kontinuierlich an der Biogasanlage des DBFZ gemessenen Isotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte) wird im Folgenden die methanogene sowie partiell die bakterielle Fermenter-Mikrobiologie in einem Zeitraum von 70 Tagen unter verschiedenen Raumbelastungen im Reaktor untersucht. Dadurch sollte herausgefunden werden, wie dynamisch die methanogene Population auf variierende Prozessbedingungen (Fütterung, Substratzusammensetzung, Säurekonzentration, etc.) reagiert und damit das Isotopenverhältnisse im Biogas beeinflussen kann. Zur Untersuchung wurden daher in einem etwa wöchentlichen Intervall insgesamt neun Reaktorproben gezogen und eine DNA-Extraktion (2.11.2) vorgenommen. Die Probezeitpunkte und die aktuelle Raumbelastung während der Untersuchungsperiode wurden bereits in Abbildung 5 in Kapitel 2.11 dargestellt. Die Analyse der Mikrobiota erfolgte mittels quantitativer real-time PCR (qPCR).

2.15.1 Entwicklung eines einheitlichen Quantifizierungsstandards für qPCR-Analysen

QPCR-Untersuchungen erfordern für eine quantitative Detektion von Zielorganismen in Umweltproben das Mitführen eines vorher definierten Zellzahl-Standards mit bekannter Kopienanzahl, welcher während der Amplifikation in einer Reihe von mindestens fünf dekadischen Verdünnungsstufen mitgeführt wird. Die Voraussetzung ist hierbei, dass die eingesetzten spezifischen Primer sowohl an die zu quantifizierenden Zielorganismen in der Umweltprobe als auch an den Zellzahl-Standard binden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein neuer und einheitlicher Standard zur Quantifizierung der Kopienanzahl verschiedener Zielorganismen in Reaktorproben entwickelt, indem ein 508 bp langer synthetischer DNA-Strang kreiert wurde, der die Primerbindesequenzen von insgesamt elf mikrobiellen Zielgruppen in jeweils passender Amplifikatlänge trägt (Tabelle 27). Aufgrund des Fokus auf die Methanogenese wurde spezifische Primer für die 16S rRNA Gensequenz der Ordnungen Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanococcales und Methanosarcinales sowie der Familien Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae ausgewählt. Darüber hinaus wurden Primer für die Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl hinzugezogen. Da die Methanogenese in einer Biogasanlage zudem durch eine Vielzahl verschiedener Bakterien beeinflusst wird, die entweder konkurrierend oder aber als symbiotische Partner agieren können, wurden beispielhaft die Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien sowie propionsäureabbauender Bakterien bestimmt. Da erstere Spezies Sulfat als finalen Elektronenakzeptor nutzen können, weisen sie im Vergleich zu methanogenen Archaeen eine höhere Affinität zu Acetat, H_2/CO_2 und Formiat auf, weshalb sie insbesondere bei niedrigen Substratkonzentrationen deutliche Vorteile gegenüber den Methanbildnern aufweisen können (Moestedt et al. 2013; Rabus et al. 2013; Lovley und Klug 1983). Ihr Anteil im Reaktor wurde anhand des für sie charakteristischen dissimilatorischen Sulfatreduktase Gens *dsrB* untersucht. Propionsäureabbauende Bakterien hingegen sind in der Acetogenese des Fermentationsprozesses zu finden und liefern dabei nicht nur große Mengen Acetat für acetoklastische Archaeen, sondern setzen zudem erhebliche Konzentrationen an H_2 frei, die sie aus thermodynamischen Gründen in Form syntropher Gemeinschaften an hydrogenotrophe Methanbakterien weitergeben können. Ihr Vorkommen wurde mithilfe spezifischer Primer für das Propionat Transferase Gen *pct* untersucht (Li et al. 2013; Schweiger und Buckel 1984). Weiterhin wurde das Auftreten methanoxidierender Bakterien, die bereits unter 2.14.8 angereichert werden konnten, mit Primern für die *pmoA* Gensequenz untersucht.

Die Spezifität jedes Primerpaares wurde mithilfe der Primerblast Option (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, zuletzt abgerufen am 03.07.2015) anhand der NCBI nr-Sequenzdatenbank überprüft. Zudem wurde über einen Sequenzvergleich mit mindestens einem potentiellen Zielorganismus der NCBI Gensequenz Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>, zuletzt abgerufen am 03.07.2015) die Amplifikatlänge jedes Primerpaares ermittelt.

Die Entwicklung und Herstellung des synthetischen DNA-Standards ist in Abbildung 9 überblickhaft dargestellt. Zunächst wurden die ausgewählten Primersequenzen in einer einzelsträngigen Form *in silico* hintereinander platziert (Tabelle 28). Um zu gewährleisten, dass der synthetische Standard während der Amplifizierung die gleichen PCR-Produktlängen wie die Zielorganismen in der Reaktorprobe ausbilden, wurden die jeweiligen forward- und reverse-Primerpaare im Abstand der zuvor ermittelten Amplifikat-längen des jeweiligen Ziel-Referenzstammes platziert (Tabelle 27). Teilweise mussten hierfür auch „Platzhalter-Basen“ („Spacer“) im synthetischen DNA-Strang platziert werden (Tabelle 28), um die Primerpaare entsprechend ihrer Amplifikatlängen voneinander entfernen zu können. Um später doppelsträngige PCR-Produkte ausbilden zu können, musste jeweils eine der beiden Sequenzen eines Primer-paares in revers-komplementärer Weise im Strang platziert werden. Zuletzt wurde an den beiden flankierenden Strangenden die Restriktionssequenz von *Not1* platziert. Nach einer finalen Kontrolle, ob durch das Zusammenfügen der Primersequenzen etwaige Restriktionsschnittstellen oder weitere Pri-merbindestellen entstanden sind, wurde das synthetische DNA-Fragment über den Standard Gen Syn-theseservice der Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, bezogen. Dort wurde das 508 bp lange DNA-Fragment synthetisiert, in einen pEX-A2 Vektor kloniert und anschließend in einen dam^+ / dcm^+ *E. coli* transformiert. Die Auslieferung erfolgte in Form einer mit Glycerin stabilisierten Flüssigkultur, welche direkt auf einer LB Platte mit 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Ampicillin ausgestrichen wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Tabelle 27 Charakteristika der eingesetzten Primer für qPCR-Analysen der Fermentermikrobiota und Platzierung der Primerbindesequenzen im synthetischen DNA-Strang als Kopien-Standard.
 T_M = Schmelztemperatur des Primers, T_A = Annealingtemperatur im PCR-Amplifizierungszyklus.

Zielorganismen	Primer	Primer Sequenz 5' → 3'	Länge (bp)	T_M (°C)	T_A (°C)	Primerbindesequenz im synthetischen DNA-Strang	Amplifikat Länge (bp)	Primerposition (bp)		Referenzstamm	Quelle
								von	bis		
Bakterien	BAC338F	ACT CCT ACG GGA GGC AG	17	57,3	57,6	ACT CCT ACG GGA GGC AG	466	19	35	<i>Cupriavidus necator</i> DSM545	Yu et al. 2005
	BAC805R	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC	21	57,9		GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC		464	484		
Sulfatreduzierer	DSRp2060F	CAA CAT CGT YCA YAC CCA GGG	21	61,8	60,1	CAA CAT CGT CCA CAC CCA GGG	350	114	134	<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DSM2154 ^T	Moestedt et al. 2013
	DSR4R	GTG TAG CAG TTA CCG CA	17	52,8		TGC GGT AAC TGC TAC AC		447	463		
Propionsäureabbauer	PCT-C1F	CCA GAA CGA CGG CAA RTC C	19	59,9	59,8	CCA GAA CGA CGG CAA ATC C	229	76	94	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i> DSM16706	Li et al. 2013
	PCT-C1R	CAC GAA CGT CTT CAA WCC CAC	21	59,8		GTG GGA TTG AAG ACG TTC GTG		284	304		
Methanoxidierer	A189F	GGN GAC TGG GAC TTC TGG	18	59,4	60,2	GGT GAC TGG GAC TTC TGG	508	1	18	<i>Methylococcus capsulatus</i> ATCC19069	Kolb 2003
	M661R	CCG GMG CAA CGT CYT TAC C	19	61,0		GGT AAG GAC GTT GCG CCG G		490	508		
Archaeen	931F	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A	19	61,6	60,0	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A	169	95	113	<i>Methanobacterium formicicum</i> DSM1535 ^T	Einen et al., 2008
	M1100R	BGG GTC TCG CTC GTT RCC	18	58,4		GGC AAC GAG CGA GAC CCG		246	263		
Methanomicrobiales ¹	MMB749F	TYC GAC AGT GAG GRA CGA AAG CTG	24	65,2	55,4	CAG CTT TCG TCC CTC ACT GTC GAA	84	195	218	<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSM3045 ^T	Yu et al. 2005
	MMB832R	CAC CTA ACG CRC ATH GTT TAC	21	57,5		CAC CTA ACG CGC ATA GTT TAC		135	155		
Methanobacteriales ²	MBT857F	CGW AGG GAA GCT GTT AAG T	19	55,0	55,2	CGA AGG GAA GCT GTT AAG T	90	156	174	<i>Methanobacterium formicicum</i> DSM1535 ^T	Yu et al. 2005
	MBT929R	TCC ACG CGT TGT GGT GCT	18	58,4		AGC ACC ACA ACG CGT GGA		228	245		
Methanococcales	MCC686F	TAG CGG TGR AAT GYG TTG ATC C	22	60,3	56,8	GGA TCA ACA CAT TTC ACC GCT A	152*	305	326	<i>Methanococcus maripaludis</i> DSM2067	Yu et al. 2005
	MCC832R	CAC CTA GTY CGC ARA GTT TA	20	55,3		CAC CTA GTT CGC AAA GTT TA		175	194		
Methanosarcinales	MSL860F	AGG GAA GCC GTG AAG CGA RCC	21	65,3	61,3	AGG GAA GCC GTG AAG CGA GCC	300	55	75	<i>Methanosarcina mazei</i> DSM2053 ^T	Yu et al. 2005
MSL1159R	GGT CCC CAC AGW GTA CC	17	57,3		GGT ACT CTG TGG GGA CC	338		354			
Methanosarcinaceae	MSC380F	GAA ACC GYG ATA AGG GGA	18	54,8	53,6	GAA ACC GTG ATA AGG GGA	408	36	53	<i>Methanosarcina mazei</i> DSM2053 ^T	Yu et al. 2005
	MSC828R	TAG CGA RCA TCG TTT ACG	18	52,5		CGT AAA CGA TGC TCG CTA		426	443		
Methanosaetaeae	MST702F	TAA TCC TYG ARG GAC CAC CA	20	56,4	55,2	TAA TCC TTG AAG GAC CAC CA	160	264	283	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM3013	Yu et al. 2005
	MST862R	CCT ACG GCA CCR ACM AC	17	54,9		GTT GTC GGT GCC GTA GG		408	424		

*Sequenzabgleich mit dem Referenzstamm *Methanococcus maripaludis* DSM2067 ergibt ein 147 bp Fragment

¹ Mögliche falsche Positivergebnisse: *Methanococcoides* sp. SBAK-TMA-1, *Methanobacterium formicicum* str. 20-2, *Methanomethylivorans* (9 Stämme, 2 Klone)

² Mögliche falsche Positivergebnisse: *Methanococcus* (18 Stämme), *Methanothermococcus* (3 Stämme)

Tabelle 28 Platzierung und Sequenzen der jeweiligen Primerbindestellen im synthetischen DNA-Strang zur Herstellung des qPCR-Quantifizierungsstandard. Als Spacer bezeichnete Sequenzen sind Platzhalter mit zufällig gewählter Basenfolge zur Gewährleistung der spezifischen Amplifikatlängen der jeweiligen Primerpaare. Zusammengehörige Primerpaare (Tabelle 27) sind mit derselben Farbe markiert.

[1] A189		[2] BAC338F		[3] MSC380F		<i>Spacer</i>		[4] MSL860F	
1	18	19	35	36	53	54	54	55	75
GGT GAC TGG GAC TTC TGG		ACT CCT ACG GGA GGC AG		GAA ACC GTG ATA AGG GGA		T		AGG GAA GCC GTG AAG CGA GCC	

[5] PCT-C1F		[6] 931F		[7] DSRp2060F		[8] MMB832R		[9] MBT857F	
76	94	95	113	114	134	135	155	156	174
CCA GAA CGA CGG CAA ATC C		AGG AAT TGG CGG GGG AGC A		CAA CAT CGT CCA CAC CCA GGG		CAC CTA ACG CGC ATA GTT TAC		CGA AGG GAA GCT GTT AAG T	

[10] MCC832R		MMB749F [8]		<i>Spacer</i>		MBT929R [9]		M1100R [6]	
175	194	195	218	219	227	228	245	246	263
CAC CTA GTT CGC AAA GTT TA		CAG CTT TCG TCC CTC ACT GTC GAA		GCT TAA CTT		AGC ACC ACA ACG CGT GGA		GGC AAC GAG CGA GAC CCG	

[11] MST702F		PCT-C1R [5]		MCC686F [10]		<i>Spacer</i>		MSL1159R [4]	
264	283	284	304	305	326	327	337	338	354
TAA TCC TTG AAG GAC CAC CA		GTG GGA TTG AAG ACG TTC GTG		GGA TCA ACA CAT TTC ACC GCT A		TGT CAC TAC TT		GGT ACT CTG TGG GGA CC	

<i>Spacer</i>		MST862R [11]		<i>Spacer</i>		MSC828R [3]	
355	407	408	406	407	407	407	443
TCG CTT CAA CAA GCC TCC TAG GTG GCA TTT CAG GAG GGG CCC GCA GGG AGG AA		GTT GTC GGT GCC GTA GG		T		CGT AAA CGA TGC TCG CTA	

<i>Spacer</i>		DSR4R [7]		BAC805R [2]		<i>Spacer</i>		M661R [1]	
444	446	447	463	464	484	485	489	490	508
GTA		TGC GGT AAC TGC TAC AC		GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC		CTATA		GGT AAG GAC GTT GCG CCG G	

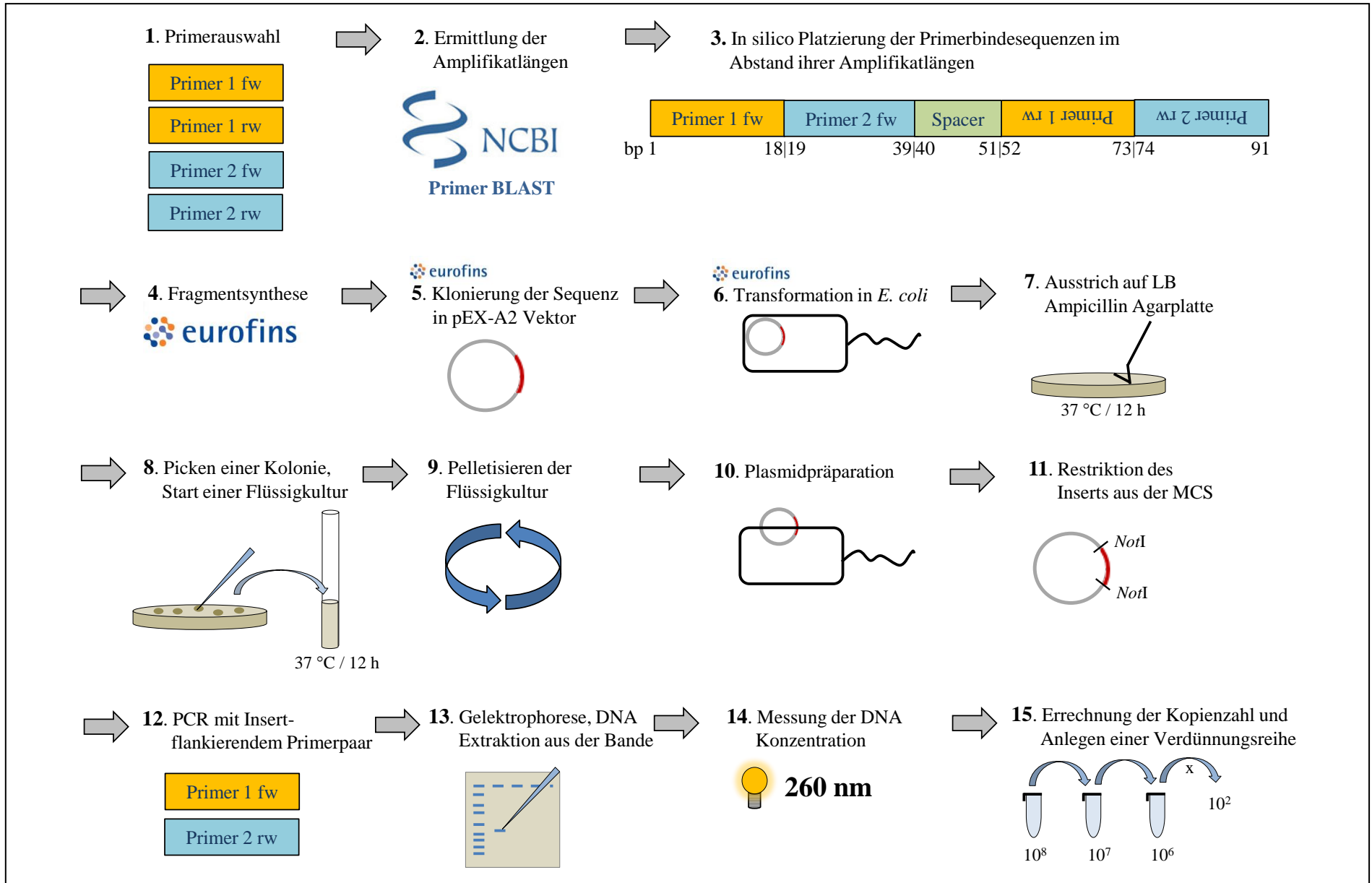


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Herstellung des synthetischen DNA-Kopienstandards für qPCR-Analysen. Das Verfahren ist im Text unter 2.15 näher erläutert.

Am Folgetag wurde eine Kolonie gepickt, um eine neue Kultur in flüssigem LB Medium (100 µg / mg Ampicillin) zu starten. Nach 12 h Kultivierung bei 37 °C wurde das dicht bewachsene Nährmedium für 2 min bei 3.500 × g abzentrifugiert und das Pellet für eine Plasmidpräparation mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit 1 (Peqlab, Erlangen) eingesetzt. Um nun das synthetisierte Insert aus der MCS des Vektors zu schneiden, wurden 0,5 µl der Plasmidpräparation mit 16 µl hochreinem Wasser, 2 µl Restriktionspuffer 0 sowie 1,5 µl Enzym *Not1* (beides Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot) zusammengeführt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz anschließend für 20 min auf 80 °C temperiert. Im Anschluss erfolgte eine PCR mit dem das klonierte Insert flankierenden Primerpaar A189R / M661R (Tabelle 27 und Tabelle 28), wobei eine *Pfu* Polymerase (Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot) mit besonders niedriger Fehlerrate gewählt wurde. Die PCR startete mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 min, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung bei 95 °C / 30 s, Annealing bei 57,6 °C / 30 s sowie einer Elongation bei 72 °C / 1 min. Die Amplifikation endete mit einem finalen Elongationsschritt für 10 min bei 72 °C. Zur Aufreinigung wurde das komplette PCR-Produkt auf ein 1 % (w / v) TBE-Agarosegel aufgetragen und für 45 min bei 100 V aufgetrennt, wobei anhand eines mitgeführten DNA-Größenstandards ein 508 bp langes Fragment im Gel identifiziert werden konnte. Nachdem dieses mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten wurde, erfolgte eine DNA-Extraktion aus dem Gelstück mithilfe des GenElute™ Gel Extraction Kits (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit dem Standard wurde die Konzentration der DNA photometrisch bei 260 nm bestimmt (BioPhotometer Plus, Eppendorf AG, Hamburg), sodass aufgrund der bekannten Amplifikatlänge (508 bp) die Anzahl an Kopien / µl PCR-Produkt über folgende Gleichung ermittelt werden konnte (Godornes et al. 2007):

$$\frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l PCR-Produkt}} = \frac{c_{\text{DNA}} \times N_{\text{A}}}{I_{\text{Amplifikat}} \times m_{\text{mol} / \text{bp}}}$$

c_{DNA} = photometrisch ermittelten DNA-Konzentration in g / µl; N_{A} = Avogadro-Konstante;
 $I_{\text{Amplifikat}}$ = PCR-Amplifikatlänge; $m_{\text{mol} / \text{bp}}$ = durchschnittlichen Masse eines bp ($m_{\text{mol} / \text{bp}}$)

Zur Berechnung der Kopienzahl wurde das Produkt aus der photometrisch ermittelten DNA-Konzentration (c_{DNA}) in g / µl und der Avogadro-Konstante (N_{A}) durch das Produkt der PCR-Amplifikatlänge ($I_{\text{Amplifikat}}$) in bp und der durchschnittlichen Masse eines bp ($m_{\text{mol} / \text{bp}}$) von 660 Da / bp dividiert, sodass mit dem PCR-Produkt eine Verdünnungsreihe von 10^8 bis 10^2 Kopien / µl in hochreinem Wasser angelegt werden konnte.

2.15.2 Evaluierung des entwickelten qPCR-Quantifizierungsstandards

Die Spezifität der ausgewählten Primersets sowie ihre Bindekapazität an dem entwickelten, synthetischen DNA-Standard wurden über eine PCR und anschließendem Amplifikatlängenvergleich mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde für jedes Primerpaar eine PCR mit der 10^5 Kopien / μl Verdünnung des Standards sowie eines Referenzstamms (Tabelle 27) durchgeführt. Die PCR erfolgte bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ / 5 min initialer Denaturierung und 40 Zyklen aus Denaturierung bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ / 15 s, Annealing bei optimaler Schmelztemperatur des jeweiligen Primersets (Tabelle 27) für 30 s und Elongation bei $72\text{ }^\circ\text{C}$ / 20 s. Eine finale Elongation bei $72\text{ }^\circ\text{C}$ / 10 min beendete die Amplifikation. Die Spezifität und die Produktlängen der PCR wurden anschließend in einem 1 % (w / v) TBE Agarosegel (60 V für 1,5 h) bestätigt.

2.15.3 Durchführung der qPCR zur mikrobiellen Analyse der Reaktorproben

Sämtliche qPCR-Analysen erfolgten als SYBR Green Assay in einem realplex² ep gradinet S Mastercycler der Firma Eppendorf, Hamburg. Für die Auswertung der Messergebnisse wurde die Software realplex 2.2. aus der gleichen Firma hinzugezogen. Pro qPCR-Reaktion wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), jeweils $0,75\text{ }\mu\text{l}$ der Primer (Endkonzentration 400 mM) und $7\text{ }\mu\text{l}$ hochreines Wasser in den PCR-Reaktionsgefäßen (EasyStrip snap tubes, Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot) vorgelegt. Die Template-DNA des Standards bzw. der Reaktorproben wurden zu $1,5\text{ }\mu\text{l}$ in die Deckeln der Reaktionsgefäße pipettiert, wodurch aufgrund der visuellen Kontrolle ein deutlich präziseres Zugeben der DNA gewährleistet werden konnte. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei $2.204 \times g$ zentrifugiert. Alle Verdünnungsstufen und Fermenter DNA-Extrakte wurden als Vierfach-Ansätze gemessen. Die qPCR erfolgte dabei bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ / 5 min initialer Denaturierung und 40 Zyklen aus Denaturierung bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ / 15 s, Annealing bei optimaler Schmelztemperatur des jeweiligen Primersets (Tabelle 27) für 30 s und Elongation mit Fluoreszenzmessung bei $72\text{ }^\circ\text{C}$ / 20 s. Zur Analyse unspezifischer Fehlbindungen wurde eine Schmelzkurvenanalyse in $1\text{ }^\circ\text{C}$ / min Schritten von $65 - 95\text{ }^\circ\text{C}$ angefügt.

Indem die Anzahl an Zyklen, die jede Verdünnungsstufe des Standards benötigte, um einen definierten Fluoreszenzschwellenwert (cT-Wert „cycle threshold“) zu erreichen, gegen die bekannte Kopienanzahl der jeweiligen Verdünnungsstufen aufgetragen wurde, konnte eine Kalibriergerade errechnet werden. Anhand dieser lassen sich nun die Zellzahlen der unbekanntes Population in den Fermenterproben ablesen. Zur Kontrolle wurde ferner die Effizienz E der Amplifikation über die Steigung der Standardkurve nach $E = 10^{-1 / \text{Steigung}} - 1$ sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 der aus den Verdünnungsstufen konstruierten Kalibriergeraden errechnet. Es ist zu erwähnen, dass aufgrund der Verwendung von Primersets auf Ordnungs- und Familienebene die variable Kopienanzahl der Zielgene einzelner Spezies nicht berücksichtigt werden konnte, sodass eine Kopie des Standards als eine Zelle in der Reaktorprobe definiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Isolate aus der FBGA des DBFZ

Zur näheren Untersuchung der Kohlenstoffflüsse im Fermenter der FBGA des DBFZ, Leipzig, wurden verschiedene methanogene und bakterielle Spezies isoliert. Mithilfe analytischer Methoden wie dem Einsatz stabiler Isotope wurden mögliche mikrobielle Interaktionen und Substratflüsse anhand von Rein- und Mischkulturansätzen untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf den Kohlenstoffflüssen entlang der letzten Stufe des anaeroben Abbaus, der Methanogenese. Daher wurde das Wachstum bakterieller Isolate gezielt nur auf Substraten erprobt, die auch von methanogenen Archaea genutzt werden können, sodass auch etwaige Konkurrenzen oder Symbiosen festgestellt werden konnten. Ziel war es, ein besseres Verständnis der prozessbedingten isotopischen Veränderungen ($\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$) im Biogas zu erlangen und damit die Möglichkeiten einer online Isotopenuntersuchung als einen neuen Monitoring-Parameter zur Überwachung des Fermentationsprozesses in Biogasanlagen zu evaluieren. Um die Bedeutung und den Verlauf des methylo trophen Stoffwechselfades ausgehend von Methanol zu identifizieren wurden ferner mit Pektin und 3-O-Methylglucose Substrate angeboten, die als mögliche Quellen von Methanol im Reaktor vorliegen könnten. Einen ersten Überblick über die Isolate gibt Tabelle 29.

Tabelle 29 Überblick über die Isolate aus der Forschungsbiogasanlage des DBFZ, Leipzig und ihrer Stoffwechselprodukte bei ausgewählten Substraten, die zur Untersuchung der Kohlenstoffflüsse um das Substrat Methanol relevant erschienen.

3-O-MGI = 3-O-Methylglucose; M/DMa = Mono- bzw. Dimethylamin; += Wachstum verzeichnet; *in Kokultur mit hydrogenotrophen methanogenen Archaeen.

Isolat	Nächster Verwandter nach 16S rRNA Genabgleich (NCBI)	Identität	Substrate	Produkte						
				CO ₂	CH ₄	Formiat/H ₂	Methanol	Essigsäure	Buttersäure	Laktat
Mbf1	<i>Methanobacterium formicicum</i> MF (DSM1535 ^T)	100 %	H ₂ / CO ₂		+					
			Formiat	+	+					
Msc1	<i>Methanosarcina mazei</i> S-6 (DSM2053 ^T)	100 %	Methanol	+	+					
			H ₂ / CO ₂		+					
			Acetat	+	+					
			M/DMa	+	+					
ButMet1	<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> Stamm Marburg (DSM3468 ^T)	100 %	Methanol	+				+	+	
			H ₂ / CO ₂	+				+		
			Formiat	+				+		
			Glucose	+				+	+	
DesRum1	<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DL (DSM2154)	100 %	Methanol					+		
			H ₂ / CO ₂					(+)		
			Acetat	+						
			Formiat					+		
			Laktat	+				+		
			Pektin	+				+		
TepAc1	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> Re1 ^T (DSM21804) oder T1	99 %	Methanol	+				+		
			H ₂ / CO ₂					+		
			Acetat	+*		+*				
			Pektin	+				+		
			3-O-MGI	+				+		
			Glucose	+				+		
			Cystein	+				+		
StrepBov1	<i>Streptococcus bovis</i> Gruppe	99 %	Pektin	+			+	+		+
			3-O-MGI	+			+	+		
			Glucose	+				+		+

3.1.1 Hydrogenotroph: Isolat *Methanobacterium formicicum* Mbf1

Mit *Methanobacterium formicicum* Mbf1 konnte ein obligat hydrogenotrophes, methanogenes Archaeon isoliert werden, indem zur Isolierung Formiat als singuläre C-Quelle angeboten wurde. Die Identifizierung erfolgte über eine beidseitige Sequenzierung der 16S rRNA Gensequenz mit den Primern Met86f und Ar1530r (Tabelle 14), sodass eine 1444 bp Sequenz rekonstruiert und mit der Genbank des NCBI verglichen werden konnte. Dies ergab eine 100 % Sequenzidentität mit *Methanobacterium formicicum* Stamm MF (DSM1535^T). Die höchsten Wachstumsraten konnten bei 39 °C und 180 rpm unter 2 bar H₂ / CO₂-Gasatmosphäre verzeichnet werden, sodass nach 2 - 3 Tagen bereits dichte Kulturen erreicht werden konnten. Je nach Wachstumsphase der stäbchenförmigen, etwa 5 - 8 µm langen Kulturen konnte eine Formation von Ketten beobachtet werden (Abbildung 10). Eine Kultivierung war auf den C-Quellen H₂ / CO₂ und Formiat möglich. Acetat konnte als alleiniges Substrat nicht verwertet werden, begünstigte jedoch das Wachstum auf den zuvor genannten C-Quellen.

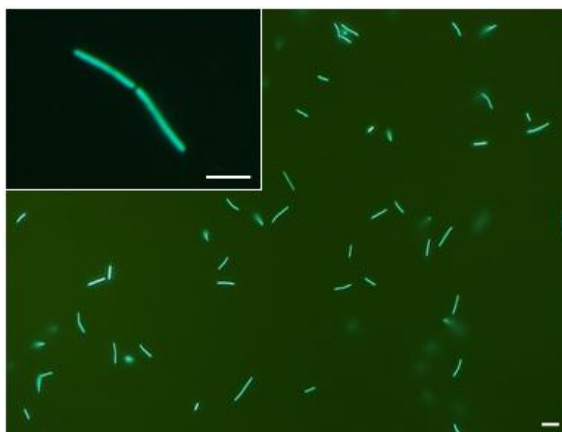


Abbildung 10 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Isolates *Methanobacterium formicicum* Mbf1. Oben links ist ein sich teilendes Stäbchen dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm.

3.1.2 Mixotroph: Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1

Durch das Angebot von Methanol als selektiver C-Quelle konnte das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 aus der Reaktorprobe isoliert werden. Die DNA-Isolierung und Amplifizierung eines 1444 bp langen Fragments des 16S rRNA Gens ergab bei der Sequenzierung eine 100 % Sequenzübereinstimmung zu *Methanosarcina mazei* Stamm S-6 (DSM2053^T). Die etwa 3 - 8 µm großen, unregelmäßigen Kokken traten zu allen Wachstumsphasen in bis zu 2 mm umfassenden, mehrdimensionalen Zellaggregaten auf, die bereits mit dem Auge zu erkennen waren (Abbildung 11). Ein Wachstum konnte auf den Substraten H₂ / CO₂, Acetat, Mono- bzw. Dimethylamin sowie mit Methanol erzielt werden (Tabelle 29), wobei die höchsten Zelldichten bei methylo-trophen Wachstum festzustellen waren. Hier konnte bereits nach zwei Tagen eine dicht bewachsene Kultur erhalten werden. Die Zugabe von Hefeextrakt steigerte die Wachstumsrate darüber hinaus deutlich, erhöhte jedoch auch die Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen.

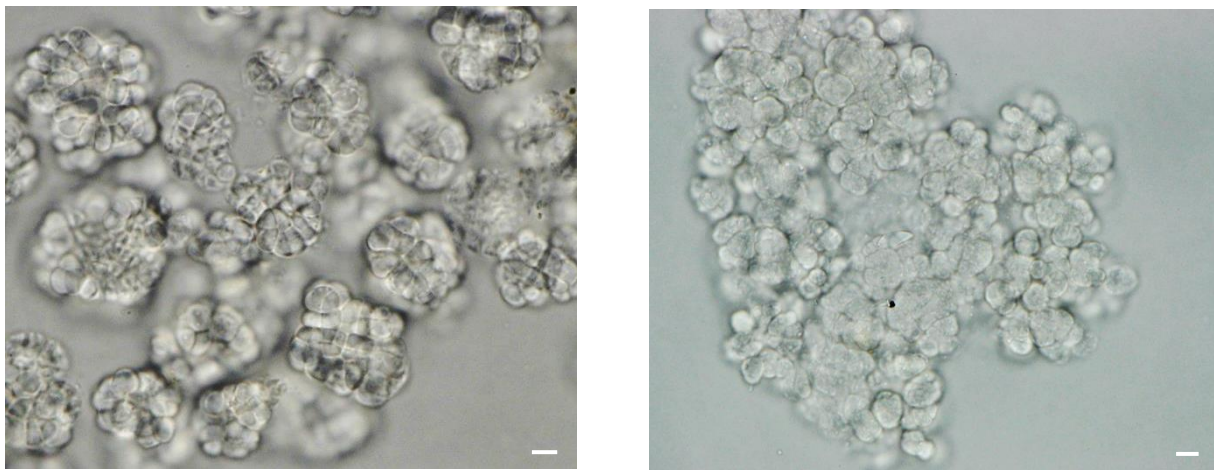


Abbildung 11 Hellfeldmikroskopische Aufnahmen des Isolates *Methanosarcina mazei* Msc1. Es ist eine deutliche Bildung von Zellpaketen zu sehen, die sich aus bis zu mehreren hundert Einzelzellen zusammensetzen können. Der Maßstab in den Bildern entspricht jeweils 5 μm .

3.1.3 Methyltroph und homoacetogen: Isolat *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1

Indem methanogenes Wachstum durch die Zugabe von 50 mM BES zur Isolierung methylotropher Bakterien unterbunden wurde, konnte nach rund acht Wochen selektiven Angebots von Methanol eine Reinkultur des Isolates *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 erhalten werden. Ein NCBI Gendatenbank-Sequenzabgleich eines 1536 bp langen Amplifikates der 16S rDNA Gensequenz ergab eine 100 % Übereinstimmung mit *Butyribacterium methylotrophicum* Stamm Marburg (DSM3468). Die Morphologie des etwa 2 - 3 μm langen, Gram-positiven Bakteriums erscheint unter dem Mikroskop höchst variabel. So sind einzelne als auch mehrere übereinander gelagerte, verzweigte oder verbundene Stäbchen in unterschiedlich gebogener oder rundlicher Form zu identifizieren. Zellwachstum konnte auf den Substraten Glucose, Methanol, Formiat sowie H_2 / CO_2 festgestellt werden, wobei die Zugabe von Acetat das Wachstum zusätzlich begünstigte, jedoch nicht als alleinige Energiequelle verwertet werden konnte. Je nach C-Quelle wurde eine Bildung von CO_2 , Acetat sowie Buttersäure gemessen (Tabelle 29). Im Reaktor nimmt damit das Isolat ButMet1 die Rolle eines Homoacetogenen ein, der die gleichen C1-Substrate wie viele methanogene Archaeen fermentieren kann.

3.1.4 Sulfatreduzierend und acetatoxidierend: Isolat *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1

Ein Gram-negatives, sulfatreduzierendes Bakterium wurde mit *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 durch Angebot von H_2 / CO_2 isoliert. Ein Sequenzabgleich nach einer beidseitigen Sequenzierung eines 1536 bp langen, 16S rRNA Genabschnittes ergab eine 100 % Übereinstimmung mit *Desulfotomaculum ruminis* Stamm DL (DSM2154). Im Mikroskop lassen sich dabei etwa 2 - 4 μm lange, stäbchenförmige Bakterien beobachten, die häufig in längeren Ketten miteinander verbunden sind. In Anwesenheit von Sulfat als Elektronenakzeptor zeigte das Isolat auf Methanol, Formiat sowie auf Laktat eine deutliche Bildung von Acetat. Bei Wachstum mit H_2 / CO_2 konnte nur eine geringe Entstehung von Acetat detektiert werden. Zudem wurde in Anzuchten auf Acetat oder Laktat eine Freisetzung von CO_2 gemessen. Insofern kann das Isolat DesRum1 im Reaktor sowohl zur Bildung von Acetat als auch zu dessen Oxi-

dation beitragen und hat damit ebenfalls ein ähnliches Substratspektrum wie viele methanogenen Archaea in der Biogasanlage.

3.1.5 Syntroph acetatoxidierend: Isolat *Tepidanaerobacter acetat-oxydans* TepAc1

Auf der Suche nach einem syntroph acetatoxidierenden Stamm konnte *Tepidanaerobacter acetat-oxydans* TepAc1 isoliert werden. In der Regel kann die Oxidation von Acetat nur in Kokultur mit einem H_2 zehrenden, methanogenen oder sulfatreduzierendem Organismen erfolgen. Da jedoch der Erhalt einer Reinkultur angestrebt worden war, erfolgte die Isolierung über ein selektives Angebot der C-Quelle Cystein, die bereits als Substrat vieler syntroph acetatoxidierend Spezies beschrieben worden war (Westerholm et al. 2011, 2010; Hattori et al. 2000; Schnurer et al. 1996). Über einen Abgleich eines 1199 bp Fragmentes der 16S rRNA Gensequenz konnte dabei eine 99 % Identität zu *Tepidanaerobacter acetat-oxydans* Stamm Re1^T (DSM21804^T) festgestellt werden. Beide Stämme konnten erstmals 2011 aus einem Laborfermenter isoliert werden (Westerholm et al. 2011). Die Morphologie des Gram-positiven Isolates erscheint stäbchenförmig bei etwa 1 μm Länge. Neben Cystein konnte Wachstum auf den Substraten Methanol, H_2 / CO_2 und Glucose beobachtet werden. Zur Untersuchung der Methanol-Entstehung im Reaktor wurde das Isolat darüber hinaus erfolgreich auf Pektin und 3-O-Methylglucose (Abbildung 8) kultiviert, wobei ein sehr dichtes Wachstum, jedoch keine Bildung von Methanol nachgewiesen werden konnte. Bei allen getesteten Substraten entstand Essigsäure im Nährmedium. Zudem konnte TepAc1 in Kokultur mit *Methanobacterium formicicum* DSM1535^T auf Acetat kultiviert werden, wobei vorwiegend CH_4 , aber auch geringe Konzentrationen an CO_2 in der Gasphase detektiert werden konnten.

3.1.6 Pektinolytischer Methanol-Lieferant: Isolat *Streptococcus bovis* StrepBov1

Zur Untersuchung, wie Methanol in Biogasanlagen entstehen kann, wurde mit dem Stamm StrepBov1 eine Reinkultur isoliert, welche die an die Polygalacturonsäureketten von Pektin veresterten Methoxygruppen abspalten und dadurch Methanol freisetzen kann. Die Isolierung erfolgte unter Angebot der C-Quelle Pektin und einem Anlegen mehrstufiger Verdünnungsreihen. Hierbei konnte sich das Isolat aufgrund einer sehr schnellen Wachstumsrate zunehmend durchsetzen. Ein Abgleich einer 1446 bp langen DNA-Sequenz mit der Gendatenbank des NCBI ergab mehrere Treffer mit 99 % Übereinstimmung zu verschiedenen Stämmen von *Streptococcus bovis*. Die oval bis rundlichen, teilweise in Ketten assoziierten Zellen des Gram-positiven Isolates konnten erfolgreich auf Cellulose, D-Xylose, Arabinose, Glucose, Manose, Galactose, Stärke, Rhamnose sowie Laktose unter Bildung von Laktat, Acetat und CO_2 kultiviert werden. Ferner konnte in Anzuchten auf Pektin bzw. 3-O-Methylglucose die Entstehung von Methanol nachgewiesen werden. Abbildung 12 zeigt dabei die durchschnittliche Freisetzung von Methanol dreier paralleler Anzuchten in Nährmedium mit 5 g / l Pektin. Während in den als Kontrolle mitgeführten, unbeimpften Pektinnährmedien auch nach mehreren Wochen kein Methanol nachzuweisen war, konnte in den Kulturen mit StrepBov1 bereits 30 min nach der Beimpfung rund 0,04 g / l Methanol gemessen werden. Ein deutlicher Anstieg der Methanolkonzentration konnte zwischen 4 - 6 h Kultivie-

rung detektiert werden, wobei im weiteren Zeitverlauf nur noch eine geringfügige Zunahme festzustellen war. Das Isolat war damit offenbar in der Lage, innerhalb von 6 h nahezu alle veresterten Methoxygruppen an den Galacturonsäureketten des Pektins zu lösen und Methanol als Substrat für methylotrophe Spezies bereitzustellen. Die Firma Sigma Aldrich, Steinheim, gibt für das eingesetzte Pektin C (Art. Nr. P9135) einen Massenanteil von 6,7 % Methoxygruppen im Trockengewicht an, sodass bei der eingesetzten Menge von 5 g / l Pektin in den Nährmedien rund 0,335 g / l Methoxygruppen vorliegen. Diese Konzentration stimmt auch weitestgehend mit der gemessenen Menge an Methanol gegen Versuchsende überein und bestätigt die schnelle Freisetzung von Methanol durch das Isolat StrepBov1 auf Pektin.

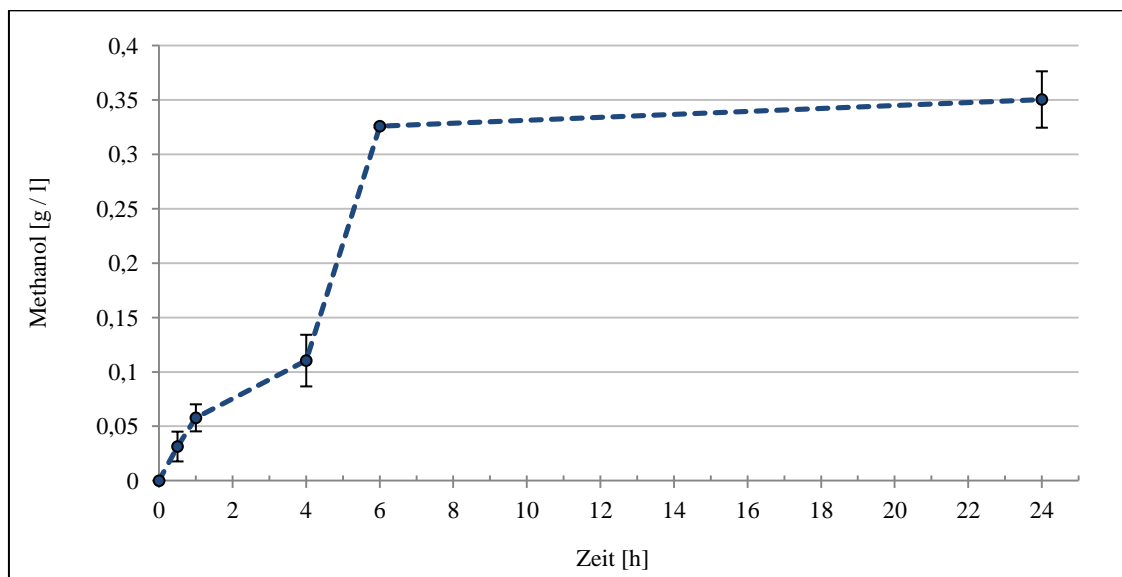


Abbildung 12 Entstehung von Methanol bei der Kultivierung des Isolates StrepBov1 auf Nährmedium DSM 287-mod (Tabelle 9) mit 5 g / l Citrus-Pektin (Veresterungsgrad ca. 70 %) innerhalb von 24 h. Die Probenentnahme für den Zeitpunkt 0 erfolgte direkt nach dem Beimpfen der pektinhaltigen Nährmedien. Die Fehlerbalken indizieren die Schwankungsbreite.

3.2 Nachweis methanogener Stoffwechselwege über Isotopenanalysen

3.2.1 Substratspezifische $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte von Reinkulturen

Für eine erste Interpretation der an der Forschungsbiogasanlage des DBFZ im Biogas gemessenen Isotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)) wurde die Isotopenfraktionierung verschiedener Reinkulturen unter Angebot einer spezifischen C-Quelle untersucht. Dabei sollte ermittelt werden, ob der hydrogenotrophe, acetoklastische sowie methylotrophe Methanogeneseweg anhand der Isotopensignatur im entstehenden CH_4 voneinander unterschieden werden können, sodass der aktuelle Anteil der drei Reaktionspfade im Reaktor über eine Isotopenmessung des Biogases ermittelt werden kann. Tabelle 30 stellt die in einem Zeitraum von 7 - 21 Tage gemessenen, durchschnittlichen $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte verschiedener Reinkulturen bei Anzucht auf einer spezifischen C-Quelle dar.

Tabelle 30 Organismus- und substratspezifisches Isotopenverhältnis im CH_4 , dargestellt als durchschnittliche $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte inkl. Schwankungsbreite verschiedener methanogener Reinkulturen während eines mehr-tägigen Beprobungszeitraumes. Die Anzucht erfolgte in modifizierten DSMZ-Nährmedien (Tabelle 9) mit je einer spezifischen C-Quelle.

Organismus	C-Quelle	Nährmedium	$\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) [‰ _{VPDB}]
<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	H_2 / CO_2	DSM287-mod	-53 ± 5
<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSM3045 ^T	H_2 / CO_2	DSM287-mod	-56 ± 6
<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	Formiat	DSM287-mod	-48 ± 4
<i>Methanosaeta concilii</i> Mst1.3	Acetat	DSM334-mod	-42 ± 1
<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Acetat	DSM334-mod	-42 ± 4
<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol	DSM318-mod	-99 ± 1

Bis auf *Methanoculleus bourgensis* DSM3045^T, welcher ursprünglich aus Klärschlamm isoliert wurde (Ollivier et al. 1986), wurden nur Isolate aus Biogasanlagen untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine je nach eingesetztem Substrat unterschiedliche Isotopensignatur, sodass insgesamt eine Methanogeneseweg-spezifische Isotopenfraktionierung festzustellen war. Insbesondere die Isotopensignatur der methylotrophen Methanogenese von *Methanosarcina mazei* Msc1 war aufgrund der stärksten Fraktionierung mit $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) ≈ -99 ‰ deutlich von den beiden anderen Reaktionswegen zu unterscheiden. Die höchste Anreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ konnte in den Reinkulturansätzen von *Methanosarcina mazei* Msc1 sowie *Methanosaeta concilii* Mst1.3 auf Acetat gemessen werden. Dabei zeigten beide Spezies im Schnitt mit $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) ≈ -42 ‰ die gleichen Isotopensignaturen während der acetoklastischen Methanogenese. Die $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte des hydrogenotrophen Methanogeneseweges aus H_2 / CO_2 wiesen im Versuch hierzu ein um mehr als 10 ‰ stärker fraktioniertes Isotopenverhältnis auf. Ferner unterschied sich die Signatur geringfügig zwischen den beiden Spezies *Methanoculleus bourgensis* und *Methanobacterium formicicum*. Im Vergleich zu H_2 / CO_2 war zudem für die hydrogenotrophe Methanogenese aus Formiat eine etwas geringe Diskriminierung des schwereren Kohlenstoffisotopes im CH_4 zu messen. Es lässt sich

daher zusammenfassen, dass die drei Methanogenesewege grundsätzlich anhand ihrer Isotopensignatur im CH_4 zu unterscheiden sind, wobei $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte im Biogas um 48 - 56 ‰ auf eine hydrogenotrophe, um 42 ‰ auf eine acetoklastische sowie bei etwa -99 ‰ auf eine methylotrophe Methanogenese hinweisen könnten.

3.2.2 Substratspezifische $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte in Batchreaktoren

Vergleichend zu der Betrachtung der $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte einzelner Spezies und C-Quellen wurde zusätzlich die Isotopenfraktionierung der gesamten Fermenter-Mikrobiologie in Batchansätzen betrachtet. Dabei galt es herauszufinden, ob die zuvor bei Reinkulturen festgestellten, Methanogenesewegspezifischen Isotopenverhältnisse auch in selektiven Nährmedien zu messen sind, welche mit zuvor ausgehungerten Reaktorproben beimpft worden waren. Dadurch lagen neben einer Vielzahl methanogener Archaeen auch mit diesen interagierende Bakterien in den Ansätzen vor. Ihr Einfluss auf die Isotopensignatur wurde stellvertretend anhand des Substrates Acetat untersucht, indem in einer parallelen Reihe zusätzlich Antibiotika in die Nährmedien gegeben wurden, um so beispielsweise eine syntrophe Acetatoxidation zu hemmen. Abbildung 13 zeigt hierbei die in einem Zeitraum von einer Woche gemessenen $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte aus mit Reaktorsubstrat beimpften Batchansätzen unter Angebot einer der C-Quellen H_2 / CO_2 , Acetat oder Methanol.

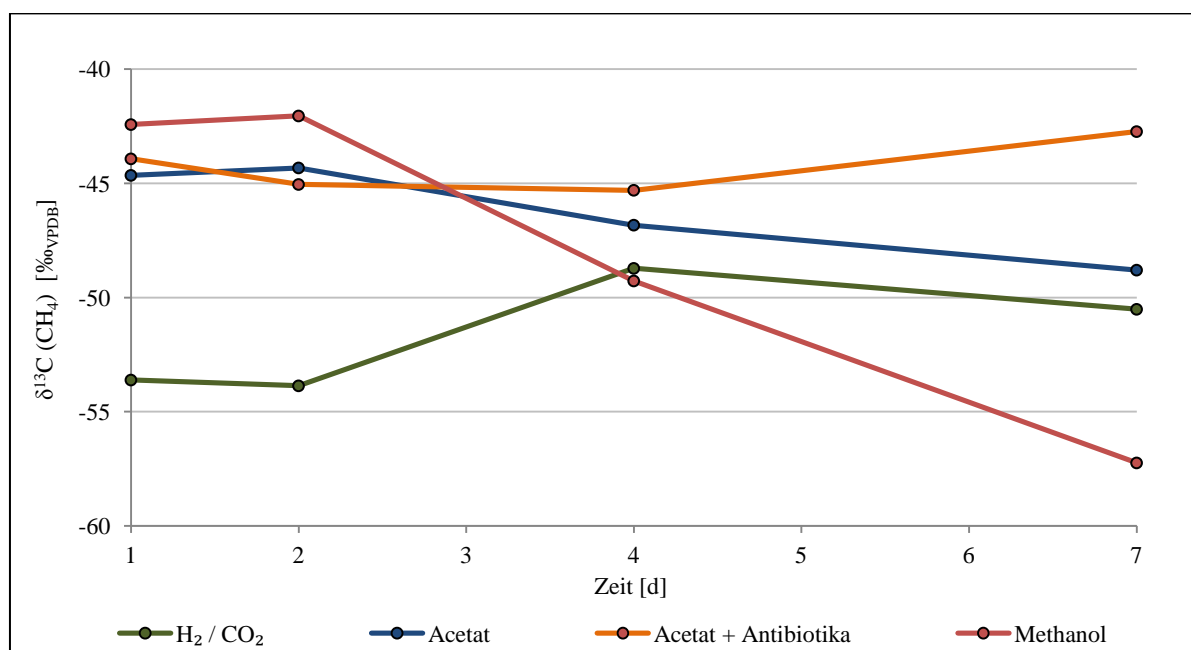


Abbildung 13 Messung substratspezifischer $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte in Batchansätzen mit 5 % Reaktorsubstrat in DSM287-mod Nährmedium (Tabelle 9) mit einer selektiven C-Quelle (Tabelle 18). Repräsentativ für die drei Methanogenesewege (hydrogenotroph, acetoklastisch und methylotroph) wurde je ein Substrat (H_2 / CO_2 , Acetat oder Methanol) angeboten und das Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ im Biogas bestimmt.

Es zeigte sich, dass je nach verfügbarem Substrat deutliche Variationen in der CH_4 -Isotopensignatur der der Batchansätzen auftraten. Dabei ähnelte zunächst der $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Wert von -54 ‰ in den Ansätzen mit H_2 / CO_2 den zuvor bei den Spezies *Methanoculleus bourgensis* DSM3045^T und *Methanobacterium*

formicum Mbf1 (Tabelle 30) ermittelten Isotopenverhältnissen. Im weiteren Verlauf (Tag 4) war im CH₄ der Reaktoransätze eine zunehmende Anreicherung von ¹³C zu detektieren, während die Isotopensignatur der hydrogenotrophen Reinkulturen durchgehend konstante δ¹³C (CH₄)-Werte gezeigt hatten. Wurde Acetat als singuläre C-Quelle angeboten, war zu Beginn kaum ein isotopischer Unterschied zu den parallelen Ansätzen mit Antibiotika zu identifizieren. So waren mit δ¹³C (CH₄)-Werten bei -44 ‰ zunächst nur minimal abgereichertere Isotopenverhältnisse wie in der ebenfalls auf Acetat kultivierten Reinkultur von *Methanosaeta concilii* Mst1.3 zu messen (Tabelle 30). Dabei war der Einfluss der Antibiotika auf den mikrobiellen Abbau von Acetat erst ab Tag 4 in der Isotopie festzustellen. Ab diesem Zeitpunkt ist in diesen Ansätzen ein deutlicher Trend der δ¹³C (CH₄)-Werte in Richtung der Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese zu beobachten, sodass an Tag 7 über 6 ‰ abgereichertere δ¹³C (CH₄)-Werte als in den Parallelen ohne Antibiotika zu messen waren.

Im Gegensatz zu den δ¹³C (CH₄)-Werten um -99 ‰, welche für das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 bei Angebot von Methanol zu messen waren (Tabelle 30), zeigte die Isotopensignatur der Reaktorreicherungen mit selbiger C-Quelle δ¹³C (CH₄)-Werte um -42 ‰ während der ersten beiden Messtage. Diese entsprachen damit vielmehr der Isotopensignatur des acetoklastischen Isolates *Methanosaeta concilii* Mst1.3 (Tabelle 30). Ab Tag 4 kam es hingegen in den Ansätzen mit Methanol zu einer deutlichen Abreicherung des schweren C-Isotopes im CH₄, sodass zu Versuchsende ein δ¹³C (CH₄)-Wert von rund -57 ‰ nachzuweisen war.

3.2.3 Fütterungsbedingte Isotopenfraktionierung im DBFZ Forschungsfermenter

Mit einem an der Gasleitung des 207 m³ Forschungsreaktors installierten Laser Absorptionsspektrometer wurden über einen mehrmonatigen Zeitraum die Isotopenverhältnisse δ¹³C (CH₄) im Biogas aufgezeichnet. Bei einem Messintervall von 20 s war es dadurch möglich, selbst kurzzeitige Schwankungen der δ¹³C (CH₄)-Werte, die insbesondere nach Fütterungsintervallen auftraten, zu detektieren. Um den Einfluss der Raumbelastung auf die Mikrobiologie und die Isotopie des Biogases zu untersuchen, wurden während des Versuchszeitraumes verschiedene Fütterungsszenarien getestet, wobei Raumbelastungen zwischen 0,4 - 13,5 kg_{oTS} / (m³ × d) erreicht wurden. Abbildung 14 zeigt die mittleren δ¹³C (CH₄)-Werte pro Tag in einem 90-tägigen Zeitraum bei unterschiedlicher Substratzufuhr. Zusätzlich ist in stündlichem Intervall das mittlere Isotopenverhältnis während der ersten drei Versuchstage (Tag 0 - 2) aufgeführt (Abbildung 15).

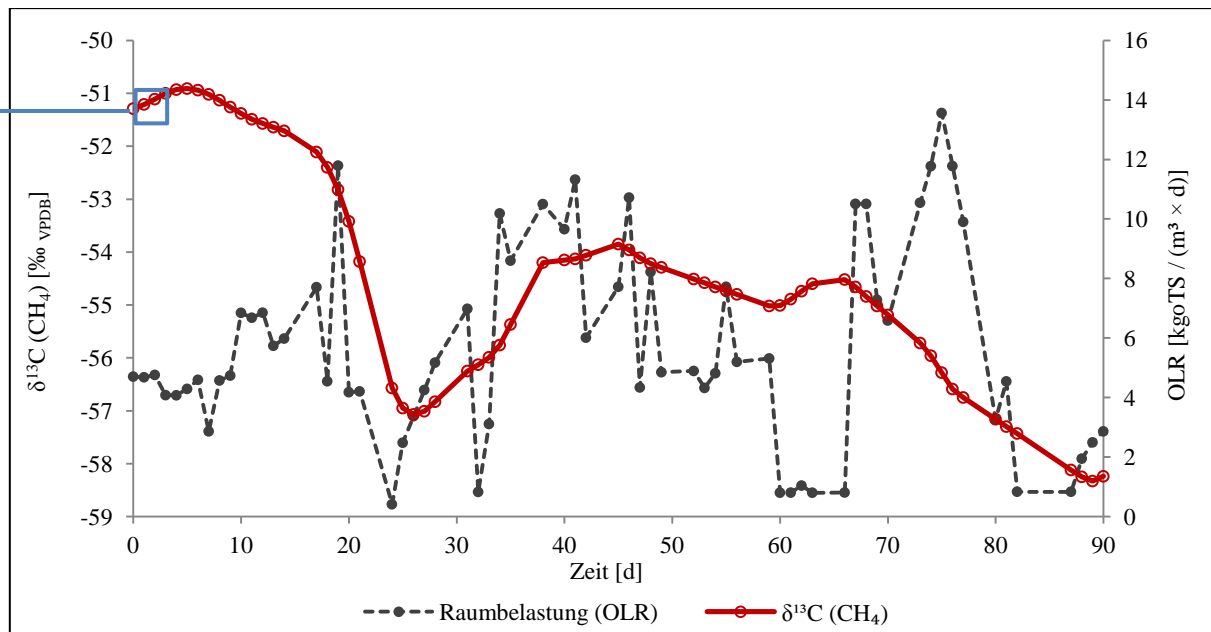


Abbildung 14 Online Isotopenmessung im Biogas an der Forschungsbiogasanlage des DBFZ unter variierenden Raumbelastungen (OLR). Dargestellt sind die mittleren $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte in ‰ pro Tag.

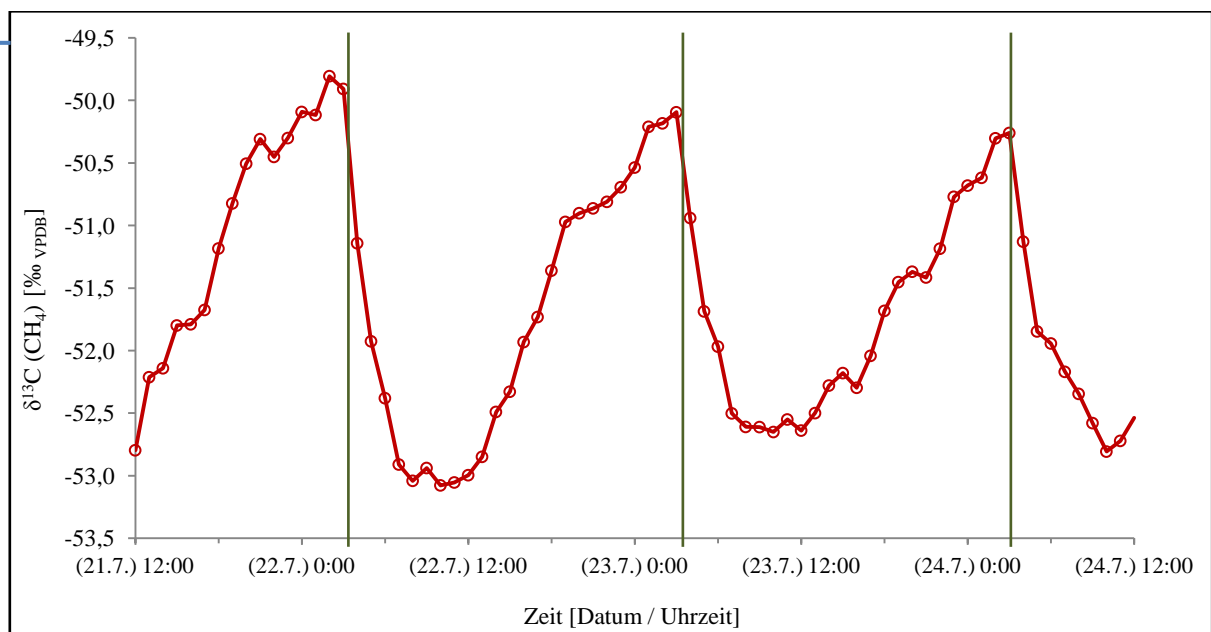


Abbildung 15 Mittlere $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte in ‰ pro Tag pro Stunde in einem Zeitraum von 72 h im Biogas des Forschungsreaktors. Grün markiert sind die Zeitpunkte der Substrateinbringung in den Fermenter.

Die tagesdurchschnittlichen $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte im Biogas des Forschungsreaktors bewegten sich im Untersuchungszeitraum zwischen $-51,0$ und $-58,5$ ‰ und zeigten dabei eine hohe Dynamik (Abbildung 14). Diese scheint in einem Zusammenhang mit der aktuellen Raumbelastung zu stehen, da abgereicherte $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -Werte sowohl bei einem sehr hohem, ($\text{OLR} > 10 \text{ kg}_{\text{oTS}} / (\text{m}^3 \times \text{d})$) als auch bei einem verminderten Substratinput ($\text{OLR} < 3 \text{ kg}_{\text{oTS}} / (\text{m}^3 \times \text{d})$) auftraten. Dies ist insbesondere während der beiden „Hungerperioden“ zwischen Tag 18 und 25 sowie ab Tag 80, wie auch während der Stoßbelastung zwischen Tag 73 und 76 bei bis zu $14 \text{ kg}_{\text{oTS}} / (\text{m}^3 \times \text{d})$ Substratzufuhr, zu sehen. Die stärkste Anreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ ist hingegen während der ersten beiden Analysewochen zu beobachten, wobei

bei einer Raumbelastung zwischen 4,7 - 6,8 kg_{oTS} / (m³ × d) $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte bis -51,0 ‰ gemessen wurden. Auch in der stündlichen Auflösung der Isotopensignatur während der ersten drei Versuchstage (Abbildung 15) ist eine hohe Varianz im Isotopenverhältnis von CH₄ zu beobachten. Dabei konnten $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte zwischen -49,8 und -53,0 ‰ detektiert werden, welche offenbar in einem signifikanten Zusammenhang mit der Substrateinbringung standen. So konnte nach jeder Fütterung, die täglich gegen 02:00 h nachts erfolgte, ein deutlicher Rückgang an ¹³CH₄ verzeichnet werden, wobei sich die $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte im Schnitt innerhalb von vier Stunden von -50 auf -53 ‰ verschoben haben. Anschließend kam es zwischen 08:00 – 13:00 h zu nahezu keiner Veränderung im Isotopenverhältnis. Erst im weiteren Tagesverlauf konnte wieder eine fortschreitende Anreicherung von ¹³CH₄ im Biogas nachgewiesen werden, welche bis zum nächsten Fütterungsereignis zunahm.

3.3 Untersuchung neuartiger Stoffflüsse von C und H₂

3.3.1 Acetat: Methanogene Reduktion der Carboxylgruppe von Acetat

Während der acetoklastischen Methanogenese entstehen in gleichen Anteilen CH₄ und CO₂. Aufgrund der Tatsache, dass die während der online Analyse ermittelten Isotopenverhältnisse im Bioreaktor (Abbildung 14 und Abbildung 15) durchweg eher im Bereich der Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese auftraten (Tabelle 30), wurden die Kohlenstoffflüsse der acetoklastischen Methanogenese noch einmal näher untersucht. Durch die Verfügbarkeit von H₂ in Biogasanlagen wurde vermutet, dass das freiwerdende CO₂ über eine anschließende hydrogenotrophe Methanogenese zusätzlich genutzt werden könnte. Neben einer erhöhten Ausbeute an CH₄ pro Molekül Acetat würde dies in Hinblick auf das online Isotopenmonitoring zu einer Mischsignatur aus der isotopisch stärker fraktionierenden hydrogenotrophen, sowie der das Isotop ¹³C weniger diskriminierenden, acetoklastischen Methanogenese führen. Infolge dessen würden abgereichertere $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte im Biogas gemessen werden. Um dies zu untersuchen, wurden zwei Experimente mit Rein- und Mischkulturen bei Angebot von ¹⁻¹³C Acetat und H₂ durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt die $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte für CH₄ sowie CO₂ in Reinkulturanzuchten von *Methanosarcina mazei* Msc1 in mit ¹⁻¹³C Acetat markiertem Nährmedium DSM334-mod (Tabelle 9). Während in den Kontrollansätzen 1 bar N₂ als Gasphase angeboten wurde (rote Graphen), lag in den Parallelen ein Gemisch aus 50% H₂ und 50 % N₂ vor (blaue Graphen).

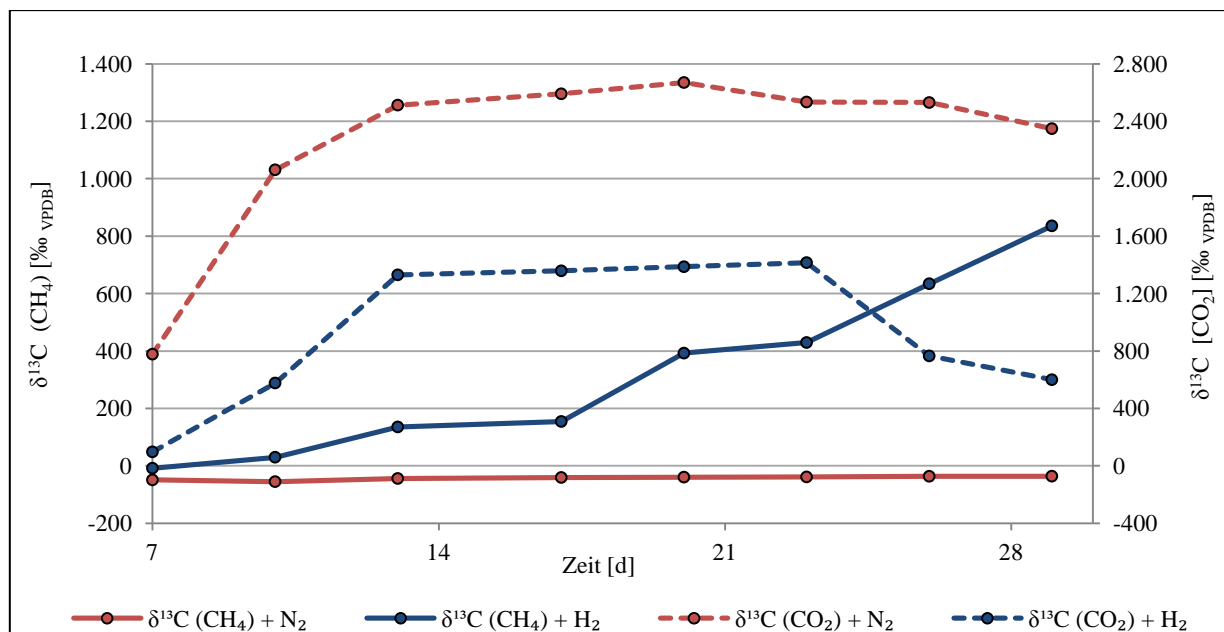


Abbildung 16 Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 reduziert die während der acetoklastischen Methanogenese freiwerdende Carboxylgruppe in Gegenwart von H_2 zu CH_4 . Im Versuch wurde Msc1 in acetathaltigen Nährmedium DSM334-mod (Tabelle 9) mit 5 % $\text{CH}_3^{13}\text{COO}^-$ (^{13}C Acetat) unter N_2 (rot) bzw. H_2 (blau) Gasatmosphäre kultiviert, um den Verbleib der Acetat-Carboxylgruppe anhand der Isotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}$ im entstehenden Biogas (CH_4 und CO_2) zu untersuchen.

Aufgrund der Zugabe von Acetat mit ^{13}C markierter Carboxylgruppe zeigten alle Ansätze eine hohe Anreicherung von $^{13}\text{CO}_2$ in der Gasphase der Kulturgefäße, welche vor allem in den ersten 13 Tagen der Beprobung signifikant zunahm. Dies konnte insbesondere in den Anzuchten unter N_2 -Gasatmosphäre beobachtet werden, wobei $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im CO_2 mit bis zu +2.670 ‰ gemessen wurden. Herrschte H_2 in der Gasphase vor, lagen die ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für CO_2 hingegen deutlich niedriger, wobei an Tag 23 die stärkste Anreicherung mit +1.415 ‰ gemessen werden konnte. Letztere Anzuchten zeigten darüber hinaus eine im Zeitverlauf zunehmende Anreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ in der Gasphase, die gegen Versuchsende $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von bis zu +836 ‰ im CH_4 erzielten. Dabei konnte zunächst eine im Vergleich zu der Konzentration an $^{13}\text{CH}_4$ rund viermal höhere Anreicherung an $^{13}\text{CO}_2$ zwischen Tag 7 und 13 verzeichnet werden. Demnach wäre zunächst die Carboxylgruppe von etwa jedem vierten Molekül Acetat, das während der acetoklastischen Methanogenese umgesetzt worden war, zusätzlich hydrogenotroph zu CH_4 reduziert worden. Während die $\delta^{13}\text{C} (\text{CO}_2)$ -Werte der Ansätze mit H_2 -Gasphase im weiteren Versuchsverlauf zunächst nahezu konstant, dann zunehmend sogar abgereicherter auftraten, nahm die Menge an $^{13}\text{CH}_4$ fortlaufend zu, sodass eine verstärkte hydrogenotrophe Methanogenese aus dem CO_2 von Acetat vermutet werden konnte. Im Gegensatz dazu ließ sich in den Parallelen mit N_2 -Gasatmosphäre keine Isotopenmarkierung aus dem Acetat im CH_4 wiederfinden. Diese zeigten während des gesamten Versuchszeitraumes nahezu gleichbleibende $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für CH_4 um etwa -42 ‰, sodass eine darauffolgende, hydrogenotrophe Methanbildung ausgeschlossen werden kann.

Ob diese Reaktion auch zwischen verschiedenen methanogenen Spezies erfolgen kann, wurde zusätzlich in Mischkulturansätzen aus dem obligat acetoklastischen Isolat *Methanosaeta concilii* Mst1.3 und

einem hydrogenotrophen Archaeon *Methanobacterium formicicum* Mbf1 bzw. *Methanoculleus bourgensis* DSM3045^T untersucht. Um zunächst eine Anreicherung des deutlich langsamer wachsenden *Methanosaeta concilii* Isolates und damit eine Bildung von CO₂ in den Ansätzen zu ermöglichen, erfolgte die Zugabe der hydrogenotrophen Spezies erst ab Tag 29. Zu diesem Zeitpunkt konnte bereits eine deutliche Anreicherung von ¹³CO₂ in den Kulturgefäßen gemessen werden, wobei δ¹³C (CO₂)-Werte von bis zu +2.011 ‰ gemessen werden konnten (Abbildung 17).

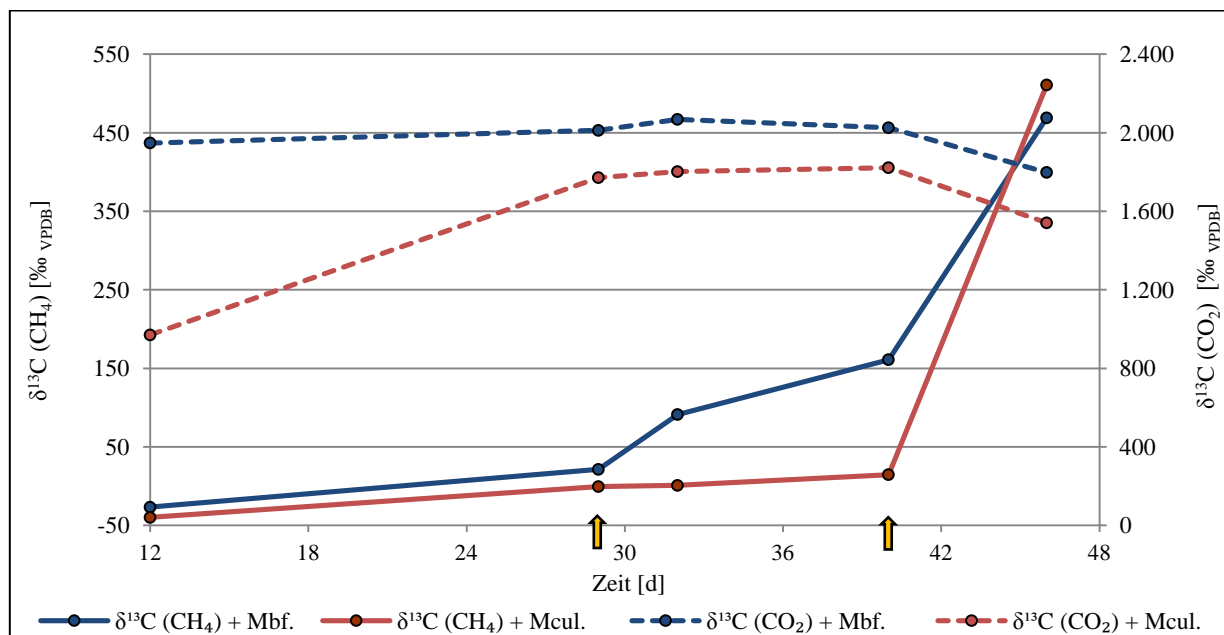


Abbildung 17 δ¹³C (CO₂) und δ¹³C (CO₂) von Mischkulturen mit dem acetoklastischen Isolat *Methanosaeta concilii* und den hydrogenotrophen Stämmen *Methanobacterium formicicum* Mbf1 (Mbf.) bzw. *Methanoculleus bourgensis* DSM3045^T (Mcul.) unter Angebot von Acetat (5% CH₃¹³COO⁻) und einer Gasatmosphäre von 50% H₂ und 50% N₂.

Bis Tag 29 wurde *Methanosaeta concilii* alleine kultiviert. An Tag 29 und Tag 40, im Diagramm mit Pfeilen markiert, wurden hydrogenotrophen methanogenen Spezies zu 5% Inokulum hinzugegeben.

Mit der Zugabe der hydrogenotrophen Archaeen kam es nur noch zu einem geringfügigen Anstieg der δ¹³C (CO₂)-Werte. Dabei konnte in den Kokulturen mit *Methanobacterium formicicum* Mbf1 bereits eine Zunahme an ¹³CH₄ nachgewiesen werden. Aufgrund des zunächst schlechten Wachstums von *Methanoculleus bourgensis* DSM3045^T in den Mischkulturansätzen wurden beide hydrogenotrophen Spezies an Tag 40 erneut zu *Methanosaeta concilii* Mst1.3 beimpft. Kurz darauf konnte ein signifikanter Anstieg der δ¹³C (CH₄)-Werte auf rund +500 ‰ in beiden Mischkulturansätzen nachgewiesen werden, wohingegen zeitgleich die Konzentration an ¹³CO₂ deutlich zurückging.

Infolgedessen erscheint eine an die acetoklastische Methanogenese gekoppelte hydrogenotrophe Methanogenese über einen passiven CO₂-Transfer von strikt acetoklastischen an hydrogenotrophen Archaea höchst wahrscheinlich, sodass je nach H₂-Partialdruck höhere Methanausbeuten pro Molekül Acetat erwartet werden können. In der Folge werden dadurch abgereichertere δ¹³C (CH₄)-Werte in der FBGA gemessen, welche näher an der Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese liegen.

3.3.2 Formiat: Einfluss von H₂ auf die Stöchiometrie des Formiatabbaus

Der Einfluss von H₂ auf die Stöchiometrie methanogener Reaktionspfade wurde zusätzlich auch an der hydrogenotrophen Methanogenese ausgehend von Formiat untersucht. Diese erfordert ohne externen H₂ vergleichsweise hohe Mengen an Substrat für die Bildung eines CH₄-Moleküls bei gleichzeitiger Freisetzung der dreifachen Menge an CO₂. Externes H₂, das nicht aus dem Formiat selbst stammt, könnte die Stöchiometrie daher zugunsten einer höheren CH₄-Ausbeute pro Molekül Formiat verschieben. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde zunächst über Reinkultur-Experimente mit *Methanobacterium formicicum* Mbf1 untersucht, ob das Isolat H₂ nur aus Formiat selbst, oder auch aus der Gas- sowie Flüssigphase entnehmen und dadurch die Carboxylgruppe des Formiat reduzieren kann. Hierfür wurde ²H-Formiat, doppelt deuterierte Ameisensäure, eine ²H₂ Gasatmosphäre oder ²H₂O in den Anzuchten eingesetzt, sodass der Fluss von H⁺ und e⁻ zu CH₄ anhand der Isotopensignatur im Biogas analysiert werden konnte (Tabelle 31).

Tabelle 31 δ²H (CH₄)-Werte in ‰_{VSMOW} paralleler Kulturen von *Methanobacterium formicicum* Mbf1 unter Angebot von 6,8 g/l Formiat (in DSM287-mod, Tabelle 9) als selektiver C-Quelle und Zugabe deuterierter Verbindungen zur Untersuchung der Herkunft des H₂ in CH₄ während der hydrogenotrophen Methanogenese mit Formiat.

² H-Markierung	-/- (Kontrolle)	² HCOONa	² HCOO ² H	² H ₂	² H ₂ O
δ ² H (CH ₄) [‰ _{VSMOW}]	-530	-317	+99	+2.024	+25.641

Die Isotopenverhältnisse im CH₄ (Tabelle 31) bestätigten die Vermutung, dass H₂ während der Methanogenese aus Formiat sowohl aus diesem selbst, als auch von externen Quellen wie der Gas- und Flüssigphase auf die Carboxylgruppe von Formiat übertragen werden kann. In der Kontrolle wurde kein isotopisch markiertes Formiat eingesetzt, weshalb in diesen Ansätzen die stärkste Fraktionierung gemessen werden konnte. Durch eine Deuterierung des Formiat konnte dabei aufgrund stärker angereicherter δ²H (CH₄)-Werte nachgewiesen werden, dass der H₂, der auf das CO₂ übertragen wird, aus dem Formiat selbst stammt. Dies erfolgte insbesondere auch, wenn Formiat in der protonierten Form (Ameisensäure) vorlag, wobei aufgrund der Doppelmarkierung nochmals höhere δ²H (CH₄)-Werte gemessen werden konnten. Ist externes H₂ verfügbar, wie durch die Zugabe von ²H₂ nachgestellt, ist ebenfalls eine Reduktion des durch die Aktivität der Formiat Dehydrogenase entstehenden CO₂ isotopisch nachweisbar. Dabei scheint das Isolat externen H₂ zu großen Teilen für die Reduktion des CO₂ nutzen zu können, da in den Kulturansätzen stark angereicherte δ²H-Werte von über +2.000 ‰ im CH₄ vorzufinden war. Dasselbe scheint für H₂ gelten, das aus der Flüssigphase stammen. Die extrem hohen δ²H-Werte bei Einsatz von deuteriertem Wasser sprechen zwar für eine deutliche Übermarkierung der Nährmedien, lassen aber dennoch eine mögliche methanogene Nutzung von H⁺ und e⁻ aus dem Wasser während der Methanogenese aus Formiat vermuten. Die Isotopenverhältnisse bei ²H₂- sowie ²H₂O-Markierung müssen jedoch mit viel Bedacht betrachtet werden, steht doch die Flüssig- und Gasphase temperatur- und pufferbedingt permanent in einem Austausch mit H₂. Insofern lässt sich zunächst zusammenfassen, dass

H^+ und e^- offenbar sowohl aus Formiat selbst, als auch von externen Quellen auf CO_2 übertragen werden können.

Um nun nachzuweisen, dass *Methanobacterium formicicum* Mbf1 durch Angebot von externem H_2 das entstehende CO_2 aus der Methanogenese mit Formiat reduzieren kann, wurde das Isolat auf ^{13}C markiertem Formiat bei einer H_2 - bzw. N_2 -Gasatmosphäre kultiviert. Dabei wurden nach 14 Tagen die Isotopenverhältnisse von $^{13}CH_4$ und $^{13}CO_2$ in der Gasphase der Kulturgefäße gemessen (Abbildung 18).

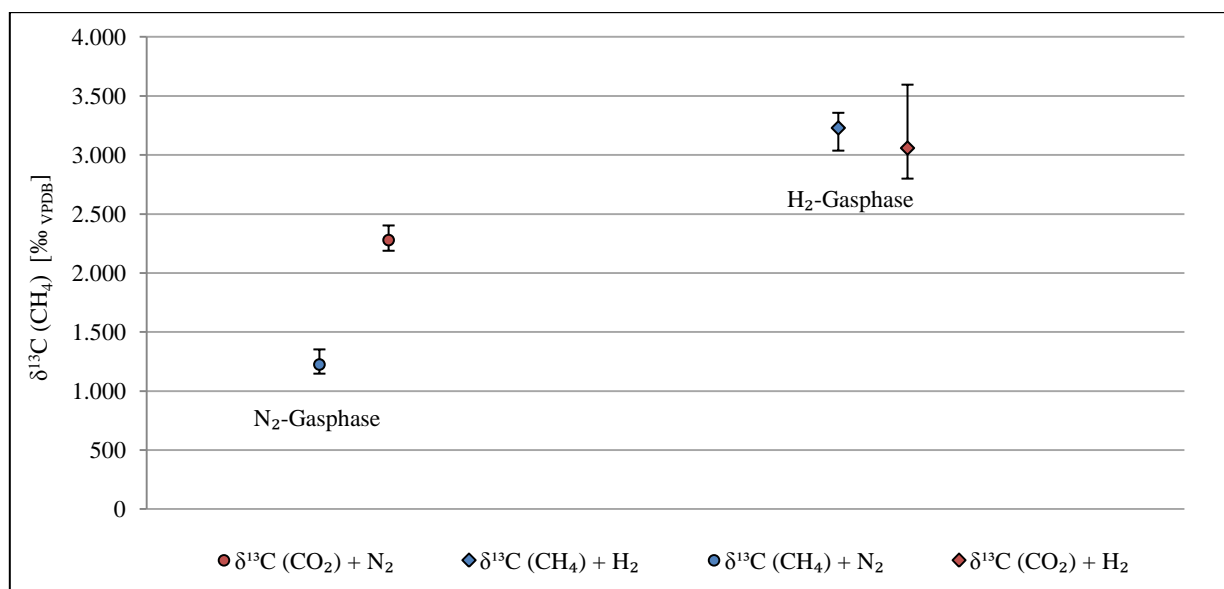


Abbildung 18 Einfluss der Gasphase (N_2 bzw. H_2) auf die $\delta^{13}C$ -Werte von CH_4 und CO_2 paralleler Kulturen des Isolats *Methanobacterium formicicum* Mbf1 in Nährmedium (DSM287-mod, Tabelle 9) mit 6,8 g / l Formiat (5 % ^{13}C).

Anhand einer GC-C-IRMS Analyse (0) konnten in der Anzucht bei N_2 -Gasatmosphäre nahezu doppelt so viele ^{13}C -Isotope im CO_2 als im CH_4 gemessen werden. Dabei zeigten sich bei dieser Gasphase die mittleren $\delta^{13}C$ -Werte von CH_4 und CO_2 bei +1.225 ‰ bzw. +2.279 ‰ deutlich diskriminierter als in den Parallelen mit H_2 -Atmosphäre, in denen signifikant angereichertere $\delta^{13}C$ -Werte um +3.000 ‰ im CH_4 und CO_2 detektiert werden konnten. Obgleich beachtet werden muss, dass ein Teil des bei der methanogenen Formiatsspaltung entstandenen CO_2 in den Puffer übergegangen sein könnte, lassen die Ergebnisse einen signifikanten Einfluss von externem H_2 auf die Stöchiometrie der Methanogenese aus Formiat vermuten:



3.3.3 Methanol: Freisetzung und Abbau von Methanol im Fermenter

Neben der hydrogenotrophen und der acetoklastischen Methanogenese findet die methylotrophe Methanbildung in Biogasanlagen bislang wenig Beachtung, da Methanol im Gegensatz zu Essigsäure, H_2 und CO_2 im Reaktor kaum nachweisbar erscheint. Ob dieser methanogene Stoffwechselweg dennoch in Biogasanlagen Relevanz hat und inwieweit zusätzlich bakterielle Spezies beim Abbau von Methanol beteiligt sind, wurde über verschiedene Versuche mit Rein- und Mischkulturen sowie Isotopenexperimente untersucht.

Anhand des Isolates *Streptococcus bovis* StrepBov1 (Abbildung 12) konnte bereits nachgewiesen werden, dass Methanol binnen weniger Stunden während des Abbaus von Pektin und O-methylierten Substraten entstehen kann. Damit konnte zunächst grundsätzlich gezeigt werden, dass Methanol bei der Vergärung nachwachsender Rohstoffe im Bioreaktor freigesetzt werden kann. Zur Untersuchung von dessen weiterer Umsetzung zu CH_4 durch die Reaktormikrobiota wurde in einem Batchversuch eine Fermenterprobe in Nährmedium mit ^{13}C markiertem Methanol überimpft, sodass der Umsatz zu CH_4 isotopisch nachvollzogen werden konnte (Abbildung 19).

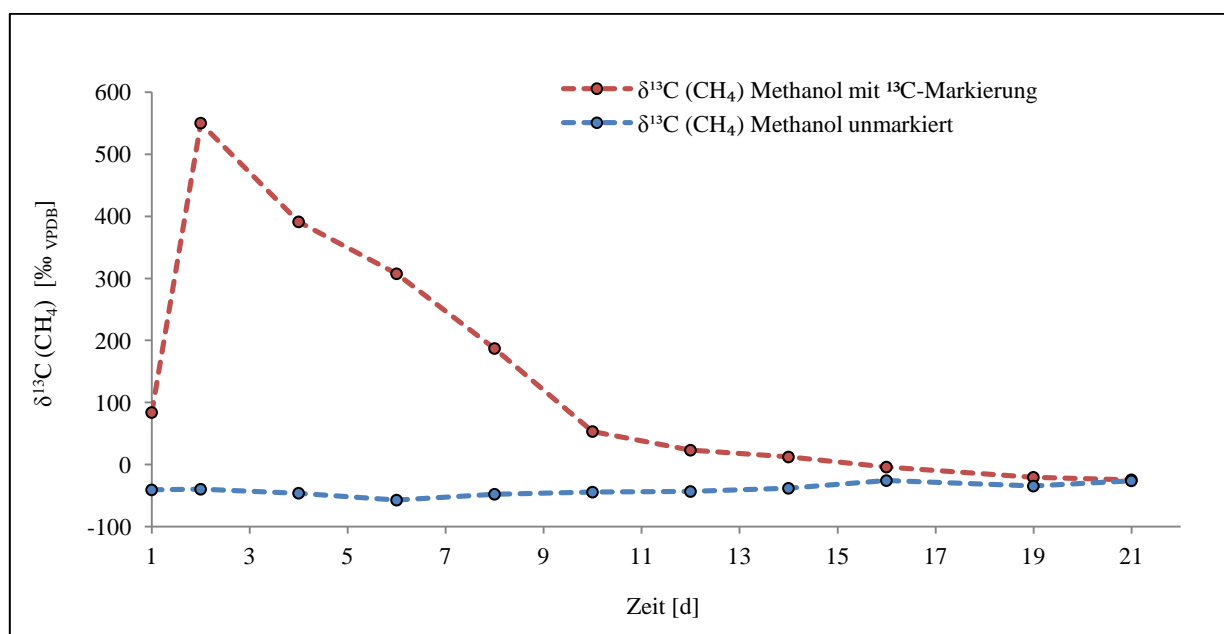


Abbildung 19 Messung von $\delta^{13}C (CH_4)$ im Biogas in mit 5 % (v / v) Reaktorsubstrat beimpften Nährmedien (DSM318-mod, Tabelle 9), in denen Methanol als selektive C-Quelle vorlag. Zur Untersuchung des Kohlenstoffflusses von Methanol zu CH_4 wurde in einem Ansatz 5 % ^{13}C -markiertes Methanol (roter Graph) eingesetzt, die Kontrolle (blauer Graph) ist hingegen ohne ^{13}C Markierung.

Schon ab dem ersten Kultivierungstag konnte der mikrobielle Umsatz von ^{13}C markiertem Methanol zu $^{13}CH_4$ massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Dabei war bereits zwei Tage nach der Beimpfung der methanolhaltigen Nährmedien mit rund +550 ‰ der am stärksten angereicherte $\delta^{13}C (CH_4)$ -Wert des dreiwöchigen Versuchszeitraumes zu messen. Im Kontrollansatz hingegen wurden mit -40 ‰ an den ersten beiden Tagen zunächst konstante $\delta^{13}C (CH_4)$ -Werte identifiziert, welche an Tag 6 mit -57 ‰ die stärkste Diskriminierung des schweren C-Isotopes aufwiesen. In der Folge verlief das Isotopenver-

hältnis, wie auch in der ^{13}C markierten Parallele, in Richtung eines $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Wertes von -26‰ . Bereits an Tag 4 konnte über eine gaschromatographische Analyse der Nährmedien (2.9.2) kein Methanol mehr in sämtlichen Ansätzen detektiert werden. So kann vermutet werden, dass Methanol sehr schnell von der Reaktormikrobiologie umgesetzt werden konnte, wobei große Mengen in CH_4 übergingen. Offen bleibt zunächst, ob Methanol direkt von methylo trophen, methanogenen Archaeen oder zuerst über methylo troph e Bakterien zu weiteren potentiell methanogenen Substraten wie Acetat, Formiat oder CO_2 umgesetzt wurde, welche erst in Folge von den Methanbildnern weiter reduziert worden waren.

Der größte Titer an methylo trophen Archaeen in Biogasanlagen wird bislang der Familie Methanosarcinaceae zugeordnet, wobei eine Vielzahl ihrer Spezies, wie auch das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1, neben der methylo trophen Methanogenese zusätzlich zu einem acetoklastischen oder hydrogenotrophen Stoffwechsel fähig sind. Ob das Isolat auch methylo troph agiert, wenn parallel auch Acetat sowie H_2 / CO_2 verfügbar sind, wurde daher in einem Nährmedium mit drei C-Quellen und ^{13}C markiertem Methanol überprüft (Abbildung 20).

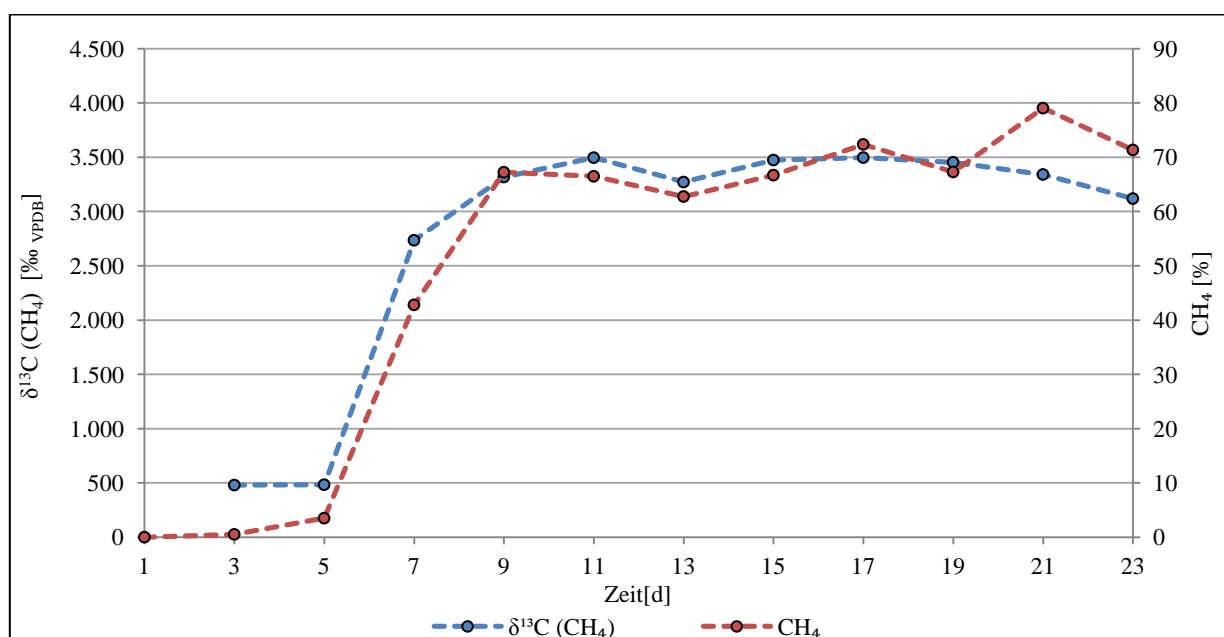


Abbildung 20 Nachweis des methylo trophen Methanogeneseweges von *Methanosarcina mazei* Msc1 bei parallelem Angebot der C-Quellen 2 bar H_2 / CO_2 und je 5 g / l Acetat und Methanol in DSM120-mod (Tabelle 9). Um den Umsatz von Methanol zu CH_4 nachvollziehen zu können, wurden 5 % des Methanols in ^{13}C markierter Form eingesetzt und die $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte (blauer Graph) über drei Wochen hinweg verfolgt. Zusätzlich ist die CH_4 Konzentration (roter Graph) an den Messtagen aufgeführt.

Nach drei Tagen Kultivierung konnte in den Ansätzen eine geringe Konzentration von CH_4 nachgewiesen werden, welches bereits isotopisch mit einem $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Wert von $+480\text{‰}$ angereicht war. Ein signifikanter Anstieg der CH_4 -Konzentration in den Kulturgefäßen konnte erst nach sieben Tage Kultivierung detektiert werden, wobei parallel eine starke Anreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ bei $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werten von bis zu $+3.496\text{‰}$ in der Gasphase gemessen wurde. Ab Tag 9 blieben die Isotopenverhältnisse sowie die CH_4 -Konzentrationen auf konstantem Niveau, wobei erst an den letzten beiden Versuchstagen

eine weitere Veränderung der Messwerte auftrat. Insgesamt konnte ab Beginn einer deutlichen CH₄-Bildung der größte Teil des C aus dem eingesetzten ¹³C-Methanol im CH₄ wiedergefunden werden, sodass trotz der regelmäßigen Begasung auf 2 bar mit H₂ / CO₂ sowie einem Angebot von Acetat in den Nährmedien auf eine signifikante Nutzung des methylo trophen Methanogeneseweges seitens des Isolates *Methanosarcina mazei* Msc1 geschlossen werden kann.

Obleich damit eine hohe Substrataffinität für Methanol seitens methylo tropher methanogener Archaeen gezeigt werden konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit *Butyribacterium methylo trophicum* ButMet1, *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 und *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc1 zusätzliche bakterielle Spezies isoliert, die ebenfalls erfolgreich auf Methanol kultiviert werden konnten. Um eine etwaige Konkurrenz zwischen methylo trophen Bakterien und Archaeen zu untersuchen, wurden Mischkulturen aus den beiden Domänen angelegt und das methanogene Wachstum anhand der Bildung von CH₄ in den Kokulturen untersucht. Darüber hinaus wurde als Kontrolle neben Methanol das methanogene Wachstum in Mischkulturen mit dem Sulfatreduzierer *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 auf den Substraten Acetat sowie H₂ / CO₂ getestet (Tabelle 32).

Tabelle 32 Maximale CH₄-Bildung (%) in Mischkulturen aus bakteriellen und methanogenen Isolaten auf einer spezifischen C-Quelle in „Kokultur“-Medium (Tabelle 21) während eines 28-tägigen Kultivierungszeitraumes. Zur Gasanalyse wurden wöchentlich Proben gezogen. Im als Kontrolle gekennzeichneten Ansatz wurden die methanogenen Isolate ohne eine bakterielle Kokultur angezogen.

Bakterielles Isolat	Methanogenes Isolat	C-Quelle	Max. CH ₄ [%]
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol	15,0
<i>Butyribacterium methylo trophicum</i> ButMet1	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol	5,7
- (Kontrolle)	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Methanol	51,0
<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> TepAc1	<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	Acetat	18,0
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	<i>Methanosarcina mazei</i> Msc1	Acetat	28,4
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DesRum1	<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	H ₂ / CO ₂	39,0
- (Kontrolle)	<i>Methanobacterium formicicum</i> Mbf1	H ₂ / CO ₂	48,4

Die maximal erzielten CH₄-Konzentrationen der Mischkulturansätze auf der C-Quelle Methanol zeigten im Vergleich zur parallel mitgeführten Kontrolle, einer Reinkulturanzucht von *Methanosarcina mazei* Msc1, eine deutlich reduzierte CH₄-Bildung, obgleich alle Nährmedien mit einer einheitlichen Vorkultur des Isolates *Methanosarcina mazei* Msc1 zu gleichem Inokulum überimpft worden waren. Dies war insbesondere in den Mischkulturen aus *Butyribacterium methylo trophicum* ButMet1 und *Methanosarcina mazei* Msc1 zu erkennen, in denen mit maximal 5,7 % CH₄ nur eine schwache Methanogenese nachgewiesen werden konnte. In dieser Kokultur konnte ferner in einer HPLC-Analyse der Stoffwechselpro-

dukte nur Buttersäure detektiert werden, während in der parallelen Reinkulturanzucht des Isolates *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 zusätzlich 0,47 g / l Acetat entstanden waren.

In den Parallelen mit *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 und der C-Quelle Methanol konnte mit bis zu 15 % CH₄ offenbar besseres methanogenes Wachstum erfolgen, obgleich in den Kokulturen mit dem Sulfatreduzierer und einer methanogenen Spezies bei Angebot der C-Quellen Acetat oder H₂ / CO₂ eine nochmals höhere CH₄-Bildung zu messen war. Hier zeigt insbesondere die Kokultur mit dem hydrogenotrophen Isolat *Methanobacterium formicicum* Mbf1 bei Angebot von H₂ / CO₂ eine im Vergleich zur Reinkultur-Kontrolle nur leicht verminderte Gasbildung, sodass nur von einer partiellen Hemmung durch den bakteriellen Partner ausgegangen werden kann. Auch in der Mischkultur aus dem syntroph acetatoxidierenden *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc1 und dem hydrogenotrophen methanogenen Isolat Mbf1 war eine gemeinsame Anzucht auf Acetat möglich, wohingegen ein Wachstum in Reinkultur auf selbiger C-Quelle bei beiden Spezies nicht möglich war.

In Hinblick auf die Freisetzung von Methanol während des Abbaus von Pektin, den dabei nachgewiesenen Stoffwechselprodukten sowie der Charakteristika der bakteriellen und methanogenen Isolate (Tabelle 29) und den Ergebnissen der Isotopenexperimente lässt sich die Entstehung von Methanol in einer NawaRo-Biogasanlage bis hin zur finalen Bildung von CH₄ daher wie folgt vermuten (Abbildung 21).

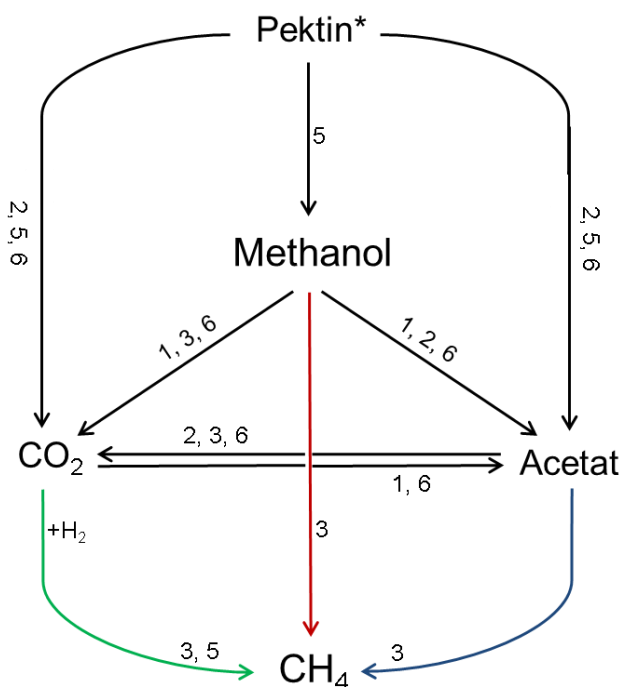


Abbildung 21 Vermutetes Reaktionsschema von der Entstehung bis zum Abbau von Methanol in einer NawaRo-Biogasanlage anhand verschiedener mikrobieller Isolate aus der Forschungsbiogasanlage des DBFZ Leipzig.

1) *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1; 2) *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1; 3) *Methanosarcina mazei* Msc1; 4) *Methanobacterium formicicum* Mbf1; 5) *Streptococcus bovis* StrepBov1; 6) *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc.

Grün = hydrogenotrophe, rot = methylotherpe und blau = acetoklastische Methanogenese.

Abbildung 21 zeigt die für die methanogenen Archaeen relevanten Stoffwechselprodukte um das Substrat Methanol, die während dessen Bildung und Abbau entstehen können. Aufgrund der Interaktion mit methylotrophen Bakterien wird nur ein Teil des Methanols direkt über die methylotrophe Methanogenese zu CH_4 reduziert, während weiteres CH_4 aus den Stoffwechselprodukten Acetat und CO_2 , die während des bakteriellen Abbaus von Methanols entstehen, gebildet werden kann. Darüber hinaus sind homoacetogene Stoffwechselwege seitens *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 und *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc1 sowie eine Acetatoxidation von letzterem Isolat sowie *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 denkbar. Unter Berücksichtigung sämtliche Fermentationsprodukte der methylotrophen Bakterienisolate sowie des pektinolytischen *Streptococcus bovis* StrepBov1 lässt sich das Reaktionsschema noch einmal erweitern, sodass zusätzlich Laktat und Formiat sowie die Entstehung von Buttersäure durch *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 aufgeführt werden kann (Abbildung 22).

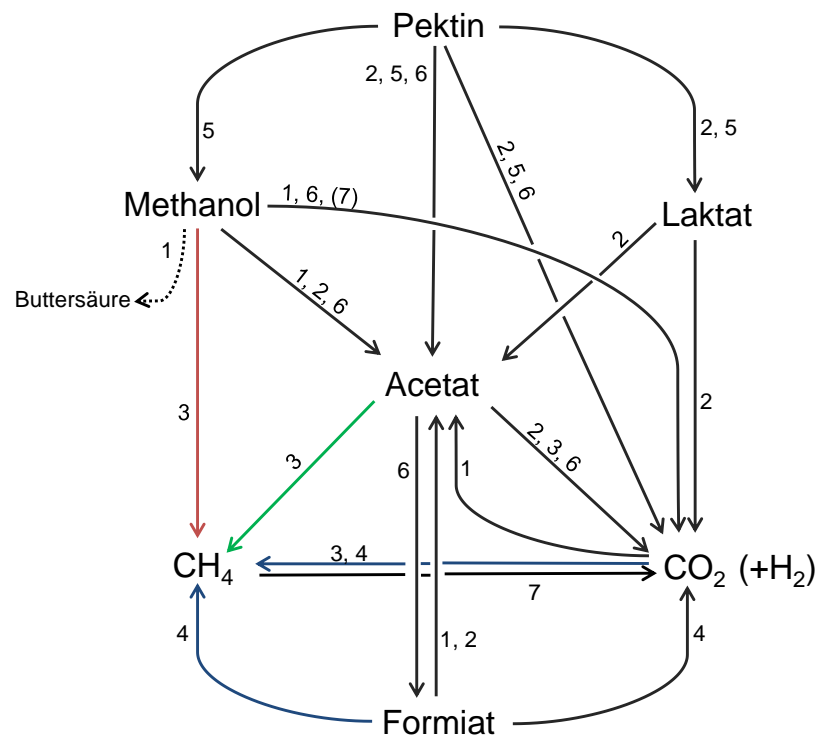


Abbildung 22 Vermutetes, erweitertes Reaktionsschema des mikrobiellen Abbaus von Pektin zu Methanol bis zur Entstehung und Oxidation von CH_4 .

- 1) *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1; 2) *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1; 3) *Methanosarcina mazei* Msc1; 4) *Methanobacterium formicicum* Mbf1; 5) *Streptococcus bovis* StrepBov1; 6) *Tepidanaerobacter acetatoxydans* TepAc1; 7) Methanotrophe Bakterien;
Grün = hydrogenotrophe, rot = methylotrophe und blau = acetoklastische Methanogenese.

Während des mikrobiellen Abbaus von Pektin entstehen dabei neben Methanol auch größere Mengen Laktat und Acetat. Letzteres nimmt im Reaktionsschema (Abbildung 22) eine Schlüsselposition ein, da es, mit Ausnahme für das Isolat *Methanobacterium formicicum* Mbf1, ein Substrat oder Endprodukt sämtlicher aus dem Reaktor isolierter Spezies darstellt. Wie ferner in Kapitel 3.3.4 weitergehend beschrieben wird, können auch zahlreiche methanotrophe Bakterien in Biogasanlagen Methanol oxidieren, weshalb sie in das Schema aufgenommen wurden. Insgesamt konkurrieren die bakteriellen Isolate mit

den methanogenen Archaea demnach um nahezu sämtliche in Biogasanlagen relevanten methanogenen Substrate, sodass indirekt von Methanol ausgehend alle drei Methanogenesereaktionen erfolgen könnten.

3.3.4 Nachweis methanoxidierender Bakterien in Biogasanlagen

Ogleich methanoxidierende Bakterien in Biogasanlagen bislang nicht nachgewiesen wurden, wurde untersucht, ob sich diese Spezies aus einer Fermenterprobe anreichern lassen. Hierfür wurden Nährmedien mit geringen Mengen Reaktorsubstrat beimpft und CH₄ als selektive C-Quelle (80 % CH₄ / 20 % synthetische Luft) angeboten. Nach 14 Tagen bei 39 °C konnte in allen Verdünnungsstufen eine signifikante Abnahme der CH₄-Konzentration auf durchschnittlich 45 % nachgewiesen werden, welche in der Folgezeit noch weiter zurückging. Da sich auch in den weiteren Überimpfungsstufen keine einheitliche Zellmorphologie auszubilden schien, wurde zur weiteren Analyse der potentiell methanotrophen Mikrobiota eine ARDRA durchgeführt. Hierfür wurde die spezifische *pmoA* Gensequenz in der Anreicherung amplifiziert und über eine Klonierung mit anschließendem Picken von 72 Klonen getrennt. Nach einer Kolonie-PCR konnten anhand der charakteristischen Fragmentmuster einer RFLP unterschiedliche Sequenzen identifiziert werden (Abbildung 23).

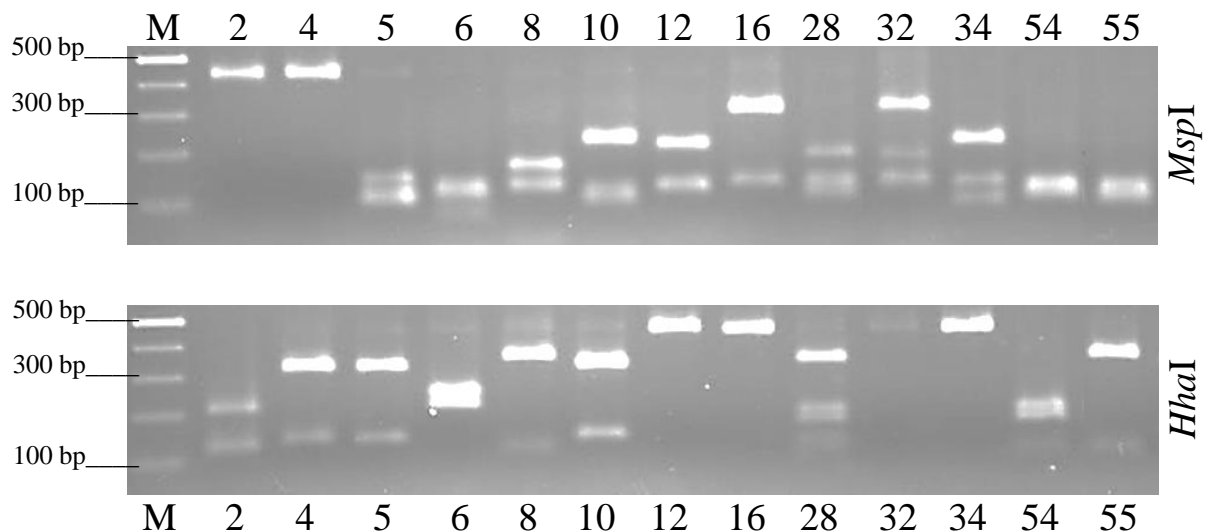


Abbildung 23 Restriktionsschnittmuster der *pmoA* Gensequenzen aus 13 verschiedenen Klonen der ARDRA zur Identifizierung methanotropher Bakterien in der FBGA. Oben: Restriktionsverdau mit *MspI*, unten: Restriktionsverdau mit *HhaI*. Die Zahlen geben die Klonnummer an. M = DNA-Größenstandard (500 bp).

Zur genetischen Identifizierung wurde die amplifizierte *pmoA* Gensequenz aus allen Klonen, die ein neues Schnittmuster aufwiesen, sequenziert. Ein anschließender Gendatenbankabgleich ergab für 6 der 13 sequenzierten Sequenzen eine zu 99 % genetische Übereinstimmung mit einem bereits bekannten Stamm, wohingegen den übrigen 7 Klonen eine nur zu 90 - 96 % passende Sequenzidentität mit einer nächstverwandten Spezies zugeordnet werden konnte (Tabelle 33).

Tabelle 33 Abgleich der mittels ARDRA und Sequenzierung erhaltenen *pmoA* Gensequenzen (330 bp) der Anreicherung methanoxidierender Bakterien aus einer Fermenterprobe in NMS 131-Medium (Tabelle 8). Untersucht wurden alle Klone, die ein neues spezifisches Schnittmuster während des Restriktionsverdau erzeugten. Zur Identifizierung wurde die Gendatenbank des NCBI hinzugezogen.

Klon Nr.	Nächster Verwandter nach <i>pmoA</i> Genabgleich (NCBI)	Identität [%]
2	“Methanotroph Isolate 1” (McDonald et al. 2005)	99
4	“Methanotroph Isolate 1“	99
5	<i>Methylobacter</i> sp. HG-1	99
6	<i>Methylosinus trichosporium</i> Stamm KS18	99
8	<i>Methylobacter</i> sp. HG-1	99
10	<i>Methylobacter</i> sp. LW14	91
12	<i>Methylobacter</i> sp. LW14	90
16	<i>Methylocaldum marinum</i>	99
28	<i>Methylobacter</i> sp. HG-1	92
32	<i>Methylobacter</i> sp. LW14	91
34	<i>Methylosinus trichosporium</i> M23	92
54	<i>Methylocystis hirsuta</i> CSC1	93
55	<i>Methylobacter</i> sp. BB5	96

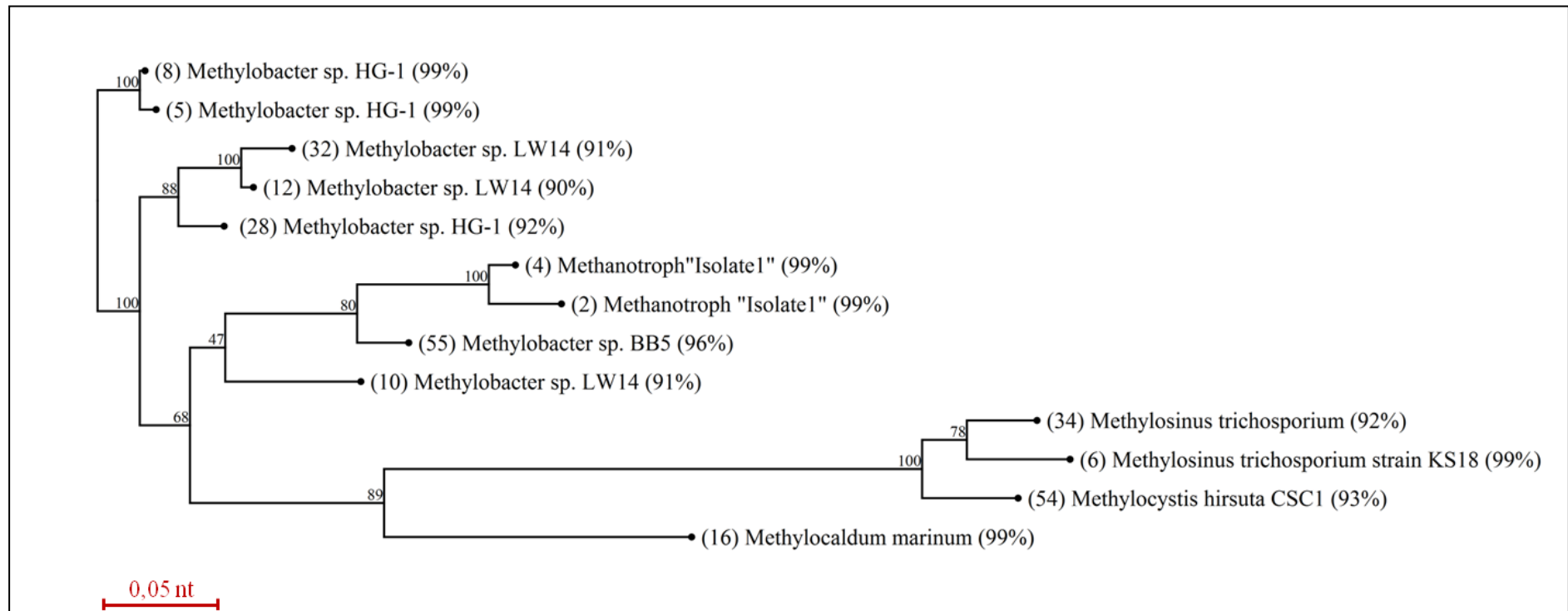


Abbildung 24 Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung der mittels ARDRA erhaltenen *pmoA* Gensequenzen aus einer Anreicherung methanoxidierender Bakterien aus der Biogasanlage des DBFZ. Die Konstruktion erfolgte nach der Neighbour-Joining Methode (Saitou und Nei 1987), wobei die Distanzdaten des Sequenzalignments nach (Jukes und Cantor 1969) korrigiert wurden. Die Güte der Zuordnung wurde über eine Bootstrap-Analyse (Felsenstein 1985) mit 1000 Wiederholungen überprüft, deren Ergebnisse auf den Stammbaumverzweigungen in Prozent ausgewiesen sind. Dargestellt ist jeweils die Klonnummer (Tabelle 33), die nächst verwandte Spezies sowie die genetische Übereinstimmung zu dieser in Prozent.

Abbildung 24 stellt die Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaums anhand der über eine ARDRA erhaltenen *pmoA* Gensequenzen einer Anreicherung methanotropher Bakterien aus der beprobten Biogasanlage dar. Dabei lassen sich mehrere Gruppen zusammenfassen, die eine größere genetische Distanz innerhalb des Stammbaums aufweisen. Innerhalb der γ -Proteobacteria können hierbei zwei Cluster mit den Gattungen *Methylobacter* sowie *Methylocaldum* aus der Familie Methylococcaceae identifiziert werden, wobei einige Klonsequenzen deutlich unterhalb der 97 % Übereinstimmungsgrenze liegen, sodass eine neue Art erwartet werden könnte. Eine hohe genetische Identität (99 %) kann in einigen Klonen zu *Methylobacter* sp. HG-1 sowie *Methylocaldum marinum* gefunden werden. Genetisch etwas weiter entfernt sind die Klone 2 und 4, die beide trotz eines unterschiedlichen Fragmentmusters über eine 99 % Identität zu einem Isolat (McDonald et al. 2005) aus dem aus Flussmündungssediment der Bucht von Newport, CA, USA, verfügen. Die größte Anzahl an erforderlichen Nukleotid-Substitutionen innerhalb des Stammbaums ist für die *pmoA* Sequenzen der Klone 6, 34 und 54 erforderlich. Mit hoher genetischer Übereinstimmung lässt sich dabei nur Klon 6 zuordnen, welcher eine 99 % Identität zu *Methylosinus trichosporium* Stamm KS18 zeigt und damit ein Vertreter der Familie Methylocystaceae aus der Klasse α -Proteobacteria wäre. Klon 34 und 54 besitzen zu ihm die höchste genetische Gemeinsamkeit, lassen jedoch auch hier aufgrund einer nur geringen genetischen Übereinstimmung von 92 - 93 % zur nächst verwandten Art auf eine bislang unbeschriebene Spezies schließen.

3.4 Mikrobielle Populationsdynamiken im Fermenter

In Kapitel 3.2.1 wurde bereits gezeigt, dass die drei Methanogenese-pfade anhand ihrer Isotopensignatur im CH_4 unterschieden werden können. Durch die Anwendung des Laserabsorptionsspektrometers an der Biogasleitung der FBGA des DBFZ wurden darüber hinaus auch fütterungs- und prozessbedingte Dynamiken der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte im Biogas beobachtet (3.2.3). Da angenommen werden kann, dass diese hauptsächlich durch mikrobielle Reaktionen im Reaktor verursacht werden, wurde mithilfe einer qPCR-Analyse die Zusammensetzung der methanogenen Population während eines 70-tägigen Beprobungszeitraums im Fermenter untersucht. Ferner wurde der Anteil von sulfatreduzierenden sowie protonsäureabbauenden und methanoxidierenden Bakterien exemplarisch gemessen. Die Quantifizierung der insgesamt elf untersuchten Zielorganismengruppen hätte das Anlegen ebenso vieler, spezifischer Zellzahlstandards und Verdünnungsreihen erfordert, wodurch das Fehlerpotential während des Vergleiches der verschiedenen Zellzahlen deutlich erhöht gewesen wäre. Aus diesem Grund wurde ein neuer Weg der qPCR-Quantifizierung entwickelt, indem in einem synthetischen DNA-Fragment die Primerbindesequenzen sämtlicher eingesetzter, spezifischer Primersets unter Berücksichtigung der Amplifikationslängen integriert wurden.

3.4.1 Evaluation des synthetischen DNA-Fragments als einheitlichen qPCR-Quantifizierungsstandard

Neben der Bedingung, dass alle verwendeten Primer an den synthetischen DNA-Strang binden können, musste gewährleistet sein, dass das PCR-Produkt, das während der Amplifizierung der DNA aus den Umweltproben entsteht, die selbe Fragmentlänge aufweist, wie das Amplifikat des künstlichen Standards. Dadurch wird abgesichert, dass einheitliche Fluoreszenz-Intensitäten während der Detektionsphase im qPCR-Zyklus ausgebildet werden. Dies wurde zunächst über eine PCR unter Verwendung sämtlicher ausgewählter Primersets mit der DNA des synthetischen Kopienstandards sowie jeweils einer Ziel-Referenzkultur untersucht (Abbildung 25 und Tabelle 27).

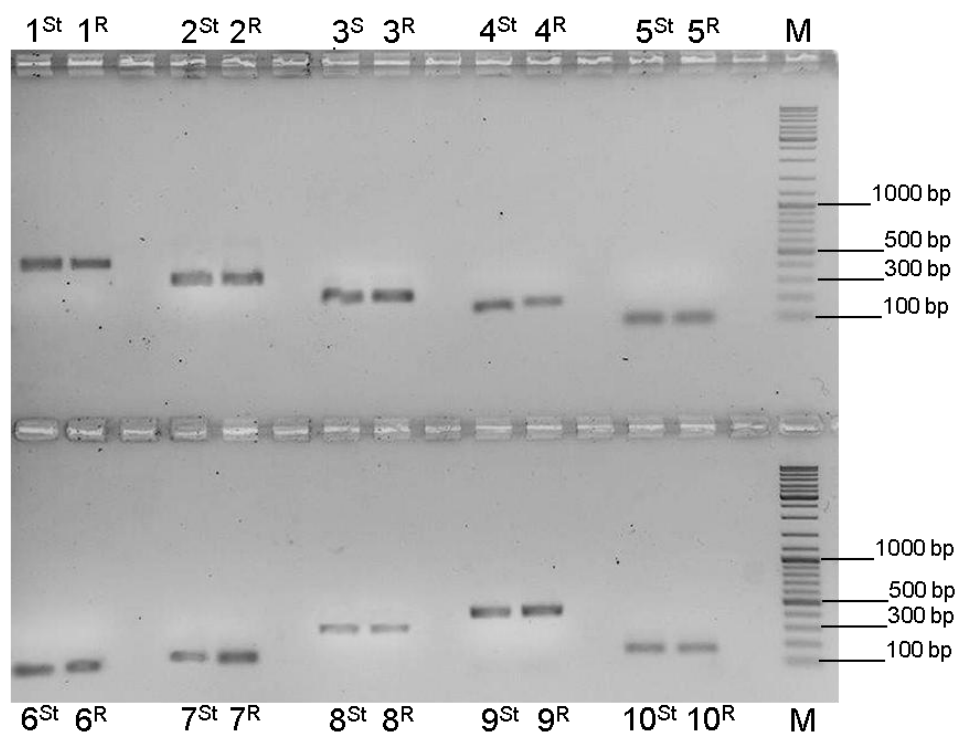


Abbildung 25 Agarose Gel mit den PCR-Produkte des synthetischen DNA-Strangs (St) zur Quantifizierung in qPCR Anwendungen und der jeweiligen Ziel-Referenzstämme (R) (Tabelle 27) unter Anwendung spezifischer Primerkombinationen (Tabelle 27):

1 = BAC338F und BAC805R, 2 = DSRp2060F und DSR4R, 3 = PCT-C1F und PCT-C1R, 4 = 931F und M1100R, 5 = MMB749F und MMB832R, 6 = MBT857F und MBT929R, 7 = MCC686F und MCC832R, 8 = MSL860F und MSL1159R, 9 = MSC380F und MSC828R, 10 = MST702F und MST862R, M = DNA-Größenstandard.

Der Abgleich der Amplifikatlängen ergab für sämtliche Primerpaare eine distinkte Bande im Agarosegel, deren Fragmentlänge in allen Fällen sowohl mit der des jeweiligen Referenzstammes als auch des synthetischen DNA-Standards übereinstimmte. Lediglich für das Primerpaar MCC686F und MCC832R, welches spezifisch an die 16S rRNA Gensequenzen der Ordnung Methanococcales bindet, wurde mit dem DNA-Extrakt von *Methanococcus maripaludis* DSM-2067 ein um 5 bp kürzeres DNA-Fragment erzeugt, als die PCR mit dem DNA-Standard ergab. Für dieses Primerpaar ist daher ein rund 3 % kleineres Amplifikat seitens der Zielorganismen in der Umweltprobe zu erwarten.

Mithilfe der in allen qPCR-Analysen mitgeführten dekadische Verdünnungsreihe des Standards zu 10^8 bis 10^2 Kopien / μl konnte für sämtlicher Primerpaare eine Kalibriergerade angelegt werden, die mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von $\geq 0,99$ eine präzise Quantifizierung aller angepeilten Organismengruppen ermöglichte. Auch in mehreren aufeinanderfolgenden qPCR-Ansätzen mit demselben Primerpaar wurden mit $\pm 0,4$ Abweichung innerhalb der cT-Werte hoch reproduzierbare Ergebnisse für jede Verdünnungsstufe erreicht. Die Effizienz, ein Maß für die Güte eines jeden Amplifikationszyklus, variierte innerhalb der verwendeten Primerkombinationen zwischen 0,92 und 1,0 und bestätigte damit eine erfolgreiche Vervielfältigung der Template-DNA in allen Reaktionsansätzen. Die Steigung der Kalibriergerade bewegte sich durchweg zwischen -3,28 und -3,52 und schnitt die y-Achse zwischen 43,4 und 44,75. Abbildung 26 zeigt exemplarisch die cT-Werte der dekadischen Verdünnungsreihe des synthetischen DNA-Standards. Insgesamt bestätigen diese Werte die hohe Exaktheit des entwickelten qPCR-Standards, sodass eine präzise und vergleichbare Analyse der Zellzahlen verschiedener mikrobieller Gruppen im Reaktor möglich war.

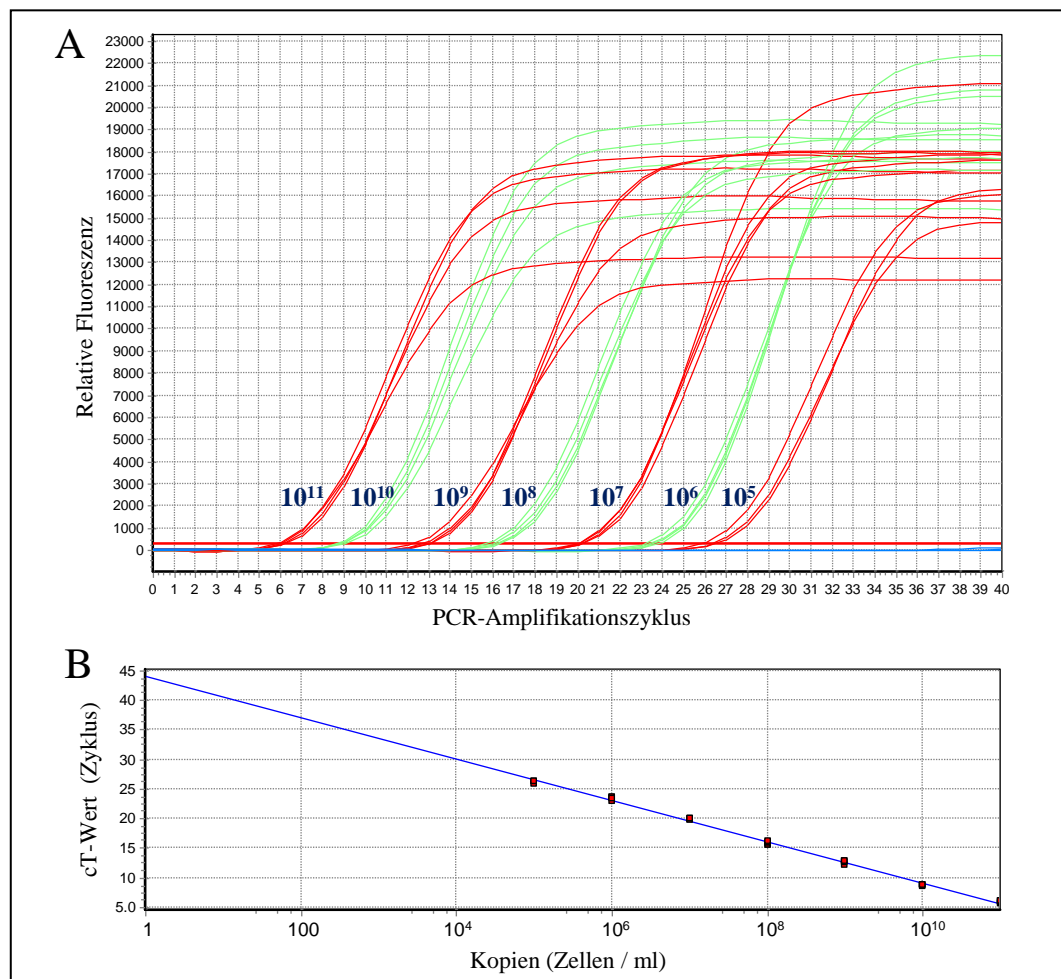


Abbildung 26 Exemplarische Konstruktion einer Kalibrierungsgerade zur Bestimmung der Kopienzahl eines Zielgenes in Reaktorproben über eine qPCR-Analyse.

- A) Relative Fluoreszenz-Intensität je Amplifikationszyklus des synthetischen DNA-Standards in einer dekadischen Verdünnungsreihe von 10^{11} bis 10^5 Kopien / ml. Die Negativkontrolle ohne Template-DNA (blaue Linie) führte zu keiner Fluoreszenz innerhalb der 40 Amplifikationszyklen.
- B) Anhand der cT-Werte der jeweiligen Verdünnungsstufe des Standards konstruierte Standardgerade. Über die Geradengleichung kann eine Quantifizierung der unbekanntenv Umweltproben erfolgen.

3.4.2 qPCR-Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung unter variierenden Prozessbedingungen

Zur Ermittlung der mikrobiellen Populationsdynamiken unter variierenden Prozessbedingungen und deren Einfluss auf die $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte im Biogas wurden Reaktorproben eines 70-tägigen Beprobungszeitraumes mithilfe von qPCR-Analysen und spezifischer Primersets untersucht (Tabelle 27). Um den Einfluss der Raumbelastung auf die Zusammensetzung der Mikrobiologie sowie die Isotopenverhältnisse untersuchen, wurde der Reaktor mit variierenden Substratmengen gefüttert. Neben einem Einfluss auf die Isotopensignatur von CH_4 , welche bereits in Abbildung 14 dargestellt wurde, führte dies zu schwankenden Essigsäurekonzentrationen und Biogasbildungsraten. Diese erreichten mit Messwerten von bis zu 6.300 mg / l Essigsäure und einer Biogasproduktion von 1.100 $\text{m}^3_{\text{Norm}} / \text{d}$ in Folge des wenige Tage zuvor erfolgten, hohen Substratinputs von über 13,5 $\text{kg}_{\text{OTS}} / (\text{m}^3 \times \text{d})$ an Tag 80 ein Maximum (Abbildung 27 und Tabelle 34). Die Gesamtsäure variierte fütterungsbedingt zwischen 485 und rund 9.200 mg / l, wobei der pH-Wert im Mittel um $7,33 \pm 0,3$ lag. Die durchschnittliche Zusammensetzung des Biogases beträgt 55,6 % CH_4 , 44,2 % CO_2 und 0,1 % O_2 , sowie 110 ppm H_2S und 101 ppm H_2 . Die Konzentration an $\text{NH}_4\text{-N}$ belief sich durchweg zwischen 1,3 - 1,9 g / l.

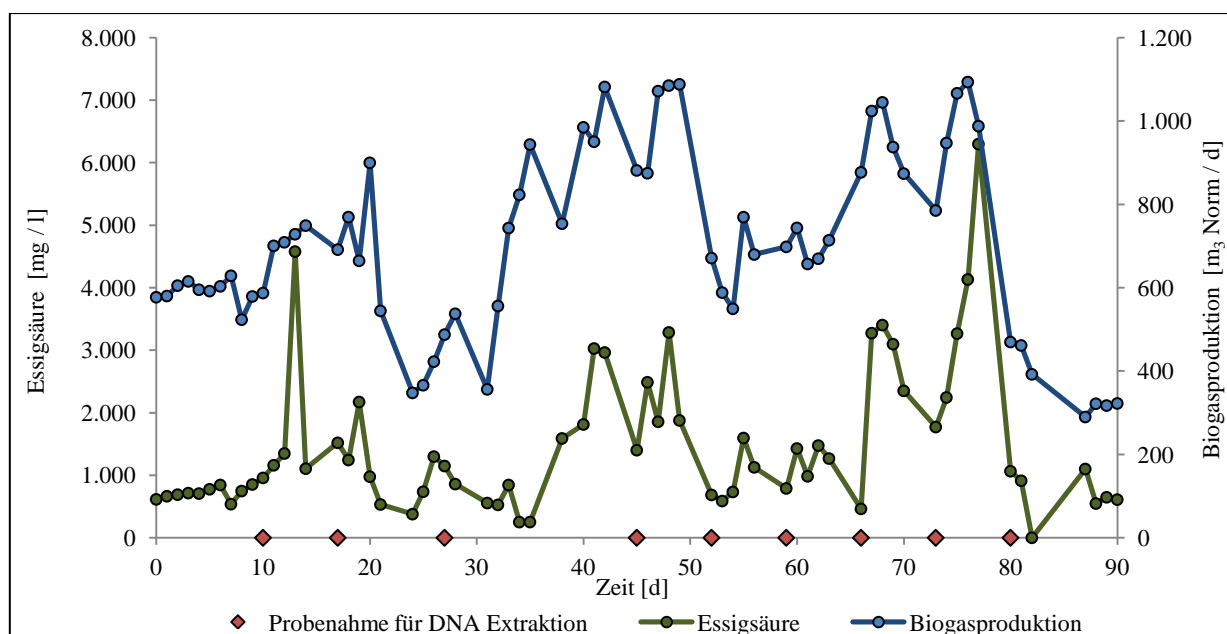


Abbildung 27 Essigsäurekonzentration und Biogasproduktion im Fermenter der FBGA des DBFZ während einer 90-tägigen Untersuchungsphase bei variierenden Raumbelastungen (Abbildung 5). Während eines 70-tägigen Zeitraumes wurden Reaktorproben in etwa wöchentlichem Intervall (rot gekennzeichnet) gezogen und eine DNA-Extraktion für anschließende qPCR-Analysen durchgeführt.

Tabelle 34 Säurespektrum, pH-Wert und Raumbelastung (OLR) im Fermenter der Forschungsbiogasanlage während der für die qPCR-Analysen beprobten Tagen.

Tag	pH	Essigsäure [mg / l]	Propionsäure [mg / l]	Buttersäure [mg / l]	Gesamtsäure [mg / l]	OLR [kg _{oTS} / (m ³ × d)]
10	7,4	957,9	53,2	12,0	1.027,7	6,8
17	7,4	1.477,5	71,0	16,7	1.576,3	7,7
27	7,5	1.148,7	175,9	42,8	1.393,7	4,3
45	7,3	1.401,7	145,1	27,9	1.592,2	7,7
52	7,3	685,7	69,5	17,9	779,2	4,9
59	7,4	789,6	70,4	9,3	875,6	5,3
66	7,5	462,2	19,8	2,8	487,3	0,8
73	7,2	1.771,6	398,5	83,6	2.320,1	10,5
80	7,6	1.064,7	254,8	114,7	1.474,4	3,3

Tabelle 35 Zellzahlen pro ml Reaktorprobe nach qPCR-Analysen wöchentlich entnommenen Gärsubstrates.

ARC = Archaeen, MSL = *Methanosarcinales*, MSC = *Methanosarcinaceae*, MSAE = *Methanosaetaceae*, MBT = *Methanobacteriales*, MMB = *Methanomicrobiales*, MCC = *Methanococcales*, BAC = Bakterien, SRB = sulfatreduzierende Bakterien, PAB = propionsäureabbauende Bakterien, MOB = methanoxidierende Bakterien.
Das Bestimmtheitsmaß innerhalb der cT-Werte der Umweltproben beträgt 0,97.

Zeit (d)	ARC	MSL	MSC	MSAE	MBT	MMB	MCC	BAC	SRB	PAB	MOB
10	$4,58 \times 10^9$	$2,92 \times 10^9$	$2,88 \times 10^9$	$4,10 \times 10^7$	$5,85 \times 10^8$	$1,08 \times 10^9$	$6,90 \times 10^3$	$2,89 \times 10^{10}$	$3,08 \times 10^5$	$2,54 \times 10^6$	$1,04 \times 10^5$
17	$3,27 \times 10^9$	$2,22 \times 10^9$	$2,16 \times 10^9$	$5,45 \times 10^7$	$3,05 \times 10^8$	$7,46 \times 10^8$	$6,56 \times 10^3$	$4,24 \times 10^{10}$	$7,81 \times 10^5$	$1,27 \times 10^6$	$6,87 \times 10^4$
27	$4,19 \times 10^9$	$1,93 \times 10^9$	$1,84 \times 10^9$	$9,39 \times 10^7$	$4,89 \times 10^8$	$1,77 \times 10^9$	$1,88 \times 10^4$	$8,10 \times 10^{10}$	$1,34 \times 10^6$	$7,05 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5$
45	$2,50 \times 10^9$	$1,56 \times 10^9$	$1,48 \times 10^9$	$8,03 \times 10^7$	$4,81 \times 10^8$	$4,58 \times 10^8$	$9,21 \times 10^3$	$4,65 \times 10^{10}$	$5,24 \times 10^5$	$1,09 \times 10^6$	$1,25 \times 10^5$
52	$1,88 \times 10^9$	$9,87 \times 10^8$	$8,56 \times 10^8$	$1,31 \times 10^8$	$4,64 \times 10^8$	$4,33 \times 10^8$	$1,40 \times 10^4$	$4,96 \times 10^{10}$	$7,21 \times 10^5$	$6,38 \times 10^5$	$1,62 \times 10^5$
59	$2,69 \times 10^9$	$1,41 \times 10^9$	$1,24 \times 10^9$	$1,69 \times 10^8$	$7,98 \times 10^8$	$4,80 \times 10^8$	$1,28 \times 10^4$	$4,92 \times 10^{10}$	$7,34 \times 10^5$	$4,75 \times 10^5$	$1,74 \times 10^5$
66	$1,89 \times 10^9$	$8,75 \times 10^8$	$7,12 \times 10^8$	$1,63 \times 10^8$	$6,35 \times 10^8$	$3,84 \times 10^8$	$1,42 \times 10^4$	$5,52 \times 10^{10}$	$9,29 \times 10^5$	$3,38 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$
73	$1,45 \times 10^9$	$6,38 \times 10^8$	$5,32 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$	$4,26 \times 10^8$	$3,83 \times 10^8$	$1,28 \times 10^4$	$3,60 \times 10^{10}$	$1,26 \times 10^6$	$2,82 \times 10^5$	$3,36 \times 10^5$
80	$3,30 \times 10^9$	$1,48 \times 10^9$	$1,26 \times 10^9$	$2,18 \times 10^8$	$1,29 \times 10^9$	$5,31 \times 10^8$	$2,12 \times 10^4$	$1,01 \times 10^{11}$	$2,39 \times 10^6$	$2,68 \times 10^5$	$3,95 \times 10^5$

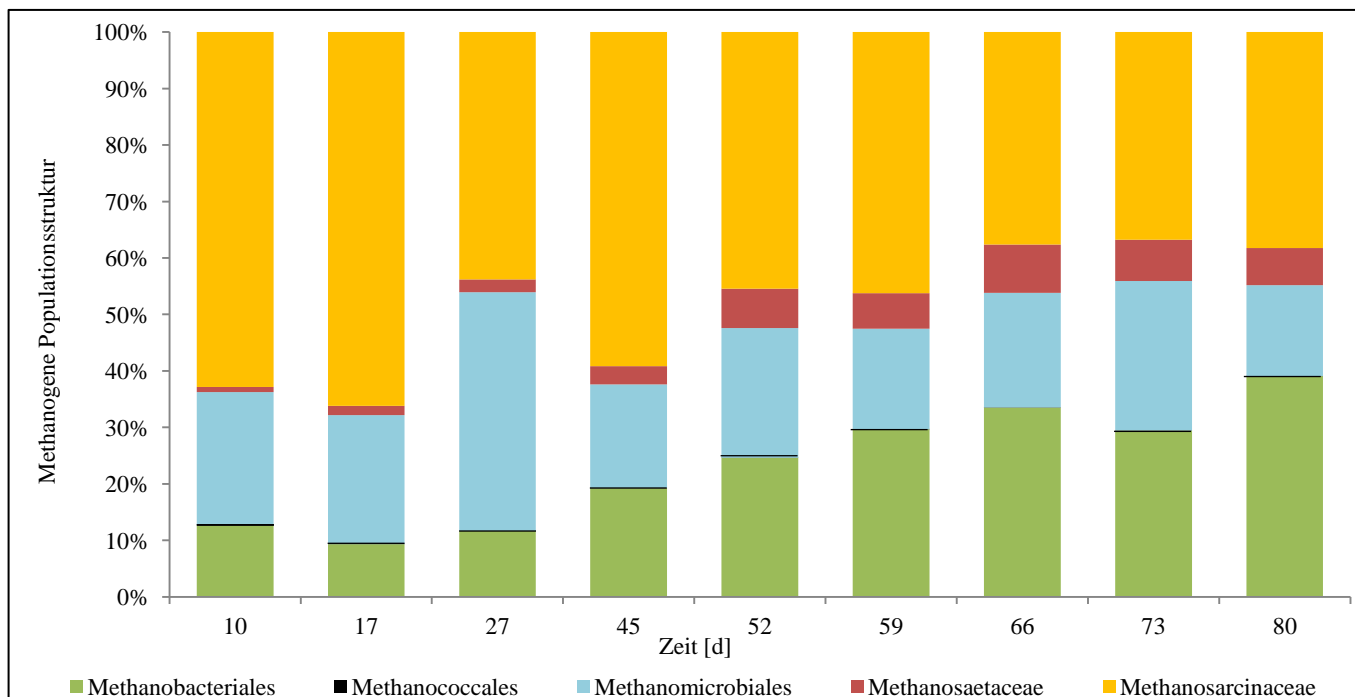


Abbildung 28

Relative Zusammensetzung der methanogenen Population während eines 70-tägigen Beprobungszeitraumes im Fermenter der Forschungsbiogasanlage. Der Anteil der jeweiligen Ordnung bzw. Familien innerhalb der Gesamtzellzahl an methanogenen Archaeen ist prozentual dargestellt. Die Ordnung *Methanosarcinales* ist in Form der beiden Familien *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae* aufgeführt.

Innerhalb des Untersuchungszeitraumes konnten deutlich variierende Gesamtzellzahlen an Bakterien und Archaeen im Fermenter festgestellt werden (Tabelle 35). Dabei bewegte sich die Anzahl an Bakterien zwischen $2,9 \times 10^{10}$ und $1,0 \times 10^{11}$ Zellen / ml Reaktorprobe, während methanogene Archaeen mit $1,5 \times 10^9$ bis $4,6 \times 10^9$ Zellen / ml nachgewiesen werden konnten. Der Anteil der methanogener Archaeen innerhalb der gesamten Fermentermikrobiota belief sich zu Versuchsbeginn auf rund 14 % (Tag 10), ging aber bereits binnen einer Woche (Tag 17) auf einen Anteil von etwa 7,2 % zurück. Im weiteren Verlauf dominierte im Fermenter zunehmend die bakterielle Population, sodass zuletzt nur 3,2 % (Tag 80) aller mikrobiellen Spezies methanogener Archaeen zuzuordnen waren. Die Zusammensetzung der methanogenen Mikrobiota zeigte sich während des Versuchszeitraums sehr dynamisch (Abbildung 28). Strikt hydrogenotrophe Archaeen (Methanomicrobiales, Methanobacteriales und Methanococcales) konnten zu $8,1 \times 10^8$ bis $2,3 \times 10^9$ Zellen / ml gefunden werden, während die weitestgehend auch acetoklastische Ordnung Methanosarcinales mit Zellzahlen zwischen $6,4 \times 10^8$ und $2,9 \times 10^9$ Zellen / ml etwas stärker durch die wechselnden Raumbelastungen beeinflusst erscheint. Dabei traten die höchsten Gasbildungsraten an Tagen mit einem großen Anteil an Methanosarcinales im Reaktor auf, obgleich sich letztere Ordnung als sehr sensibel gegenüber veränderte Fütterungsmengen erwies. So verringerte sich ihr Anteil innerhalb der methanogenen Population binnen zehn Tagen (Tag 17 - 27) von 67,8 % auf 44,1 %, weil die Fütterung kurzzeitig reduziert wurde. Ein Blick auf die Zellzahlen in diesem Intervall (Tabelle 35) zeigt jedoch nur einen Rückgang der Familie Methanosarcinaceae, während Methanosaetaceae und die obligat hydrogenotrophen Ordnungen von der Verringerung der Raumbelastung um 45 % weitestgehend unbeeinflusst erscheinen.

Von erhöhten Essigsäurekonzentrationen (> 1.500 mg / l), wie sie während der Phasen mit gesteigertem Substratinput zu messen waren (Abbildung 5 und Abbildung 27), scheint insbesondere die Familie Methanosarcinaceae zu profitieren, wohingegen die ausschließlich acetoklastische Familie Methanosaetaceae an Tagen mit niedrigen Säuremengen akkumulierte. Dabei bewirkte die innerhalb der Beprobungstage 17 und 27 auftretende, stufenweise Abnahme der Essigsäure von zeitweise 2.172 auf 378 mg / l eine Reduktion des relativen Anteils an Methanosarcinaceae um mehr als ein Drittel (Abbildung 28). Gleichzeitig konnte letztere Familie vermehrt bei einem erhöhtem Trockenmasseanteil ($< 9,5$ %) im Reaktorsubstrat nachgewiesen werden. Allgemein bildeten Methanosarcinaceae durchgehend den größten Anteil innerhalb der methanogenen Archaeen des Fermenters, obgleich die Zusammensetzung der Ordnung aufgrund eines kontinuierlichen Rückgangs der Familie Methanosarcinaceae bei gleichzeitigem Anstieg der Familie Methanosaetaceae im Versuchsverlauf deutlich variierte.

Innerhalb der obligat hydrogenotrophen methanogenen Archaeen kann zunächst eine deutliche Dominanz der Ordnung Methanomicrobiales festgestellt werden, die mit $1,8 \times 10^9$ Zellen / ml an Tag 27 rund Dreiviertel der strikt hydrogenotrophen Archaeen im Reaktor repräsentierten. Ab Tag 34 wurde die tägliche Einbringung von Rindergülle von 0,5 auf 2,0 t / d erhöht. Während dies die übrige methanogene Mikrobiota nur geringfügig beeinflusste, reduzierte sich die Zellzahl der Methanomicrobiales

(Tag 45) auf ein Viertel des vorherigen Messwertes, welche sich bis zuletzt um rund $4,5 \times 10^8$ Zellen / ml bewegte. Im Gegensatz dazu konnte die Menge an Methanobacteriales im weiteren Zeitverlauf deutlich zugewinnen, sodass gegen Versuchsende rund $1,3 \times 10^9$ Zellen / ml dieser Ordnung vorlagen. Mit $6,6 \times 10^3$ bis $2,1 \times 10^4$ Zellen / ml stellt die Ordnung Methanococcales den kleinsten Anteil innerhalb der methanogenen Mikrobiota, und zeigt sich wie die Familie Methanosaetaceae sensibel für erhöhte Säurekonzentrationen.

Insgesamt führten mehrtägige Perioden mit reduzierter Raumbelastung, wie zwischen Tag 59 und 66 (Abbildung 5), zu einem merklichen Rückgang aller methanogenen Archaeen, während die Gesamtzahl an Bakterien sogar leicht zunehmen konnte. Dabei sind nach dieser Hungerphase sowohl an Tag 66 als auch noch an Tag 73 niedrigere methanogene Zellzahlen zu messen, die, angeregt durch die anschließende Überfütterungsphase, erst zum letzten Messtag wieder deutlich zugewinnen konnten.

Die Menge an sulfatreduzierenden Bakterien schwankte parallel zur Gesamtzahl an Bakterien in der Biogasanlage und bewegte sich zwischen $3,1 \times 10^5$ und $2,4 \times 10^6$ Zellen / ml. Aufgrund der Zugabe entschwefelnder Substanzen (Deuto-clear[®], Lukeneder, Zwickau) und einer zusätzlichen biologischen Entschwefelung durch Einblasen geringer Mengen an Luft (< 200 ppm O₂) können keine quantitativen Rückschlüsse über die Menge und Aktivität dieser Spezies aus dem Anteil an H₂S im Biogas gezogen werden. Im Gegensatz dazu verhielt sich die Zellzahl der propionsäureabbauenden Bakterien gegenläufig zur gesamt bakteriellen Anzahl. Eine Korrelation zu den Säurekonzentrationen, insbesondere in Bezug auf die Menge an Propionsäure, konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr nahm, im Gegensatz zu den Sulfatreduzierern, der Titer der acetogenen Spezies ab der Versuchsmitte kontinuierlich ab.

Erstmalig konnten auch methanoxidierende Bakterien in einer Biogasanlage nachgewiesen werden. Ihr Anteil belief sich während der Versuchsperiode auf rund $6,9 \times 10^4$ bis $4,0 \times 10^5$ Zellen / ml und erschien mit der Raumbelastung verknüpft. So kam es zu einem merklichen Anstieg der Zellzahl methanoxidierender Bakterien während der Überfütterungsphase ab Tag 67. Ein Bezug zur CH₄- bzw. O₂-Konzentration des Biogases sowie zur Biogasbildungsrate konnte hingegen nicht festgestellt werden.

3.5 Die Biozönose beeinflusst das Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)

Mit Blick auf die Isotopenverhältnisse im Biogas können einige Parallelen zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung und dem Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werten im Untersuchungszeitraum gefunden werden (Abbildung 29).

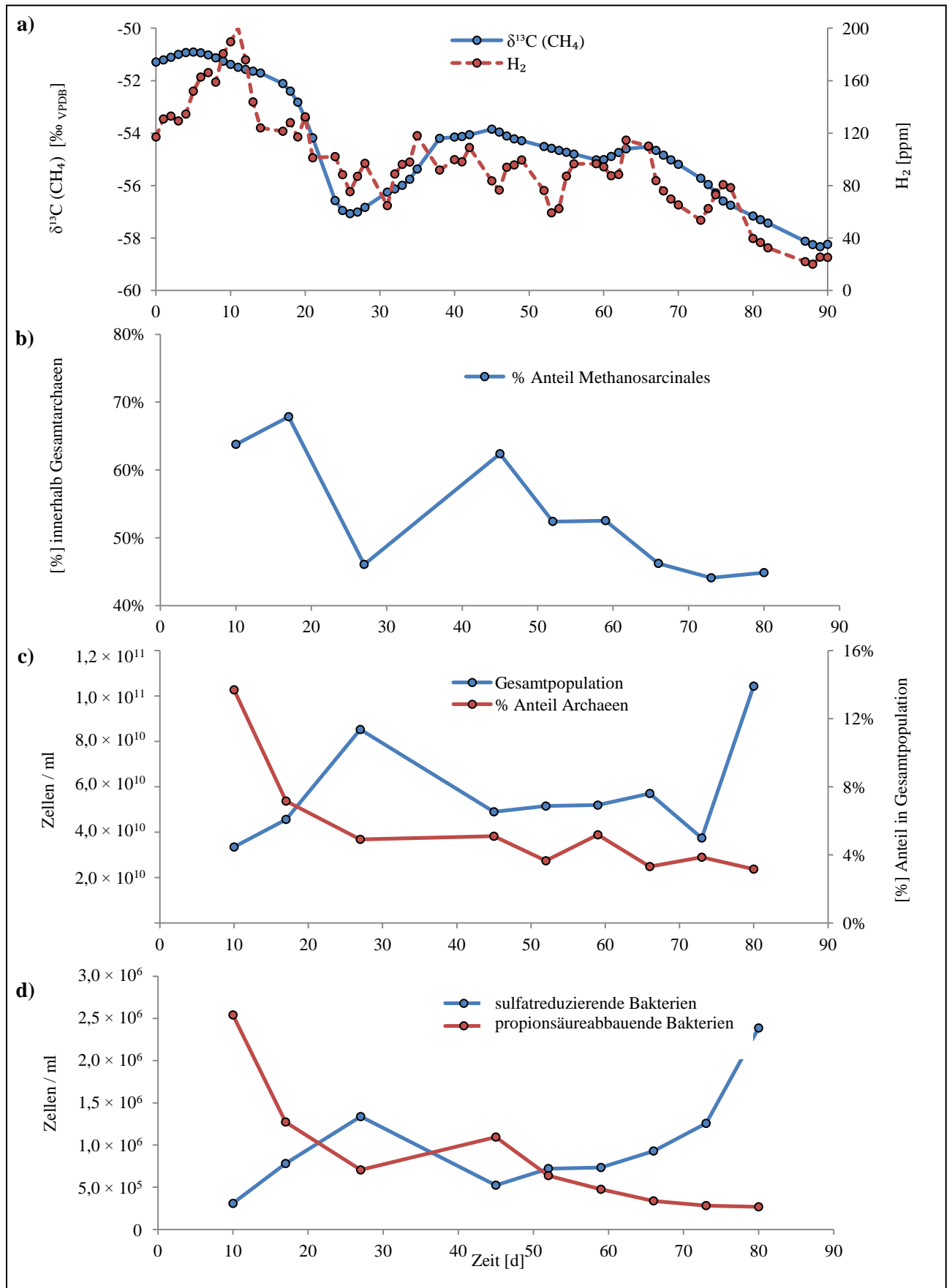


Abbildung 29 Isotopenverhältnisse im Biogas und Zusammensetzung der Reaktormikrobiologie innerhalb einer mehrwöchigen Untersuchungsperiode.

a) Tagesdurchschnittliche $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte und H_2 -Konzentration im Biogas, **b)** Prozentualer Anteil an Methanosarcinales bezogen auf die methanogene Gesamtzellzahl, **c)** Mikrobielle Gesamtzellzahl und prozentualer Anteil an Archaeen im Reaktor, **d)** Zellzahl sulfatreduzierender Bakterien sowie propionsäureabbauender Bakterien.

Zur Übersicht stellt Abbildung 29a noch einmal die mittleren $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte des Biogases über die 70-tägige Reaktorbehebungsperiode hinweg dar. Dabei fällt zunächst auf, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anreicherung des schweren C-Isotopes im CH_4 und der Konzentration von H_2 im Biogas besteht, wobei mit zunehmendem Diskriminierungsgrad eine Abnahme von H_2 zu messen war. Wie bereits in Absatz 3.2.1 anhand von Reinkultorexperimenten gezeigt, lassen abgereichertere $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte auf eine vermehrt hydrogenotrophe Methanogenese schließen. So ist insbesondere im Zeitraum zwischen den Tagen 17 und 27, in welchem die tägliche Substratzufuhr deutlich verringert worden war, eine rapide Abnahme der Menge an $^{13}\text{CH}_4$ und H_2 im Biogas zu verzeichnen. Binnen zehn Tagen veränderte sich dabei der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Wert von -52,1 auf -57,1 ‰ bei paralleler Abnahme des H_2 im Biogas um rund 35 ppm. Das Isotopenverhältnis reagiert dabei offenbar sehr sensibel auf veränderte Fütterungsmengen und indiziert selbst kurzfristige Änderungen wie beispielsweise während der Tage 23 und 24, an welchen die Raumbelastung von 4,2 auf 0,4 $\text{kg}_{\text{OTS}} / (\text{m}^3 \times \text{d})$ reduziert worden war (Abbildung 5), mit einer Abnahme der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte von -54 auf -56 ‰ binnen 24 h. Währenddessen ging die Proportion potentiell acetoklastischer methanogener Archaeen, wie in Abbildung 29b anhand des prozentualen Anteils an Methanosarcinales innerhalb der methanogenen Population gezeigt, signifikant zurück, sodass ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an potentiell acetatverwertenden Archaeen und den Isotopenverhältnissen im CH_4 angenommen werden kann. Auch die erneute Zunahme der Ordnung Methanosarcinales bis zur Versuchsmitte verlief parallel mit einer Anreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ im Biogas. Darüber hinaus scheint ein Bezug zwischen den $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werten und der mikrobiellen Gesamtzellzahl im Reaktor vorzuliegen (Abbildung 29c). Diskriminiertere $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte traten dabei mit zunehmender Zelldichte auf. Je weniger Archaeen im Verhältnis zu Bakterien vorlagen, umso abgereicherter erschien zudem das C-Isotopenverhältnis des CH_4 . Insbesondere in der letzten Analysewoche (Tag 73 - 80) kam es zu einem starken Anwachsen der mikrobiellen Population von $3,7 \times 10^{10}$ auf $1,0 \times 10^{11}$ Zellen / ml, auf welche die $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte mit einer deutlichen Abreicherung reagierten. Zudem sind größere Zellmengen der sulfatreduzierenden Spezies während abgereicherterer $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte zu messen, sodass ein erhöhter Anteil der Sulfatreduktion bei der Isotopensignatur einer vermehrt hydrogenotrophen Methanbildung vermutet werden könnte (Abbildung 29d). Ganz anders verhielt sich hingegen der Verlauf der Zellzahlen propionatabbauender Bakterien während des mehrwöchigen Zeitraumes. Ihre Zellzahl bewegte sich gegenläufig zur bakteriellen Gesamtzellzahl sowie sulfatreduzierender Bakterien und wies vielmehr einen ähnlichen Verlauf wie der relative Anteil an Methanosarcinales (Abbildung 29b) in der methanogenen Gesamtpopulation auf. Damit sind Propionsäureabbauende Bakterien insbesondere bei angereicherteren $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werten im Reaktor zu finden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die C-Isotopensignatur des CH_4 in erheblichem Maße von der Zusammensetzung der methanogenen sowie bakteriellen Population im Reaktor beeinflusst scheint, sodass anhand der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte im Biogas einige Rückschlüsse auf die mikrobiellen Stoffwechselwege im Gärprozess gezogen werden können.

4 Diskussion

4.1 Mikrobielle Populationsdynamiken in Biogasanlagen

Die Effizienz von Biogasanlagen ist maßgeblich durch die Reaktormikrobiologie beeinflusst, sodass es selbst in hochtechnisierten Anlagen ohne eine optimale Mikrobiota nur zu geringen Biogasausbeuten kommen kann (Sekiguchi et al. 2001). Sehr häufig wird daher die quantitative real-time PCR-Methode (qPCR) für die Untersuchung von Fermenterproben eingesetzt. Diese ermöglicht aufgrund der fortlaufenden Entwicklung genspezifischer Primer und Sonden eine hochpräzise und quantitative Analyse der mikrobiellen Population (Narihiro und Sekiguchi 2011). Eine besondere Herausforderung der qPCR-Methode ist jedoch die Notwendigkeit eines definierten Kopiennummer-Standards, anhand dessen Fluoreszenz-Intensität der unbekannte Titer einer Zielgruppe in Umweltproben quantifiziert werden kann. Bislang wurden hierzu Plasmide mit einer klonierter Zielsequenz einer Spezies, PCR-Produkte, DNA-Extrakte zuvor ausgezählter Reinkulturen, genomische DNA oder etwa 100 bp lange DNA-Fragmente (Ultramere) eingesetzt (Viljoen et al. 2013; Dhanasekaran et al. 2010; Bustin et al. 2009; Sawayama et al. 2006; Yun 2006; Zhang und Fang 2006; Dworkin 2002). In den meisten Publikationen, die qPCR-Analysen mikrobieller Populationen in Biogasanlagen beschreiben, wird hierfür bislang ein Zielgen, in der Regel die 16S rRNA Gensequenz eines Referenzstammes in ein Plasmid kloniert und dessen Kopienzahl anschließend photometrisch bestimmt (Li et al. 2013; Moestedt et al. 2013; Kampmann et al. 2012; Traversi et al. 2012; Shin et al. 2010; Klocke et al. 2008).

Mit der Entwicklung eines synthetischen DNA-Quantifizierungsstandards im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Verfahren etabliert werden, welches zukünftige qPCR-Analysen deutlich vereinfachen kann. Die einmalige Quantifizierung eines Standards, der durchgehend für die Zellzahlbestimmung sämtlicher Zielorganismen verwendet werden kann, sowie das Anlegen einer einzigen Kopienzahl-Verdünnungsreihe, vereinheitlichen und vergünstigen künftige qPCR-Untersuchungen deutlich, erhöhen die Vergleichbarkeit und senken das Fehlerrisiko. Zudem ist ein Besitz von Referenzstämmen oder deren DNA-Extrakten für die Herstellung multipler Quantifizierungsstandards nicht mehr erforderlich, sodass lediglich spezifische, zielgerichtete Primer für die qPCR-Analyse notwendig sind. Aufgrund dessen kann die Methode für die quantitative Analyse sämtlicher Umweltproben angewandt werden und erscheint insbesondere für die Quantifizierung schwer kultivierbarer oder nicht auszählbarer Organismen interessant.

Der synthetische DNA-Standard wurde anhand eines quantitativen Nachweises von elf exemplarischen, mikrobiellen Gruppen in mehreren Fermenterproben aus dem Forschungsreaktor des DBFZ evaluiert. Dabei bestätigt das hohe Bestimmtheitsmaß von $\geq 0,99$ sämtlicher mit dem neuem Standard erstellten Kalibriergeraden die hohe Spezifität sowie Reproduzierbarkeit der Quantifizierungsmethode.

Während des 70-tägigen Untersuchungszeitraumes wurden in einem wöchentlichem Intervall Reaktorproben entnommen und molekularbiologisch untersucht. Um mögliche Veränderungen in der Mikrobiota aufgrund variierender Prozessbedingungen zu untersuchen, wurden in dieser Zeit verschiedene Fütterungsmengen im Reaktor erprobt, um deren Einfluss auf die mikrobielle Population im Fermenter zu beobachten. Bislang gibt es nur wenige Studien, in welchen die Reaktormikrobiota bei hohen Raumbelastungen untersucht wurde, wobei in der Regel nur eine einzige Reaktorprobe hinzugezogen wurde (Lerm et al. 2012; Chelliapan et al. 2011; Tale et al. 2011; Blume et al. 2010; Hori et al. 2006). In diesem Zusammenhang bestätigte die qPCR-Analyse der Proben aus dem Forschungsreaktor, dass die Raumbelastung einen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl methanogener Archaeen und Bakterien aufweist, wobei insbesondere bei erhöhtem Substratinput größere Säuremengen und Gasproduktionsraten zu verzeichnen waren. Grundsätzlich verliefen Zu- oder Abnahmen der methanogenen sowie bakteriellen Zellzahlen im untersuchten Zeitraum parallel, obgleich das absolute Verhältnis von Archaeen zu Bakterien besonders bei zunehmender Fütterungsmenge variierte. Eine angepasste Substratzufuhr gilt daher als eine der größten Herausforderungen für den Betreiber von Bioreaktoren, da die Erhöhung des Substratinputs nur bis zu einem anlagenspezifischen, individuellen Grenzwert zu einer besseren Gasausbeute führen kann, während eine weitere Überladung eine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung bis hin zu einer Hemmung der gesamten methanogenen Population bewirken kann (Vrieze et al. 2012; Blume et al. 2010; Karakashev et al. 2005; McMahan et al. 2004). Im Versuchszeitraum schienen insbesondere Bakterien aus der Hydrolyse- und Acidogenesestufe des anaeroben Biomasseabbaus von der gesteigerten Substratzufuhr zu profitieren, welche im Fermenter den Abbau komplexer Polysaccharide, Fette und Proteine zu kurzkettigen Fettsäuren, H_2 und CO_2 katalysieren. Infolgedessen konnte ein signifikanter Anstieg des Gesamttiters an Bakterien beobachtet werden, wohingegen der prozentuale Anteil methanogener Archaeen deutlich abnahm. Zudem wurde ein Rückgang acetogener Bakterien, wie beispielhaft anhand der Zellzahl propionsäureabbauender Bakterien untersucht wurde, festgestellt. Dadurch kam es zu einer Verschiebung innerhalb des Säurespektrums, wobei C3- bis C5-Säuren wie Propion-, Butter- und Valeriansäure im Verhältnis zur Essigsäure zunahm.

Dabei ist der Abbau kurzkettiger Fettsäuren thermodynamisch nur dann möglich, wenn ein geeigneter Akzeptor für H_2 verfügbar ist, sodass die H_2 -Konzentration produktseitig niedrig gehalten wird (Garcia et al. 2000). Diese Position nehmen in der Regel hydrogenotrophe methanogene Archaeen ein, welche häufig eng benachbart zu acetogenen Bakterien gefunden werden können (Bok et al. 2004; Sekiguchi et al. 2001; Imachi et al. 2000; Sekiguchi et al. 1998; Schink 1997; Schmidt und Ahring 1995). Das thermodynamisch ungünstigste Verhältnis mit $\Delta G^0 = +76,1 \text{ kJ}$ weist dabei der bakterielle Abbau von Propionsäure auf, bei welchem pro Säuremolekül insgesamt 3 H_2 entstehen, welche wiederum von methanogenen oder sulfatreduzierenden Spezies über die Reduktion CO_2 entfernt werden müssen (Felchner-Zwirello 2014).

Dieser Zusammenhang konnte während der mehrwöchigen Beprobungsperiode nicht beobachtet werden. So zeigte sich im Forschungsfermenter der größte Titer propionsäureabbauender Bakterien an Tagen mit erhöhten Wasserstoffpartialdrücken, wie sie vor allem in den ersten Versuchswochen zu messen waren. Ferner konnte kein Zusammenhang zwischen der Zellzahl strikt hydrogenotropher methanogener Archaeen sowie sulfatreduzierender Bakterien nachgewiesen werden, welche entgegen der vorherigen Annahme vor allem bei niedrigen Zellzahlen propionsäureabbauender Spezies detektiert werden konnten. Bemerkenswert ist zudem ein Bezug zu der Familie Methanosarcinaceae, deren Zellzahlen nahezu parallel zu der Menge dieser acetogenen Bakterien verlaufen. Beide Gruppen nehmen quantitativ während des untersuchten Zeitraums ab, während die Titer der strikt hydrogenotrophen Ordnungen Methanobacteriales und Methanococcales zunahmen. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass neben H_2 auch durch Acetat eine Endprodukthemmung während des Abbaus von Propionsäure bedingt werden kann. Dies wurde bereits in Konsortien aus buttersäure- oder propionsäureabbauenden Bakterien und hydrogenotrophen methanogenen Archaeen untersucht, wobei eine externe Zugabe von Acetat den Abbau der Säuren deutlich reduzierte (Bok et al. 2004; Ahring und Westermann 1988; Boone und Xun 1987). Damit wären viele Spezies aus der Familie Methanosarcinaceae ideale Partner für die acetogenen Bakterien, da diese aufgrund ihres breiten Substratspektrums sowohl Acetat als auch H_2 (+ CO_2) und somit sämtliche Produkte aus der Propionat- und Butyratoxidation entfernen könnten.

Innerhalb der methanogenen Population konnte in sämtlichen Proben aus dem 70-tägigen Beprobungszeitraum eine Dominanz der Ordnung Methanosarcinales festgestellt werden. Da neben der Familie Methanoaetaceae auch ein Großteil der Spezies aus der Familie Methanosarcinaceae Acetat als eine Energiequelle nutzen kann, belief sich der Anteil an potentiell acetoklastischen Archaeen innerhalb der methanogenen Mikrobiota auf 45 - 67 %. Dabei konnte insbesondere an Tagen mit verstärkter Gasproduktionsrate ein hoher Titer an Methansarcinales nachgewiesen werden, weshalb die Ordnung als ein möglicher Bioindikator für einen stabilen Prozess hinzugezogen werden könnte. Insgesamt stellte die Familie Methanosarcinaceae durchweg den größten Anteil innerhalb der Methansarcinales, wobei bereits in einigen molekularbiologischen Populationsstudien in Biogasanlagen die Gattung *Methanosarcina* als die häufigste Gruppe innerhalb der Methanosarcinaceae identifiziert wurde (Stantscheff et al. 2014; Ma et al. 2013; Nettmann et al. 2010; Sawayama et al. 2006). *Methanosarcina* sp. gelten aufgrund ihres breiten Substratspektrums als die metabolisch vielseitigsten Archaeen in Biogasanlagen überhaupt. Darüber hinaus wurde eine im Vergleich zu anderen methanogenen Spezies erhöhte Stresstoleranz beobachtet. Diese ist möglicherweise auf ihre kugelförmige Morphologie sowie die größtenteils vorhandene Fähigkeit, Cluster aus bis zu mehreren tausend Zellen zu formen, zurückzuführen, wodurch sie ein wesentlich günstigeres Oberflächen zu Volumenverhältnis als stäbchenförmige oder filamentöse Zellen aufweisen (Vrieze et al. 2012). Zudem wurde für zahlreiche Spezies der Gattung *Methanosarcina* eine verbesserte Resistenz gegenüber erhöhten NH_3 -Konzentrationen sowie eine optimierte Stabilität gegenüber mechanischen Einflüssen beobachtet, sodass *Methanosarcina* sp. eine hohe Bedeutung für die Stabilität eines anaeroben Bioreaktors zugesprochen wird (Vrieze et al. 2012; Khanal 2011; Calli et al.

2005). Mit durchschnittlich 1 - 1,2 Tagen Verdopplungszeit weisen *Methanosarcina* sp. darüber hinaus ein relativ schnelles Wachstum auf, sodass die Gattung vor allem bei einer kurzen hydraulischen Verweildauer des Gärsubstrates weitere methanogene Spezies im Fermenter überwachsen kann (Ma et al. 2013; Shin et al. 2011). So konnte bereits eine deutliche Dominanz von *Methanosarcina* sp. während erhöhter Raumbelastungen und Säurekonzentrationen sowie niedrigeren pH-Werten festgestellt werden (Ma et al. 2013; Conklin et al. 2006; Karakashev et al. 2005). Diese Beobachtung deckt sich auch mit den im Rahmen der Fütterungsexperimente am Forschungsreaktor des DBFZ durchgeführten qPCR-Analysen.

Im Gegensatz dazu schien die Familie Methanosaetaceae besonders empfindlich gegenüber einem Anstieg der Gesamtsäurekonzentration zu sein. Dabei konnte während der mehrwöchigen Analysephase ein vermehrtes Vorkommen von *Methanosaeta* sp. vor allem bei geringeren Fütterungsmengen und dadurch verbundener, längerer Verweilzeiten des Gärsubstrates nachgewiesen werden. Dies kann zum einen auf die im Vergleich zu anderen methanogenen Archaeen geringeren Wachstumsraten von *Methanosaeta* sp. zurückgeführt werden, aufgrund derer die Familie Methanosaetaceae insbesondere nach Stressperioden deutlich langsamer zunehmen kann, als etwa Spezies der Familie Methanosarcinaceae (Smith und Ingram-Smith 2007; Conklin et al. 2006). Zum anderen unterscheiden sich die beiden Familien in den Enzymen, welche die initiale Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA im Rahmen der acetoklastischen Methanogenese katalysieren. Hierzu besitzt etwa *Methanosaeta soehngeni* das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase mit einem K_M -Wert von 0,86 μM , wohingegen beispielsweise *Methanosarcina barkeri* eine Acetat-Kinase sowie eine Phosphotransacetylase mit einem deutlichen höherem K_M -Wert von rund 3 mM für die Acetataktivierung einsetzt. Infolgedessen können *Methanosaeta* sp. aufgrund ihrer hohen Substrataffinität bereits bei geringen Acetatmengen zwischen 7 - 70 μM detektiert werden. Hingegen sind *Methanosarcina* sp. durch ihre Enzymausstattung auf eine Mindestmenge von 0,2 - 1,2 mM Acetat angewiesen (Smith und Ingram-Smith 2007; Hori et al. 2006; Jetten et al. 1992; Jetten et al. 1990; Jetten et al. 1992), sodass *Methanosaeta* sp. in vielen Habitaten mit geringer Acetatkonzentration wie beispielsweise in Reisfeldern und Klärschlamm-Reaktoren als die dominierenden acetoklastischen, methanogenen Archaeen beschrieben werden (Fey und Conrad 2000; Griffin et al. 1998). In NawaRo-Biogasanlagen hingegen wird die Familie Methanosarcinaceae aufgrund der in der Regel oberhalb ihrer erforderlichen Mindestkonzentration befindlichen Acetatmengen häufig nachgewiesen, wobei sich Spezies dieser Familie vor allem bei erhöhten Säure- und NH_3 -Konzentrationen gegenüber *Methanosaeta* sp. durchzusetzen scheinen (Klocke et al. 2008; Hori et al. 2006; Karakashev et al. 2005; Garcia et al. 2000; Koster und Lettinga 1988). So beobachteten Conklin et al. 2006 etwa eine Dominanz von *Methanosarcina* sp. gegenüber *Methanosaeta* sp. bei Acetatkonzentrationen über 236 mg/l. Während des 70-tägigen Untersuchungszeitraumes konnten auch im Forschungsfermenter durchgehend Acetatkonzentrationen oberhalb von 250 mg/l gemessen werden, aufgrund derer eine acetoklastische Methanogenese seitens Methanosarcinaceae möglich erscheint (Hunik et al. 1990). Hingegen kann eine Hemmung der acetoklastischen Archaeen, insbesondere von Methanosaetaceae durch

freies NH_3 im Rahmen der Untersuchungen ausgeschlossen werden (Demirel und Scherer 2008; Sterling et al. 2001; Chen et al. 2008; Koster und Lettinga 1988), da sich die Konzentration des gesamten $\text{NH}_4\text{-N}$ im Reaktor fortlaufend im unproblematischen Bereich bewegte. Ferner wurde festgestellt, dass das Fütterungsintervall sowie mechanische Einflussfaktoren wie die Intensität der Rührwerke im Fermenter, welche insbesondere die fragilen Filamente von *Methanosaeta* sp. beeinträchtigen können, erhebliche Auswirkungen auf die relative Menge und Zusammensetzung der acetoklastischen Familien haben können (Lerm et al. 2012; Chelliapan et al. 2011; Hoffmann et al. 2008; Conklin et al. 2006).

Innerhalb der obligat hydrogenotrophen Archaeen wurde der größte Titer für die Ordnung Methanomicrobiales während der ersten Wochen der Beprobung detektiert. Eine Dominanz dieser Ordnung, insbesondere der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* und *Methanospirillum* wurde bereits in vielen Studien zur methanogenen Population in Biogasanlagen beschrieben (Wirth et al. 2012; Nettmann et al. 2010; Kröber et al. 2009; Klocke et al. 2008; Hori et al. 2006). Allgemein konnte im Forschungsfermenter ein erhöhter Anteil an strikt hydrogenotrophen Archaeen bei H_2 -Konzentrationen unterhalb von 80 ppm im Biogas festgestellt werden. Parallel dazu nahm die Zahl an Methanosarcinaeae, welche ebenfalls größtenteils zu einer hydrogenotrophen Methanogenese befähigt sind, deutlich ab. Dies könnte damit begründet sein, dass obligat hydrogenotrophe Archaeen wesentlich besser an niedrige H_2 -Partialdrücke angepasst sind als beispielsweise *Methanosarcina* sp. (Thauer et al. 2008), aufgrund dessen die Familie Methanosarcinaeae vor allem während hoher H_2 -Konzentrationen nachgewiesen werden konnte.

In Hinblick auf die Zellzahlen obligat hydrogenotropher Archaeen scheint die Ordnung Methanococcales mit nur rund 10^4 Zellen / ml in Biogasanlagen kaum eine Relevanz zu haben. In einigen Studien, die mithilfe von ARDRA-Untersuchungen und Klondatenbanken die mikrobielle Population in Biogasfermentern charakterisierten, konnten oftmals überhaupt keine Methanococcales in den beprobten Reaktoren nachgewiesen werden (Zhu et al. 2011; Klocke et al. 2008).

Nachdem ab Tag 31 die tägliche Fütterungsmenge von Rindergülle von $0,5 \text{ m}^3$ auf $2,0 \text{ m}^3$ erhöht wurde, konnte zunehmend eine Anreicherung der Ordnung Methanobacteriales verzeichnet werden, während die Zellzahl der Ordnung Methanomicrobiales signifikant zurückging. Möglicherweise kann ein Mangel von Spurenelementen ein optimales Wachstum letzterer Ordnung verhindert haben. Eine Dominanz von Methanobacteriales ist bereits häufig für Biogasanlagen beschrieben worden, die vermehrt mit Gülle gefüttert werden (Zhu et al. 2011; Janssen und Kirs 2008; Sawayama et al. 2006). Dies wird darauf zurückgeführt, dass Methanobacteriales bislang deutlich häufiger als Methanomicrobiales im Rumen und Intestinaltrakt von Tieren, deren Gülle vergoren wird, nachgewiesen werden konnten (Peu et al. 2006; Wright et al. 2004). Dabei wurden in mesophilen Biogasanlagen innerhalb der Ordnung Methanobacteriales vor allem Spezies der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanogenium*, *Methanosphaera* und *Methanobrevibacter* identifiziert (Stantscheff et al. 2014; Zhu et al. 2011; Klocke et al. 2008).

Eine Hemmung der Archaeen durch sulfatreduzierende Bakterien, welche aufgrund ihrer höheren Affinität zu Acetat, CO_2 und Formiat bereits häufig als Konkurrenten für methanogene Archaeen in Süßgewässern, Seesedimenten und Laborfermentern beschrieben wurden (Moestedt et al. 2013; Rabus et al. 2013; Dar et al. 2008; Lovley und Klug 1983; Lovley et al. 1982), konnte im Rahmen der Langzeituntersuchung nicht festgestellt werden. Stattdessen verliefen die Zellzahlen methanogener Archaeen und sulfatreduzierender Bakterien während des gesamten Zeitraumes nahezu konstant, wobei insbesondere bei einem hohen Titer hydrogenotropher Archaeen sowie einem geringen H_2 -Partialdruck eine Zunahme der sulfatreduzierenden Spezies zu messen war, sodass von keiner Konkurrenz ausgegangen werden konnte. Dies könnte zudem auch an dem durchgehend über drei Zehnerpotenzen höheren Zelltiter hydrogenotropher Archaeen gelegen haben, weshalb diese quantitativ den sulfatreduzierenden Bakterien im Reaktor deutlich überlegen sind. Ferner können sulfatreduzierende Bakterien wie auch hydrogenotrophe methanogene Archaeen von einem Interspezies- H^+ - bzw. e^- Transfer in Gemeinschaften mit syntrophen, acetogenen Bakterien profitieren. Allerdings zeigten die Zu- und Abnahmen der Zelltiter sulfatreduzierender bzw. propionatabbauender Bakterien einen durchgehend gegensätzlichen Trend, sodass die Symbiose zwischen acetogenen und H_2 -akzeptierenden Spezies nur einen geringen Anteil des Bedarfs an H^+ bzw. e^- der hydrogenotrophen Archaeen und sulfatreduzierenden Spezies abzudecken scheint.

Insgesamt stellt die Mikrobiologie in einer Biogasanlage ein weitaus dynamischeres System dar, als zunächst angenommen. Dabei konnte mithilfe des überarbeiteten qPCR-Analyseverfahrens gezeigt werden, dass sich die mikrobielle Zusammensetzung bereits innerhalb einer Woche signifikant verändern kann. Die Höhe der Raumbelastung sowie der Anteil der eingebrachten Substrate (Rindergülle, Maissilage) scheint hierbei maßgeblich die mikrobielle Population zu bestimmen. Dies zeigt auch, dass eine einmalige Analyse der Reaktormikrobiota nur bedingt für die Interpretation der mikrobiellen Prozesse und Fermenterperformance hinzugezogen werden kann. Um dies zu verdeutlichen, kann auf die Laboruntersuchungen des Gärsubstrates an Tag 10 und Tag 80 verwiesen werden, welche einen nahezu identischen pH-Wert, Trockenmasseanteil und eine ähnliche Säurekonzentration in den Proben, jedoch eine völlig unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung aufzeigen. Infolgedessen sind weitere Langzeituntersuchungen an Bioreaktoren erforderlich, um die komplexen Stoffwechselflüsse und Interaktionen verstehen zu können.

4.2 Methylotrophe Stoffwechselwege im Reaktor

Den methylotrophen Archaeen und Bakterien, welche reduzierte C1-Verbindungen wie Methanol und CH_4 verwerten können, galt in bisherigen Untersuchungen der Stoffwechselwege in Biogasanlagen nur wenig Interesse. Während Methanol, ähnlich dem Formiat, im Gärsubstrat kaum nachgewiesen werden kann und aus diesem Grund meist als ein unbedeutendes Substrat im Biogasprozess eingestuft wird, galt eine Methanoxidation bislang aufgrund der geringen O_2 -Konzentrationen in Biogasanlagen als ausge-

schlossen. Mithilfe von molekularbiologischen Methoden sowie der Isolierung und Charakterisierung verschiedener bakterieller und methanogener Spezies konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere Erkenntnisse um die komplexen mikrobiellen Interaktionen innerhalb der methylo trophen Stoffwechselwege gewonnen werden.

Mit Blick auf den hohen Zelltitel der größtenteils methanolverwertenden Familie Methanosarcinaceae im Reaktor, der Isolierbarkeit dreier methylo tropher Bakterien aus unterschiedlichen phylogenetischen Familien (Peptococcaceae, Clostridiaceae und Thermoanaerobacteriaceae) sowie den hohen CH₄-Bildungsraten, die in Reaktoranreicherungen und in Anzuchten des Isolats *Methanosarcina mazei* Msc1 bei Angebot der C-Quelle Methanol gemessen werden konnten, wurde die Möglichkeit dieses methylo trophen Stoffwechselweges in Biogasanlagen tiefergehender untersucht. Dabei liefert die methylo trophische Methanogenese mit ΔG^0 zwischen -104,9 und -112,5 kJ / mol (Garcia et al. 2000) nahezu den gleichen Energieertrag wie die hydrogenotrophe Methanogenese. Zudem wurden bislang in vielen Untersuchungen der Reaktormikrobiota hohe Zelltitel der Gattung Methanosarcina identifiziert, welche zahlreiche methylo trophische Arten beinhaltet (Stantscheff et al. 2014; Ma et al. 2013; Nettmann et al. 2010; Sawayama et al. 2006). Insofern wurde im Rahmen dieser Arbeit vermutet, dass Methanol als kurzfristiges, schnelles Metabolit mit kurzer Verweilzeit in Biogasanlagen eine Relevanz haben könnte.

In der Natur entsteht Methanol überwiegend während des Abbaus der pflanzlichen Gerüstsubstanz Pektin (Schink und Zeikus 1980). Dabei wird Methanol meist durch die Aktivität der Pektin-Methylesterase freigesetzt, einem Enzym, das sowohl von vielen Geweben der pflanzlichen Zellwand selbst als auch von einer Vielzahl an Pilzen und Bakterien exprimiert wird und die Spaltung der Methylester an der Polygalacturonsäurekette des Pektins katalysiert (Micheli 2001; Siragusa et al. 1988; Schink und Zeikus 1980; Rexova-Benkova und Markovic 1976). In verholzten Pflanzen variiert der Anteil von Pektin zwischen 1 - 4 % (Palmisano und Barlaz 1996), Zuckerrüben, deren Einsatz als alternative Energiepflanze neben Mais in den letzten Jahren deutlich zunahm, können aus bis zu 20 % Pektin bestehen (Ollivier und Garcia 1990). Dabei erfordert der Abbau dieser Gerüstsubstanz aufgrund dessen komplexer, polymerer Struktur den Einsatz zahlreicher Lyasen und Hydrolasen wie Esterasen und Glucosidasen (Palmisano und Barlaz 1996; Wojciechowicz und Tomerska 1971), deren Aktivität bereits bei vielen Darm-Bakterien wie *Lachnospira multiparus* (Duskova und Marounek 2001; Szymański 1981), *Bacteroides caccae* (Sirotek et al. 2004), *Bifidobacterium pseudolongum* (Slovakova et al. 2002), *Clostridium thermocellum* (Slovakova et al. 2002; Ollivier und Garcia 1990; Spinnler et al. 1986) oder *Clostridium butyricum* (Schink und Zeikus 1980) beschrieben wurde. Eines der Fermentationsprodukte des Pektinabbaus ist dabei meist Methanol, dessen weitere Reduktion zu CH₄ bereits in Kokulturen aus pektinolytischen Bakterien und methylo trophen methanogenen Archaeen nachgewiesen werden konnte (Ollivier und Garcia 1990). Da die meisten Biogasanlagen mit Rinder-, Schweine- und Putenmist gefüttert werden, ist es denkbar, dass viele dieser pektinolytischen Species in den Reaktor gelangen und dort die Freisetzung von Methanol ermöglichen können. Das im Rahmen dieser Arbeit gewonnene, pektino-

lytische Isolat StrepBov1, welches mit 99 % genetischer Identität der *Streptococcus bovis* Gruppe (Habib et al. 2009) zuzuordnen ist, zeigte hohe Wachstumsraten bei Angebot der C-Quelle Pektin und kann, wie anhand einer sensiblen gaschromatographischen Analyse festgestellt werden konnte, binnen weniger Stunden sämtliche an die Polygalacturonsäureketten veresterten Methoxygruppen hydrolysieren. Spezies aus der *Streptococcus bovis* Gruppe wurden unter anderem bereits im Magen- und Darmtrakt von Rindern, Schafen, Schweinen, Pferden, Kamelen und Hirschen nachgewiesen, wobei sie über ein sehr breites Substratspektrum verfügen und häufig aufgrund ihrer Bildung von Laktat, Acetat und Formiat als eine der Hauptverursacher der fermentativen Acidose im Gastrointestinaltrakt beschrieben werden (Ghali et al. 2004; Sirotek et al. 2004; Griswold et al. 1999; Russell und Robinson 1984). Dabei zeigte sich, dass eine gemeinsame Kultivierung von StrepBov1 mit dem zu 100 % mit *Methanosarcina mazei* übereinstimmenden Isolat Msc1 aufgrund der Stoffwechselprodukte aus dem Pektinabbau möglich ist, da neben der Entstehung von Methanol auch die Bildung von weiteren methanogenen Substrate wie Acetat, H₂ und CO₂ festgestellt werden konnte. Dies bestätigt zunächst die Annahme, dass im Reaktor über den mikrobiellen Abbau von Pektin Methanol gebildet werden kann, sodass grundsätzlich eine methylotrophe Methanogenese in Biogasanlage möglich erscheint.

Methanol kann jedoch auch von zahlreichen homoacetogenen (Zandvoort et al. 2003; Balk et al. 2002; van der Meijden et al. 1984; Datta und Ogeltree 1983; Zeikus et al. 1980) sowie sulfatreduzierenden (Plugge et al. 2011; Davidova und Stams 1996; Nanninga 1986) und methanotrophen Bakterien (Garrity et al. 2007) als C-Quelle genutzt werden. Dass eine bakterielle Fermentation von Methanol in Abwasser- und Klärschlammreaktoren sowie in Anreicherungen erfolgen kann, wurde bislang zwar in einigen Studien festgestellt, jedoch nie in NawaRo-Biogasanlagen untersucht (Paulo et al. 2003; Zandvoort et al. 2003; Paulo 2002; Florencio et al. 1994; Florencio et al. 1995; Lettinga et al. 1979). Dabei besteht industriell ein großes Interesse, Methanol, welches beispielsweise in den Abwässern der Zellstoff- und Papierindustrie sowie während der Formaldehydherstellung zu großen Mengen anfällt, aufgrund seiner Toxizität zu entsorgen (Paulo et al. 2003; Paulo 2002; Lettinga et al. 1981; Lettinga et al. 1979). Eine Einleitung dieser mit Methanol hochkonzentrierten Abwässer in Biogasanlagen wäre daher eine nachhaltige Möglichkeit der Abwasserentsorgung und Energiegewinnung. Unklar ist bislang, ob und in welchem Anteil Methanol direkt zu CH₄ reduziert, oder aufgrund bakterieller Reaktionen zunächst zu Acetat, H₂ und CO₂ umgesetzt wird.

Mit dem Isolat ButMet1, welches genetisch zu 100 % mit dem von (Zeikus et al. 1980) aus Klärschlamm isolierten *Butyribacterium methylotrophicum* Stamm Marburg (DSM 3468) übereinstimmt, wurde ein homoacetogenes, methylotrophes Bakterium aus dem Forschungsreaktor isoliert. Dieses wies bei Wachstum mit der C-Quelle Methanol eine Bildung von Buttersäure, Acetat sowie H₂ und CO₂ auf und setzte sich in Mischkulturen bei einer Methanolkonzentration von 4 g / l gegenüber *Methanosarcina mazei* Msc1 durch. Da in den Kokulturen kein Acetat nachgewiesen werden konnte, wurde vermutet, dass *Methanosarcina mazei* Msc1 weitestgehend einen acetoklastischen Stoffwechsel durchgeführt ha-

ben muss. Dagegen konnte in den parallelen Reinkulturanzuchten des methanogenen Isolates auf Methanol eine signifikant höhere CH_4 -Bildung nachgewiesen werden, sodass eine Konkurrenz um Methanol zwischen homoacetogenen Bakterien und methylotrophen Archaeen vermutet werden konnte. Paulo et al. 2003 stellten in diesem Zusammenhang bei Untersuchungen eines Konsortiums aus methylotrophen Spezies in einem mit Methanol befütterten Reaktor fest, dass nur rund 50 % des CH_4 aus der methylotrophen Methanogenese stammt, während das übrige CH_4 aus Acetat und H_2 / CO_2 , welche von methylotrophen, homoacetogenen Bakterien gebildet wurden, herrührte. Eine hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogenese, welche an den Abbau von Methanol seitens homoacetogener Bakterien gekoppelt ist, scheint dabei bei sehr wahrscheinlich zu sein (Fukuzaki und Nishio 1997).

Allerdings zeigen weitere Studien, dass die Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren wie CO_2 und Bicarbonat, Acetat und Formiat sowie die Konzentration von Methanol für ein Wachstum methylotropher, homoacetogener Bakterien wie *Butyribacterium methylotrophicum* entscheidend ist (Florencio et al. 1995; Kerby und Zeikus 1987; Heijthuijsen und Hansen 1986; Lynd und Zeikus 1983). Zudem ist die Konzentration von Cobalt und H_2 als limitierender Faktor beschrieben (Paulo 2002; Florencio et al. 1994). Im Vergleich zu homoacetogenen Spezies weisen methylotrophe Archaeen eine um rund 60-fach erhöhte Affinität zu Methanol auf, weshalb die direkte methylotrophe CH_4 -Bildung insbesondere bei geringen Methankonzentrationen oder verminderter Bicarbonatmenge aufzutreten scheint (Florencio et al. 1994). Darüber hinaus konnte anhand der Isotopenverhältnisse in Anzuchten von *Methanosarcina mazei* Msc1 bei parallelem Angebot der C-Quellen (^{13}C -markiertes) Methanol, Acetat, H_2 / CO_2 im Nährmedium gezeigt werden, dass das Isolat trotz Verfügbarkeit mehrerer Substrate bevorzugt Methanol umsetzt. In Biogasanlagen könnten methylotrophe Archaeen daher gegenüber methanolverwertenden, homoacetogenen Bakterien im Vorteil sein.

Dementgegen könnten sulfatreduzierende Bakterien einen verstärkten Einfluss auf den Abbau von Methanol in einem Bioreaktor haben. So wurde mit *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 ein Isolat erhalten, welches auf den methanogenen Substraten Methanol, H_2 / CO_2 , Formiat und Acetat kultiviert werden konnte. Dabei werden sulfatreduzierende Bakterien häufig als Konkurrenten gegenüber methanogenen Archaeen beschrieben, da sie neben höheren Wachstumsraten auch eine aufgrund ihres effizienteren Elektronenakzeptors SO_4^{2-} erhöhte Substrataffinitäten aufweisen (Plugge et al. 2011; Dar et al. 2008; Lovley und Klug 1983). Ein Interspecies-Elektronentransfer zwischen *Butyribacterium methylotrophicum* zu *Desulfovibrio vulgaris* sowie zu *Methanobrevibacter arboriphilus* wurde bereits in Mischkulturen unter selektivem Angebot von Methanol nachgewiesen, wobei sich die sulfatreduzierenden Species gegenüber der methanogenen Kultur zunehmend durchgesetzt hatten (Heijthuijsen und Hansen 1986). Davidova und Stams 1996 kultivierten eine Anreicherungskultur aus einem Laborreaktor auf Methanol und wiesen dabei nach, dass sulfatreduzierende Bakterien sämtliches H_2 , CO_2 und Acetat, welches die homoacetogenen Bakterien während des Abbaus von Methanol produzierten, abbauten, sodass keine Bildung von CH_4 möglich war. In beiden Studien konnte jedoch kein sulfatreduzierendes Bakterium

identifiziert und angereichert werden, welches alleine auf Methanol wuchs. Das Isolat DesRum1 zeigte hingegen gutes Wachstum bei Angebot dieser C-Quelle, wobei dennoch davon ausgegangen werden kann, dass nur ein Teil der sulfatreduzierenden Spezies im Bioreaktor zu einem Wachstum auf Methanol fähig sind. Zudem konnte im Rahmen der qPCR-Analysen ein wesentlich höherer Titer an Archaeen sowie ein nahezu paralleler Verlauf der Zellzahlen methanogener und sulfatreduzierender Spezies detektiert werden, sodass keine signifikante, kompetitive Hemmung zwischen den beiden Gruppen vermutet werden konnte.

Mit dem Isolat TepAc1, welches eine zu 99 % genetische Übereinstimmung zu *Tepidanaerobacter acetatoxydans* Stamm Re1^T DSM21804^T aufwies (Westerholm et al. 2011), wurde eine dritte Gruppe methanolverwertender Bakterien im Reaktor gefunden. Als syntroph acetatoxidierendes Bakterium gelang es, TepAc1 in Kokultur mit *Methanobacterium formicicum* Isolat Mbf1 auf Acetat zu kultivieren, wobei in Reinkultur zudem auch ein Wachstum auf H₂ / CO₂ sowie Methanol festgestellt werden konnte. Die Relevanz syntroph acetatoxidierender Bakterien im Zusammenhang mit dem mikrobiellen Abbau von Methanol wurde bislang noch nicht beschrieben, könnte aber insbesondere bei hohen Methanol- bzw. Acetatkonzentrationen eine große Rolle spielen.

Die Vermutungen bezüglich der Substratflüsse um die Fermentation von Methanol in Biogasanlagen wurden zudem durch die Isotopenverhältnisse in den Reaktoraneicherungen auf der C-Quelle Methanol bestätigt. Während in der Reinkultur des Isolates *Methanosarcina mazei* Msc1 stark diskriminierte $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werte um -99 ‰ gemessen werden konnten, zeigten die mit Reaktorsubstrat beimpften Ansätze zunächst die von der acetoklastischen Methanogenese bekannten angereicherteren C-Isotopenverhältnisse um -40 ‰ im CH₄. Erst mit abnehmender Methanolkonzentration in der Anreicherung näherte sich die Isotopensignatur den in Reinkulturexperimenten identifizierten $\delta^{13}\text{C}$ (CH₄)-Werten der hydrogenotrophen und schließlich methylotrophen Methanogenese. Offenbar konnten sich im Experiment die methylotrophen Archaeen nur bei niedrigen Methanolkonzentrationen gegenüber den methylotrophen Bakterien durchsetzen (Fukuzaki und Nishio 1997; Florencio et al. 1994; Heijthuijsen und Hansen 1986), sodass erst gegen Versuchsende eine zunehmend stärkere C-Isotopenfraktionierung im CH₄ ermittelt werden konnte. Dies bekräftigt die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass zunächst bei hohen Methanolkonzentrationen ein größtenteils bakterieller Abbau von Methanol zu Acetat, H₂ und CO₂ erfolgt, wobei diese Substrate, wiederum in Konkurrenz mit sulfatreduzierenden und syntrophen Bakterien, erst in einem zweiten Schritt von acetoklastischen und hydrogenotrophen methanogenen Archaeen zu CH₄ reduziert werden (Zandvoort et al. 2003; Le Mer und Roger 2001; Davidova und Stams 1996; Florencio et al. 1995). In welchem Anteil die einzelnen mikrobiellen Reaktion erfolgen, kann dabei je nach Konzentration von SO₄²⁻, H₂, Bicarbonat, Methanol, Acetat sowie Spurenelementen variieren und ist dabei insbesondere von der Art der eingesetzten Gärsubstrate bedingt.

Eine besondere Form der Methylotrophie ist die Oxidation von CH₄, welches die maximal reduzierte Form einfacher Kohlenwasserstoff-Verbindungen darstellt. Methanoxidation wurde bereits im Grund-

wasser (Cheng et al. 1999), in Torfmooren (McDonald und Murrell 1997), (kontaminierten) Böden und Sedimenten (McDonald et al. 2006; Kolb et al. 2003; Le Mer und Roger 2001), Flussmündungen (McDonald et al. 2005) sowie in Termitendärmen (Reuß 2015b), Schweinemist (Nielsen et al. 2013), Reisfeldern (van Bodegom et al. 2001; Conrad und Rothfuss 1991) und im Meer beobachtet (Ward et al. 1987). Hingegen wurde ein Vorkommen methanotropher Bakterien trotz des enormen Vorkommens von CH_4 ($> 50\%$) in Biogasanlagen bislang nicht nachgewiesen. Dies könnte daran liegen, dass aufgrund der für methanogene Archaeen erforderlichen, geringen Konzentration von O_2 , welches hingegen für den ersten Oxidationsschritt von CH_4 zu Methanol durch die Methan-Monooxygenase erforderlich ist (Basch et al. 1999), ein Ablauf dieser Reaktion ausgeschlossen wurde. Zudem kann freies NH_3 , welches ebenfalls von der Methan-Monooxygenase hydroxyliert wird, das Wachstum methanoxidierender Bakterien hemmen (Nielsen et al. 2013; Conrad und Rothfuss 1991), sodass insbesondere in durch Abwasser- oder Putenmist mit $\text{NH}_4\text{-N}$ hochbelasteten Anlagen eine Methanoxidation ausgeschlossen erscheint.

Mit einem Fokus auf methylotrrophe C-Flüsse wurde dennoch ein Vorkommen methanoxidierende Bakterien in Biogasanlagen untersucht. Durch die Verwendung spezifischer Primer (Cheng et al. 1999), welche an die für methanotrophe Bakterien spezifischen Gensequenz der *pmoA* bindenden können, gelang es, in den neun Reaktorproben aus dem 70-tägigen Beprobungszeitraum ein Titer von $6,9 \times 10^4$ bis $4,0 \times 10^5$ Zellen / ml festzustellen. Damit lägen in Biogasanlagen nahezu ähnliche Zellzahlen methanoxidierender Bakterien wie in Böden (Kolb et al. 2003) und in zu fast zwei Zehnerpotenzen höherer Menge als in Termitendärmen vor (Reuß 2015). Offenbar ermöglicht die in der FBGA durchschnittlich gemessene O_2 -Konzentration von 0,16 %, dass methanoxidierende Bakterien in diesem Habitat wachsen können, wobei durch die regelmäßige Einbringung von Gärsubstrat eine weitere, kurzzeitige und lokale Zufuhr von O_2 stattgefunden haben kann. Darüber hinaus scheinen sich die Spezies aufgrund ihrer hohen Affinität für O_2 gegenüber den vielen fakultativ anaeroben Bakterien in der Konkurrenz um O_2 im Reaktor durchsetzen zu können. So wurde in Reisfeldern bereits beobachtet, dass methanotrophe Bakterien erst unterhalb einer O_2 -Konzentration von $5 \mu\text{M}$ gegenüber heterotrophen Spezies überlegen waren (van Bodegom et al. 2001). Viele methanoxidierende Bakterien sind zudem zu einer Oxidation von Methanol fähig (Garrity et al. 2007), wobei sie auf die Verfügbarkeit von O_2 nicht angewiesen sind. Denkbar ist daher, dass methanotrophe Bakterien ebenfalls eine Rolle im anaeroben Abbau von Methanol in Biogasanlagen spielen könnten, wobei sie weiteres CO_2 für eine anschließende hydrogenotrophe Methanogenese bilden würden. Demnach wäre es möglich, dass die methanotrophen Spezies im Reaktor gar nicht methanoxidierend, sondern methanolverwertend agieren.

Die zur weiteren Identifizierung der methanotrophen Reaktormikrobiota durchgeführte ARDRA mit einem *pmoA* Genfragment zeigte mindestens 13 verschiedene Restriktionsmuster innerhalb der 72 analysierten Klone, wobei nur sechs Sequenzen eine Identität $\geq 97\%$ zu einem bekannten methanotrophen Organismus zugeordnet werden konnte. Die Sequenzen aus fünf Klonen mit unterschiedlichem Restriktionsmuster konnten sogar nur zu 90 - 92 % Identität einer nächstverwandten Spezies zugewiesen wer-

den, sodass von einer Vielzahl bislang unbekannter, methanoxidierender Arten in Biogasanlagen ausgegangen werden kann. Eine weitere Erforschung sowie Isolierung dieser offenbar höchst effizienten, an die komplexen Verhältnisse in Bioreaktoren angepassten Spezies könnte daher auch biotechnologisch von großem Interesse sein.

Ein Vergleich mit den Gendatenbank des NCBI zeigte, dass sowohl Typ I methanotrophe γ -Proteobacteria, welche über den Ribulosemonophosphat- (RuMP-)Weg Formaldehyd fixieren als auch Typ II methanotrophe α -Proteobacteria, die eine Formaldehydfixierung über den Serin-Weg durchführen, in Biogasanlagen vorkommen. Beide Gruppen unterscheiden sich zudem in ihrer Affinität zu CH_4 , wobei beobachtet wurde, dass Typ I Methanotrophe den Spezies des Typs II bei hohen CH_4 -Konzentrationen überlegen sind (Graham et al. 1993) und darüber hinaus geringere O_2 -Mengen für die Oxidation von CH_4 zu Methanol erfordern (van Bodegom et al. 2001; Amaral und Knowles 1995). Dies erklärt möglicherweise auch die Dominanz von Typ I Methanotrophen im untersuchten Bioreaktor. Dabei konnten die meisten Klone der Gattung *Methylobacter* zugeordnet werden, welche obligat CH_4 als Energie- und C-Quelle nutzen.

Offenbar scheinen die Bedingungen in Biogasanlagen ähnlich den in aquatischen Habitaten zu sein. So konnte einer Klonsequenz eine 99 % Identität zu *Methylosinus trichosporium* Stamm KS18 zugeordnet werden, welcher im Jahre 2000 aus der oxischen Zone des Grundsediments im See Genzareth, Israel, isoliert wurde (Heyer et al. 2002). Ferner wurden zwei Klone mit einer 99 % Identität zu einem Isolat aus dem aus Flussmündungssediment der Bucht von Newport, CA, USA (McDonald et al. 2005), sowie ein weiterer Klon mit naher Verwandtschaft zu *Methylocaldum marinum*, der wiederum in marinen Sedimenten (Takeuchi et al. 2014) gefunden wurde, erhalten.

Da der Energiegehalt von Biogas mit steigender CH_4 -Konzentration zunimmt, erscheinen methanoxidierende Spezies in Biogasanlagen grundsätzlich unerwünscht. Inwieweit diese jedoch tatsächlich einen negativen Einfluss auf den CH_4 -Gehalt im Biogas haben, muss in künftigen Studien untersucht werden, wobei insbesondere das gezielte Einblasen von O_2 zur biologischen Entschwefelung in Bioreaktoren neu überdacht werden sollte.

4.3 $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) als ein neuer Monitoringparameter?

Mit dem Ziel, ein kontinuierliches Monitoring der Isotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) im Biogas als eine neue Möglichkeit der Prozessüberwachung von Biogasanlagen zu evaluieren, wurden neben einer mehrmonatigen Erprobung eines $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Spektrometers an einer FBGA zahlreiche mikrobiologische und molekularbiologische Versuche durchgeführt, um die an der Anlage ermittelten Isotopenverhältnisse interpretieren und dadurch Empfehlungen für die Praxis geben zu können. Hierzu wurde zunächst die spezifische Isotopensignatur der drei Methanogenesereaktionen (acetoklastisch, hydrogenotroph und methylotroph) anhand von methanogenen Reinkulturen bei Zugabe spezifischer C-Quellen untersucht.

Bewusst wurden dabei nur Spezies betrachtet, die aus der Biogasanlage isoliert worden waren, um möglichst prozessnahe Isotopensignaturen zu erhalten, die in einem nächsten Schritt zur Identifizierung der aktuell dominierenden Methanogenesewege im Reaktor hinzugezogen werden konnten.

4.3.1 Methanogene Reinkulturen zeigen stoffwechselspezifische $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte

Grundsätzlich ist die Untersuchung der methanogenen Kohlenstofffraktionierung ein hochkomplexes Gebiet. Aufgrund einer Vielzahl von Einflussfaktoren, wie der chemischen Zusammensetzung des Kulturmediums bzw. des untersuchten Habitats, der Phylogenie und der Wachstumsphase der betrachteten Spezies, dem Zelltiter sowie der Substratkonzentration gestaltet sich das Vergleichen und Übertragen von $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werten aus der Literatur als sehr schwierig (Goevert und Conrad 2009; Conrad 2005; Whiticar 1999). So untersuchten Londry et al. 2008 beispielsweise die Fraktionierung von *Methanosarcina barkeri* bei Angebot der C-Quellen H_2 / CO_2 , Acetat oder Methanol, wobei sie die jeweiligen Substrate entweder im Überschuss, oder begrenzt im Nährmedium eingesetzt hatten. Dabei konnten die Forscher in Abhängigkeit der Substratkonzentration und der Dauer der Kultivierung Schwankungen in den Isotopenverhältnissen $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) von bis zu 50 ‰ messen. Hinzu kommt, dass viele Spezies eine veränderte Isotopensignatur aufweisen können, wenn sie in Kokultur mit einer weiteren Art kultiviert werden. Dies wurde unter anderem in Mischkulturen aus H_2 -bildenden Bakterien und hydrogenotrophen methanogenen Archaeen beobachtet, wobei im CH_4 der Mischkulturansätze eine stärkere Kohlenstofffraktionierung als in den parallelen Reinkulturansätzen festgestellt werden konnte (Hattori et al. 2012).

Vor allem für acetoklastisches und methylotrophes Wachstum finden sich in der Literatur nur wenige Studien über die Isotopenfraktionierung methanogener Archaea. Diese berufen sich in der Regel auf Untersuchungen an *Methanosarcina barkeri*, wobei selten übereinstimmende Isotopenverhältnisse gemessen wurden (Goevert und Conrad 2009). So wird in einer Untersuchung zur acetoklastischen Methanogenese von *Methanosarcina barkeri* ein durchschnittlicher $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Wert von etwa -56,5 ‰ beschrieben (Gelwicks et al. 1994), Londry et al. 2008 ermittelten hingegen einen $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Wert von -53,8 ‰ unter ausreichender Acetatversorgung, aber von -25,7 ‰ bei einer niedrigen Acetatkonzentration im Nährmedium. In einer dritten Studie wurden darüber hinaus $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte um -21,2 ‰ für selbigen Organismus detektiert (Krzycki et al. 1987). Auch über die Isotopenfraktionierung der Gattung *Methanosaeta* gibt es bislang nur wenige Untersuchungen, wobei für ihr acetoklastisches Wachstum meist ein geringerer Fraktionierungsfaktor als etwa für *Methanosarcina* beschrieben ist. Dies wird meist auf die unterschiedliche Enzymsausstattung der beiden Gattungen für die initiale Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA zurückgeführt (Penning et al. 2006; Valentine et al. 2004). Dieser Sachverhalt konnte bei den GC-C-IRMS Untersuchung der Biogasproben der beiden Isolate *Methanosarcina mazei* Msc1 und *Methanosaeta concilii* Mst1.3 nicht beobachtet werden, wobei beide Spezies eine einheitliche Fraktionierung mit $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) bei -42,1 ‰ aufwiesen.

Im Gegensatz zu den acetoklastischen methanogenen Archaeen diskriminieren hydrogenotrophe Methanbildner das stabile Kohlenstoffisotop etwas stärker, sodass für diese Spezies in der Regel leicht abgereichertere Isotopenverhältnisse im CH_4 auftreten (Laukenmann et al. 2010; Conrad 2005; Whiticar 1999; Balabane et al. 1987). Dies konnte auch für die beiden obligat hydrogenotrophen Spezies *Methanoculleus bourgensis* DSM 3045 sowie *Methanobacterium formicicum* Mbf1 beobachtet werden, wobei $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte zwischen -53 und -56 ‰ gemessen werden konnten. Damit scheint grundsätzlich eine Unterscheidung der beiden häufigsten methanogenen Stoffwechselwege, der acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogenese, anhand ihrer spezifischen Isotopensignatur möglich zu sein.

Für die methylotrophe Methanbildung wurde hingegen eine nochmals stärkere Isotopenfraktionierung identifiziert. Hierbei zeigte das Isolat *Methanosarcina mazei* Msc1 mit $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werten um -99‰ die deutlichste Diskriminierung des ^{13}C -Isotopes innerhalb der drei bekannten Methanogenesereaktionen. Auch Londry et al. 2008 wiesen für letztere Spezies bei einem unlimitiertem Angebot von Methanol ein Isotopenverhältnis $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) von -100 ‰ nach, während Penger et al. 2012 für Reinkulturen von *Methanosarcina acetivorans*, *Methanolobus zinderi* und *Methanosarcina barkeri* $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte zwischen -83‰ bis -72‰ feststellten.

In Hinblick auf die aus Biogasanlagen isolierten methanogenen Archaeen konnte demnach eine charakteristische Isotopensignatur für jeden Methanogeneseppfad festgestellt werden, anhand derer eine grundsätzliche Unterscheidung der Stoffwechselwege über die $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte möglich erscheint.

4.3.2 Komplexität der Isotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) der Reaktormikrobiota

Um die Übertragbarkeit der substratspezifischen Isotopenverhältnisse von Reinkulturen auf die Biogasanlage zu überprüfen, wurden parallel Nährmedien mit selektiver C-Quelle mit Reaktorsubstrat beimpft. Statt einer Reinkultur lag somit in den Batchansätzen theoretisch die gesamte Fermentermikrobiota vor. Dabei konnte zunächst bei einem Angebot von Acetat bzw. H_2 / CO_2 eine nahezu identische Isotopensignatur wie in den Reinkulturexperimenten gemessen werden, welche sich um mindestens 10 ‰ zwischen den beiden Stoffwechselwegen unterschied. Stand nur Acetat als C-Quelle zur Verfügung, konnte im weiteren zeitlichen Verlauf aufgrund einer zunehmenden Abreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ ein Einfluss von syntroph acetatoxidierenden Bakterien vermutet werden. Diese oxidieren Acetat in zwei CO_2 -Moleküle, welche wiederum von hydrogenotrophen methanogenen Archaeen reduziert werden können, sodass in der Folge eine Verschiebung der Isotopenverhältnisse in Richtung der Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese gemessen werden konnte. Die Reaktion kann beispielsweise durch *Tepidanaerobacter acetatoxidans* TepAc1 (Müller et al. 2015; Manzoor et al. 2013; Westerholm et al. 2011) durchgeführt werden, welches als syntroph acetatoxidierendes Bakterium aus der FBGA isoliert wurde. Die Vermutung einer syntrophen Acetatoxidation wird zudem durch die parallelen Ansätze mit Antibiotika und Acetat bestätigt, in denen nahezu konstante $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte, die mit den ermittelten Isotopenverhältnissen der acetoklastischen Methanogenese der Reinkulturexperimente übereinstimmen, nachgewiesen werden konnten. In diesen Ansätzen konnte offenbar aufgrund der Hemmung sämtlicher

Bakterien eine rein durch acetoklastische Archaeen vermittelte Isotopensignatur ausgebildet werden. Ähnliche, jedoch bislang nie mit Isolaten aus Biogasanlagen verglichene Veränderungen der Isotopenverhältnisse durch eine syntrophe Acetatoxidation wurden bereits auch in anderen Studien beobachtet (Lv et al. 2014; Polag et al. 2013; Hao et al. 2011; Laukenmann et al. 2010). Ohne einen methanogenen Partner kann Acetat zudem auch durch sulfatreduzierende Spezies wie dem Isolat *Desulfotomaculum ruminis* DesRum1 zu CO₂ oxidiert werden, wie im Rahmen der HPLC- und GC-Untersuchungen des Isolates gezeigt werden konnte (Plugge et al. 2011).

Hinzu kommt, dass H₂ offenbar einen großen Einfluss auf die Isotopenverhältnisse im Biogas zu haben scheint, wie in dieser Arbeit anhand von Rein- und Mischkulturversuchen unter Angebot von ¹⁻¹³C Acetat gezeigt werden konnte. Mit Blick auf die δ¹³C (CH₄)-Werte an Tag 2 und 4 in den Reaktoraneicherungen auf der C-Quelle Acetat (Abbildung 19) kann ein kurzfristiger Rückgang von ¹³CH₄ in den Ansätzen bemerkt werden, welcher von der Tendenz in Richtung der Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese verläuft. Da aufgrund des Inokulums mit Reaktorsubstrat noch geringfügige Anteile weiterer Substrate vorgelegen haben könnten, sind eine Bildung von H₂ und damit die Möglichkeit einer Reduktion des während der acetoklastischen Methanogenese freigewordenen CO₂ zu CH₄ seitens hydrogenotropher Archaeen denkbar. Wie anhand des Isolates *Methanosarcina mazei* Msc1 sowie in Kokulturen aus dem acetoklastischen Isolat *Methanosaeta concilii* Mst1.3 und den hydrogenotrophen Archaeen *Methanobacterium formicicum* Mbf1 bzw. *Methanoculleus bourgensis* DSM3045^T unter Zugabe von ¹⁻¹³C Acetat und H₂ gezeigt werden konnte, ist diese Kopplung von einer an die acetoklastische Methanbildung angeschlossenen, hydrogenotrophen Methanogenese möglich, sodass in der Folge neben einer doppelten CH₄-Ausbeute pro Molekül Acetat eine isotopische Mischsignatur der beiden Methanogenesepfade auftreten kann. Da zudem H₂ während einer Vielzahl bakterieller Reaktionen permanent im Reaktor gebildet wird, scheint aufgrund der zu diesem Gas hoch affinen, obligat hydrogenotrophen Archaeen ein im Vergleich zu acetoklastischen Reinkulturen geringfügig abgereicherteres Isotopenverhältnis in Biogasanlagen aufzutreten (Thauer et al. 2008). Grundsätzlich scheint die Konzentration an H₂ im Reaktor einen erheblichen Einfluss auf die Stöchiometrie von Stoffwechselreaktionen zu haben, infolgedessen weitere Folgereaktionen sowie Veränderungen in den Isotopenverhältnissen im CH₄ auftreten können. Dies konnte insbesondere während der hydrogenotrophen Methanogenese mit Formiat in Reinkulturen von *Methanobacterium formicicum* Mbf1 beobachtet werden. Anhand von ²H₂ in der Gasphase sowie ¹³C-markiertem Formiat konnte dabei isotopisch nachgewiesen werden, dass das Isolat externen H₂ zur Reduktion des während der Aktivität der Formiat Dehydrogenase entstandenen CO₂ einsetzen kann. Folglich kommt es zu einer Verdopplung der CH₄ Ausbeute pro Molekül Formiat, welche dem Organismus zusätzlich eine erhöhte Energieausbeute ermöglicht.

Zudem konnte ein bakterieller Einfluss auf die C-Isotopenverhältnisse von CH₄ bei Angebot von H₂ / CO₂ als selektive C-Quelle in den mit Reaktorsubstrat beimpften Anreicherungen beobachtet werden. Hierbei wurde ab Tag 4 eine Veränderung der δ¹³C (CH₄)-Werte in Richtung einer acetoklastischen

Isotopensignatur detektiert, welche möglicherweise auf eine zunehmende Anreicherung von homoacetogenen Bakterien wie *Butyribacterium methylotrophicum* ButMet1 zurückgeführt werden kann (Merlin Christy et al. 2014; Kerby und Zeikus 1987; Ljungdahl 1986). Diese könnten aufgrund der durchgehend hohen Verfügbarkeit von H_2 / CO_2 verstärkt Acetat und somit eine C-Quelle für acetoklastische Spezies wie *Methanosaeta* sp. oder *Methanosarcina* sp. gebildet haben, wodurch ein weiterer, die Isotopie beeinflussender, methanogener Reaktionsweg ermöglicht wurde (Ljungdahl 1986).

Die Untersuchung der Isotopenfraktionierung von Reaktorproben unter Angebot spezifischer C-Quellen zeigt daher, dass eine isolierte Betrachtung der $\delta^{13}C$ (CH_4)-Werte einer Reinkultur nur teilweise auf die im Fermenter messbaren Isotopenverhältnissen übertragbar ist. So wirken sich die vielfältigen mikrobiellen Interaktionen und Konkurrenzen weitaus mehr auf die Isotopensignatur aus, als zunächst angenommen. Hinzu kommt ein Einfluss von H_2 auf die Isotopenverhältnisse, wodurch bekannte Reaktionsbilanzen wie die der acetoklastischen Methanogenese verschoben werden können.

4.3.3 Eine Echtzeitanalytik von $\delta^{13}C$ (CH_4) ermöglicht Einblicke in den Fermentationsprozess

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde erstmalig ein Laser-Absorptionsspektrometer zur kontinuierlichen Langzeitmessung von $\delta^{13}C$ (CH_4) an einer großtechnischen Biogasanlage angewandt. In Begleitung einer nahezu täglichen Analyse der Gaszusammensetzung, des Säurespektrums, des pH-Wertes und des FOS / TAC-Verhältnisses und einer mehrwöchigen qPCR-Untersuchung der aktuellen Fermentermikrobiota konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Isotopenverhältnissen im Biogas und den aktuellen Prozessbedingungen festgestellt werden. Diese konnten anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Batchversuche mit Isolaten sowie Anreicherungskulturen interpretiert werden.

Wie erwartet, reagierte das Isotopenverhältnis $\delta^{13}C$ (CH_4) nahezu zeitgleich auf Veränderungen im anaeroben Fermentationsprozess. Dabei konnte aufgrund eines 20 s Messintervalls des Laser-Absorptionsspektrometers ein hochdynamischer Verlauf der $\delta^{13}C$ (CH_4)-Werte beobachtet werden, welcher einerseits maßgeblich von der täglichen Substratzufuhr beeinflusst scheint (Polag et al. 2013), aber auch auf langfristige Änderungen im Gärprozesse reagierte. Im Tagesverlauf konnte bei einmaliger Fütterung ein charakteristisches Schema detektiert werden, welches zunächst mit einem sprunghaften Rückgang des $^{13}CH_4$ -Anteils in den Stunden direkt nach der Fütterung begann. Anschließend folgte einer mehrstündigen Phase mit nahezu gleichbleibendem Isotopenverhältnis, eine kontinuierlichen Anreicherung des schweren C-Isotopes bis zum nächsten Fütterungsmoment. Dabei scheinen nach einer Substrateinbringung zunächst hydrolytische und acidogene Bakterien aktiv zu sein, welche die polymeren Verbindungen in flüchtige Fettsäuren spalten. Während dieser mikrobiellen Abbauprozesse werden darüber hinaus hohe Mengen an H_2 und CO_2 gebildet, welche direkt von hydrogenotrophen methanogenen Archaeen zu CH_4 reduziert werden können, während acetoklastische Archaeen erst nach einem weiteren bakteriellen Zwischenschritt, der Acetogenese, mit einer C-Quelle versorgt werden (Merlin

Christy et al. 2014; Demirel und Scherer 2008; Bischofsberger 2005). Nach der Fütterung des Reaktors ist somit zunächst ein rapider Trend der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte in Richtung der Isotopensignatur der hydrogenotrophen Methanogenese zu verzeichnen. Denkbar ist zudem, dass in den ersten Stunden partiell auch eine methylo trope Methanogenese erfolgen kann. Wie anhand des pektinolytischen Isolates *Streptococcus bovis* StrepBov1 gezeigt werden konnte, kann Methanol aus dem Abbau von Pektin binnen weniger Stunden freigesetzt werden, sodass in geringen Anteilen auch ein Auftreten der stark angereicherten Isotopensignatur der methylo trophen Methanogenese im CH_4 möglich ist. Dies könnte insbesondere in Biogasanlagen zu bemerken, die mit pektinreichen Substraten wie Zuckerrüben oder Trester betrieben werden. Da vermutlich nur sehr geringe Methanolkonzentrationen im Reaktor vorliegen, könnten methylo trope methanogene Archaeen aufgrund ihrer signifikant höheren Affinität zu Methanol gegenüber acetogenen Bakterien (Florencio et al. 1994) im Vorteil sein, sodass zudem die Isotopensignatur der methylo trophen Methanogenese detektiert werden würde. Mit fortschreitendem Abbaugrad nimmt die Menge kurzkettiger Fettsäuren zu, welche nun von acetogenen Bakterien zu Essigsäure umgesetzt werden können. Daraufhin erhöht sich auch die Aktivität acetoklastischer Archaeen, sodass bis zum nächsten Fütterungszeitpunkt eine zunehmend angereichertere Isotopensignatur gemessen werden kann.

Neben diesen kurzzeitigen Schwankungen von $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) im Reaktor konnten über den mehrmonatigen Versuchszeitraum auch Variationen im tagesdurchschnittlichen Isotopenverhältnis festgestellt werden, welche offenbar mit der Raumbelastung und der Säurekonzentration korrelierten. Dabei wurden die höchsten Biogasbildungsraten an Tagen mit einem angereicherteren Isotopenverhältnis erzielt. Wie zuvor bereits anhand der Isolate und Batchversuche mit Reaktorsubstrat festgestellt werden konnte, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Langzeitverläufen von $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) und der Zusammensetzung der mikrobiellen Population (Polag et al. 2013; Laukenmann et al. 2010; Conrad 2005). In diesem Kontext scheint der relative Anteil der Familie Methanosarcinaceae innerhalb der methanogenen Mikrobiota die stärkste Auswirkung auf das C-Isotopenverhältnis im CH_4 zu haben, sodass mit steigendem Titer von Methanosarcinales eine zunehmende Anreicherung von $^{13}\text{CH}_4$ im Biogas gemessen werden konnte. Obwohl die meisten Spezies der Familie Methanosarcinaceae auch hydrogenotroph über die Reduktion von CO_2 Energie gewinnen können, scheint in Bezug auf die $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte eine vorwiegend acetoklastische Methanogenese dieser Familie im Reaktor zu erfolgen. Dies könnte an der besseren Adaption obligat hydrogenotropher Archaeen (Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanococcales) an niedrige H_2 -Konzentrationen liegen (Thauer et al. 2008), aufgrund derer viele Spezies der Familie Methanosarcinaceae trotz geringerer Energieausbeute zu einem weitestgehend acetoklastischen Stoffwechsel gezwungen werden. Dementsprechend konnte ein erhöhter Zelltiter von Methanosarcinaceae oberhalb eines H_2 -Partialdruckes von 100 ppm nachgewiesen werden, sodass aufgrund einer verminderten Konkurrenz zu strikt hydrogenotropher Archaeen ein stärkeres Anwachsen der Familie Methanosarcinaceae erfolgen konnte. Im Gegensatz dazu wurde durch den geringen H_2 -Partialdruckes von 30 ppm zwischen Tag 66 und 80 eine Dominanz obligat hydrogenotropher methanogener Archaeen

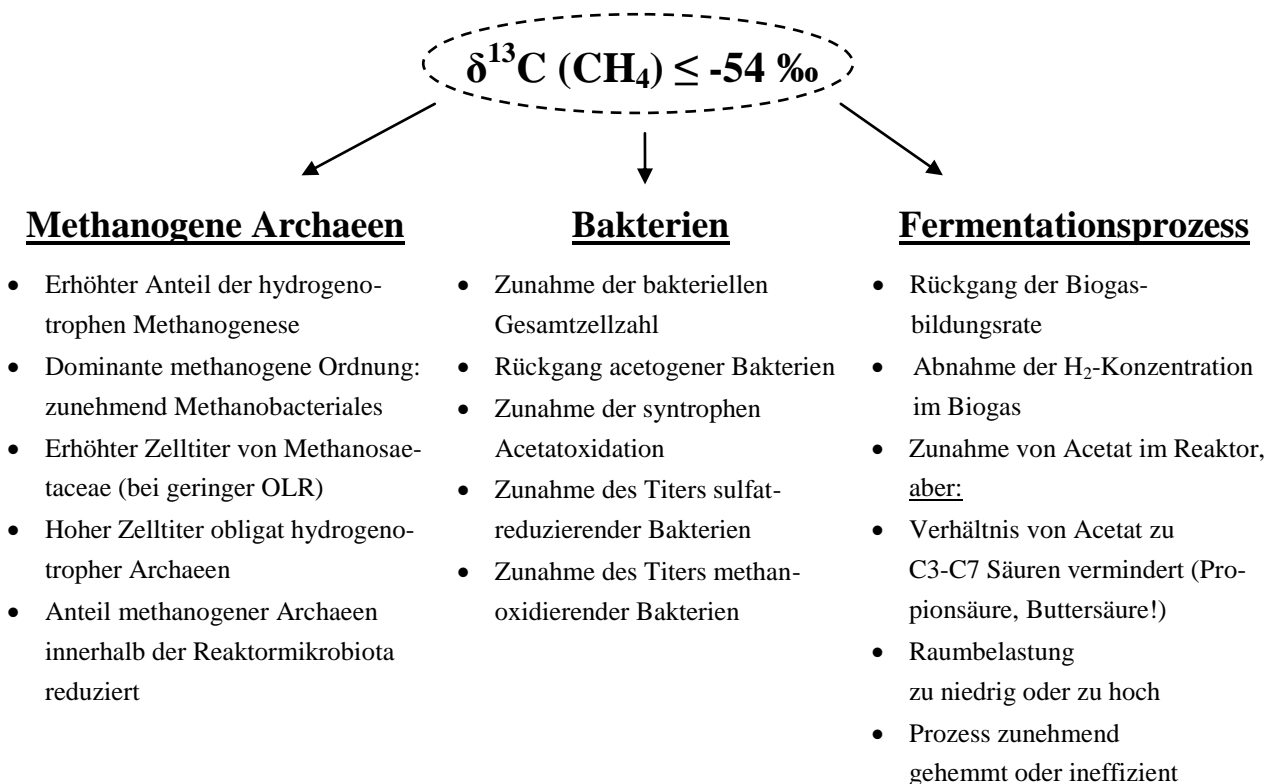
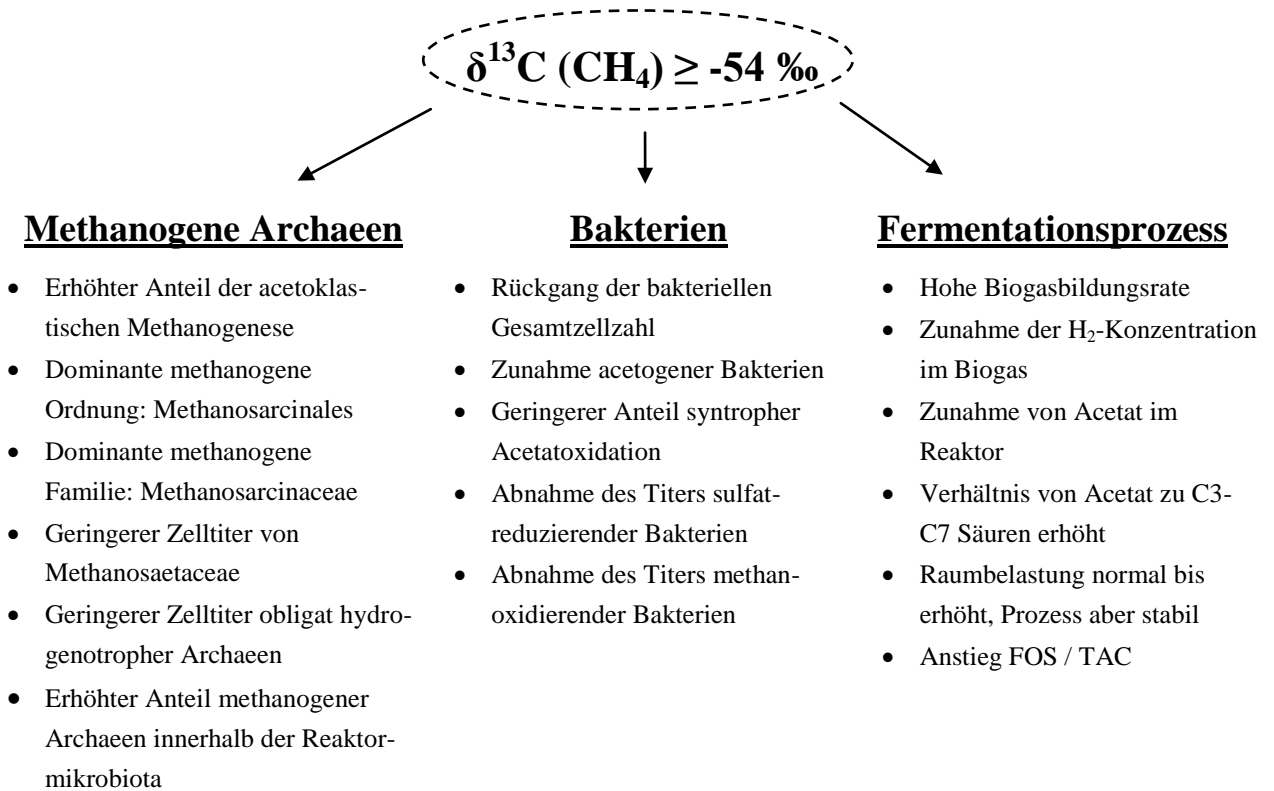
festgestellt, infolge derer zunehmend abgereichertere $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte auftraten. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Reinkulturen überein, in welchen für die Methanogenese aus H_2 / CO_2 ebenfalls eine stärkere Isotopenfraktionierung detektiert wurde.

Bei einer Fütterung von Biogasanlagen mit schnell vergärbaren Substraten kann es zu einer Anreicherung flüchtiger Fettsäuren kommen, wobei die Methanogenese häufig zur geschwindigkeitslimitierenden Reaktion werden kann (Merlin Christy et al. 2014; Bischofsberger 2005). Aufgrund einer im Vergleich zu *Methanosaeta* sp. verbesserten Anpassung von *Methanosarcina* sp. an hohe Acetatkonzentrationen sowie Schwankungen im pH-Wert (Shin et al. 2011; Klocke et al. 2008; Conklin et al. 2006; Karakashev et al. 2005) konnte die Familie Methanosarcinaceae insbesondere während leicht erhöhter Raumbelastungen nachgewiesen werden, sodass die Isotopensignatur einer vermehrt acetoklastischen Methanogenese gemessen wurde. Dogan et al. 2005 beobachteten oberhalb einer Acetatkonzentration von 3.000 mg / l eine zunehmende Hemmung von acetoklastischen Archaeen in Bioreaktoren. Darüber hinaus wird eine Anreicherung syntroph acetatoxidierender Bakterien bei erhöhten Acetatmengen beschrieben (Hao et al. 2011; Karakashev et al. 2006), infolge derer abgereichertere $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte auftraten (Lv et al. 2014; Polag et al. 2013; Hao et al. 2011; Laukenmann et al. 2010). Dieses Phänomen konnte auch während der letzten Überfütterungsphase (Tag 66 – 80), in der zeitweise eine Konzentration von über 6.000 mg / l Essigsäure im Reaktor erreicht wurde, beobachtet werden, wobei die Tendenz der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte klar in Richtung der Isotopenverhältnisse der hydrogenotrophen Methanogenese geht. Parallel dazu kam es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl an Bakterien sowie obligat hydrogenotropher methanogener Archaeen, sodass auch anhand der relativen Zusammensetzung der Mikrobiota auf einen erhöhten Anteil der syntrophen Acetatoxidation geschlossen werden kann. Diese würde zudem durch den niedrigen H_2 -Partialdruck von 30 ppm in diesem Zeitraum begünstigt werden.

Des Weiteren kann anhand der Zellzahl von propionsäureabbauenden Bakterien zudem eine Hemmung der Acetogenesestufe während starker Raumbelastungen vermutet werden. Dabei konnte ein erhöhtes Vorkommen propionsäureabbauender Bakterien während angereicherterer $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte identifiziert werden. Obgleich diese Spezies auf einen H_2 -Akzeptor wie hydrogenotrophe methanogene Archaeen oder sulfatreduzierende Bakterien angewiesen sind (Bagi et al. 2007; Bok et al. 2004; Imachi et al. 2000; Sekiguchi et al. 1998; Schmidt und Ahring 1995), wurde während der gesamten Versuchsperiode ein gegenläufiger Verlauf der Zellzahlen gemessen. Denkbar ist, dass der Interspecies- H_2 -Transfer vorwiegend zu Methanosarcinaceae erfolgt, da eine signifikante Korrelation zu den Zellzahlen dieser Familie festzustellen ist.

Dies zeigt, dass die Isotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4) im Biogas sowohl vielschichtige Auskünfte über den Fermentationsprozess als auch über die Zusammensetzung der Reaktormikrobiota geben können. So spiegelt die Isotopensignatur nicht nur die relative Zusammensetzung der methanogenen Population und den aktuell dominierenden Methanogeneseweg wider, sondern ermöglicht darüber hinaus auch Ein-

blicke in die bakterielle Reaktormikrobiota sowie den Anteil zahlreicher bakterieller Stoffwechselreaktionen, wie anhand der folgenden Schemata abschließend zusammengefasst werden soll. Dabei wurde ein Schwellenwert von $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_4)$ -54‰ definiert, welcher jedoch eher als ein dynamischer Bereich zu sehen ist:



5 Zusammenfassung

Der zunehmende Anteil von Strom aus erneuerbaren Energiequellen erfordert ein dynamisches Konzept, um Spitzenlastzeiten und Versorgungslücken aus der Wind- und Solarenergie ausgleichen zu können. Biogasanlagen können aufgrund ihrer hohen energetischen Verfügbarkeit und der Speicherbarkeit von Biogas eine flexible Energiebereitstellung ermöglichen und darüber hinaus über ein „Power-to-Gas“-Verfahren bei einem kurzzeitigen Überschuss von Strom eine Überlastung des Stromnetzes verhindern. Ein nachfrageorientierter Betrieb von Biogasanlagen stellt jedoch hohe Anforderungen an die Mikrobiologie im Reaktor, die sich an die häufig wechselnden Prozessbedingungen wie der Raumbelastung im Reaktor anpassen muss. Eine Überwachung des Fermentationsprozesses in Echtzeit ist daher unabdingbar, um Störungen in den mikrobiellen Gärungswegen frühzeitig erkennen und adäquat entgegenwirken zu können.

Bisherige mikrobielle Populationsanalysen beschränken sich auf aufwendige, molekularbiologische Untersuchungen des Gärsubstrates, deren Ergebnisse dem Betreiber daher nur zeitversetzt zur Verfügung stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein Laser-Absorptionsspektrometer zur kontinuierlichen Messung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse des Methans an einer Forschungsbiogasanlage erprobt. Dabei konnten, in Abhängigkeit der Raumbelastung und Prozessbedingungen variierende Isotopenverhältnisse gemessen werden. Anhand von Isolaten aus dem untersuchten Reaktor konnte zunächst gezeigt werden, dass für jeden Methanogeneseppfad (hydrogenotroph, acetoklastisch sowie methylotroph) eine charakteristische, natürliche Isotopensignatur im Biogas nachgewiesen werden kann, sodass eine Identifizierung der aktuell dominierenden methanogenen Reaktionen anhand der Isotopenverhältnisse im Biogas möglich ist.

Durch den Einsatz von ^{13}C - und ^2H -isotopenmarkierten Substraten in Rein- und Mischkulturen und Batchreaktoren, sowie HPLC- und GC-Untersuchungen der Stoffwechselprodukte konnten einige bislang unbekannte C-Flüsse in Bioreaktoren festgestellt werden, die sich wiederum auf die gemessenen Isotopenverhältnisse im Biogas auswirken können. So konnte die Entstehung von Methanol sowie dessen mikrobieller Abbauprodukte bis zur finalen CH_4 -Bildung anhand von fünf Isolaten erstmalig in einer landwirtschaftlichen Biogasanlage rekonstruiert und das Vorkommen methylotropher Methanogenesewege nachgewiesen werden. Mithilfe molekularbiologischer Methoden wurden darüber hinaus methanoxidierende Bakterien zahlreicher, unbekannter Arten im Reaktor detektiert, deren Vorkommen aufgrund des geringen O_2 -Gehaltes in Biogasanlagen bislang nicht erwartet wurde.

Durch die Konstruktion eines synthetischen DNA-Stranges mit den Bindesequenzen für elf spezifische Primerpaare konnte eine neue Methode etabliert werden, anhand derer eine Vielzahl mikrobieller Zielorganismen durch die Verwendung eines einheitlichen Kopienstandards in einer real-time PCR quantifiziert werden können. Eine über 70 Tage durchgeführte, wöchentliche qPCR-Analyse von Fermenterproben zeigte, dass die Isotopenverhältnisse im Biogas signifikant von der Zusammensetzung der Reak-

tormikrobiota beeinflusst sind. Neben den aktuell dominierenden Methanogenesewegen war es auch möglich, einige bakterielle Reaktionen wie eine syntrophe Acetatoxidation, Acetogenese oder Sulfatreduktion anhand der $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-Werte zu identifizieren, sodass das hohe Potential einer kontinuierlichen Isotopenmessung zur Prozessanalytik in Biogasanlagen aufgezeigt werden konnte.

Summary

Due to the arising demand for a sustainable energy supply, a dynamic approach is necessary to equalize peak load times as well as supply gaps of wind power plants and solar systems. In this connection, biogas plants feature a highly operational energetic availability and a maximum of flexibility because of the good storage properties of biogas. In addition, using the power-to-gas technique, short-time overloads of the electricity grid can be balanced by converting electricity to storable methane. However, a demand-driven operation of biogas plants makes high demands on the microbiology since the organisms need to adapt to frequently changing process conditions such as the organic loading rate. To obtain a timely recognition of disturbances within microbial fermentation pathways, a real-time monitoring of the digesters state is indispensable to ensure a timely response.

So far, microbial community analyses of anaerobic digesters were restricted to time-consuming laboratory investigations whose results can only be available time-delayed. In this study, for the first time a laser absorption spectroscopy was applied for continuous monitoring of carbon isotopic ratios of CH_4 of a full-scale anaerobic digester. As a result, varying $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-values has been measured depending on the organic loading rate and the process conditions. Analyzing the natural isotopic fractionation of methanogenic pure culture isolates obtained from the reactor, a specific isotopic signature has been detected for each methanogenic pathway (hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic). As a result, isotopic analyses of the biogas may provide a real-time identification of the actual predominant methanogenic processes within the bioreactor.

Using ^{13}C and ^2H isotopically labeled substrates in pure or mixed cultures and batch reactors in combination with chromatographic determinations (HPLC, GC) of the metabolic products, many previously unknown carbon flows affecting the isotopic ratio could be determined. For instance, microbial formation and degradation of methanol up to the final release of CH_4 have been proven within a biogas plant fed with renewable resources for the first time. Here, methylotrophic pathways could be reconstructed on the basis of five microbial isolates. Furthermore, CH_4 oxidizing bacteria of previously undescribed species have been found by the application of molecular biological methods. Right now, the occurrence of these bacteria had not been assumed due to the low concentrations of O_2 within the reactor.

By constructing a synthetic DNA strain containing primer binding sites for eleven microbial targets representing important groups within the fermentation process, a novel technique has been established allowing the usage of a uniform copy number standard for real-time PCR analyses. During a range of 70 days, reactor samples have been withdrawn in weekly intervals to gain an insight into the microbiota. The qPCR analyses revealed that the isotopic signature is highly affected by the composition of the microbial population. Besides the detection of the predominant methanogenic pathways, it was possible to identify many bacterial reactions such as syntrophic acetate oxidation, acetogenesis and sulfate reduction on the basis of the $\delta^{13}\text{C}$ (CH_4)-values. As a consequence, it has been shown that a continuous measurement of the carbon isotopic ratio of the biogas in combination with the knowledge of the microbiota has great potential for the application as a novel process monitoring option for biogas plants.

6 Ausblick

Aufgrund erhöhter Anforderungen an den Betrieb von Biogasanlagen zur Gewährleistung einer nachfrageorientierten Stromproduktion wird der Bedarf an einer verlässlichen Prozessmesstechnik in Bioreaktoren deutlich ansteigen, wobei um mehrere Tage versetzte Laboranalysen nicht mehr als adäquates Kontrollinstrument eingesetzt werden können. Insbesondere das langfristig angestrebte Konzept, vermehrt organische Reststoffe wie Grünschnitt, Speiseabfälle und Abwässer zu vergären, erfordert aufgrund der komplexen und variierenden Einsatzstoffe vermehrt mikrobiologisches Wissen um vorherrschende Stoffwechselprozesse und Organismen. Da die C-Isotopenverhältnisse im CH_4 nicht nur auf klassische Prozessparameter wie die Raumbelastung oder das Säurespektrum, sondern vor allem auch sehr sensibel auf Veränderungen in den mikrobiellen Reaktionswegen und Populationen reagieren, ist der Einsatz eines Laser-Absorptionsspektrometers zur kontinuierlichen Überwachung der Isotopenverhältnisse im Biogas ein vielversprechendes Verfahren, künftig einen Fermentationsprozess in Echtzeit zu überwachen. Ein großer Vorteil ist, dass das Spektrometer in der Gasphase misst und somit einfach an einer Biogasleitung integriert werden kann. Dadurch entfallen regelmäßige, aufwendige Reinigungen der Messtechnik, wie sie für im Gärsubstrat platzierte Messsonden durch Biofilmbewuchs häufig erforderlich sind. Durch das breite Analysespektrum mikrobiologischer sowie chemischer Parameter könnte daher eine Vermarktung des Konzeptes sowie eine Anwendung in weiteren biotechnologischen Verfahren wie der Abwasser- und Abfallvergärung ein hohes Potential besitzen. Zudem ist denkbar, dass eine zusätzliche Analyse von ^1H und ^2H im CH_4 ergänzende Informationen zu aktuellen mikrobiellen Stoffwechselreaktionen geben könnte.

7 Literaturverzeichnis

- Ahring, B. K.; Westermann, P. (1988): Product inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (10), S. 2393–2397.
- Amaral, J. A.; Knowles, R. (1995): Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiology Letters* 126 (3), S. 215–220.
- Avery, G. B.; Shannon, R. D.; White, J. R.; Martens, C. S.; Alperin, M. J. (1999): Effect of seasonal changes in the pathways of methanogenesis on the $\delta^{13}\text{C}$ values of pore water methane in a Michigan peatland. *Global Biogeochemical Cycles* 13 (2), S. 475–484.
- Baer, D.S; Paul, J.B; Gupta, M.; O'Keefe, A. (2002): Sensitive absorption measurements in the near-infrared region using off-axis integrated-cavity-output spectroscopy. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 75 (2-3), S. 261–265.
- Bagi, Z.; Ács, N.; Bálint, B.; Horváth, L.; Dobó, K.; Perei, K. R.; Rákhely, G.; Kovács K.L. (2007): Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (2), S. 473–482.
- Balabane, M.; Galimov, E.; Hermann, M.; Létolle, R. (1987): Hydrogen and carbon isotope fractionation during experimental production of bacterial methane. *Organic Geochemistry* 11 (2), S. 115–119.
- Balk, M.; Weijma, J.; Stams, A. J. M. (2002): *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology* 52 (4), S. 1361–1368.
- Basch, H.; Mogi, K.; Musaev, D. G.; Morokuma, K. (1999): Mechanism of the methane \rightarrow methanol conversion reaction catalyzed by methane monooxygenase: a density functional study. *Journal of the American Chemical Society* 121 (31), S. 7249–7256.
- Bauer, C.; Korthals, M.; Gronauer, A.; Lebuhn, M. (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Science & Technology* 58 (7), S. 1433.
- BDWE (Bundesverband der Energie- und Wasserwirtschaft e.V.) (2015): Energiemix. <https://www.bdew.de/in-ternet.nsf/id/energiemix-de>, zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- Bischofsberger, W. (2005): Anaerobtechnik. 3. Auflage, Berlin, Springer.
- Blume, F.; Bergmann, I.; Nettmann, E.; Schelle, H.; Rehde, G.; Mundt, K.; Klocke, M. (2010): Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of Applied Microbiology* 109 (2), S.441–450.
- Bok, F. A. M. de; van Leerdam, R. C.; Lomans, B. P.; Smidt, H.; Lens, P. N. L.; Janssen, A. J. H.; Stams, A. J. M. (2006): Degradation of methanethiol by methylotrophic methanogenic archaea in a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (12), S. 7540–7547.
- Bok, F.A.M de; Plugge, C.M; Stams, A.J.M (2004): Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research* 38 (6), S. 1368–1375.
- Boone, D. R.; Xun, L. (1987): Effects of pH, temperature, and nutrients on propionate degradation by a methanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (7), S. 1589–1592.

- Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M. et al. (2009): The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4), S. 611–622.
- BMWI (Bundesministerium für Wirtschaft und Energie) (2015): Erneuerbare Energien auf einen Blick. [Http://www.bmwi.de/DE/Themen/Energie/Erneuerbare-Energien/erneuerbare-energien-auf-einen-blick.htm](http://www.bmwi.de/DE/Themen/Energie/Erneuerbare-Energien/erneuerbare-energien-auf-einen-blick.htm), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- Calli, B.; Mertoglu, B.; Inanc, B.; Yenigun, O. (2005): Community changes during start-up in methanogenic bioreactors exposed to increasing levels of ammonia. *Environmental Technology* 26 (1), S. 85–91.
- Cheeseman, P.; Toms-Wood, A.; Wolfe, R. S. (1972): Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* strain M.o.H. *Journal of Bacteriology*. 112 (1), S. 527–531.
- Chelliapan, S.; Wilby, T.; Yuzir, A.; Sallis, P. J. (2011): Influence of organic loading on the performance and microbial community structure of an anaerobic stage reactor treating pharmaceutical wastewater. *Desalination* 271 (1-3), S. 257–264.
- Chen, Ye; Cheng, Jay J.; Creamer, Kurt S. (2008): Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* 99 (10), S. 4044–4064.
- Cheng, Y. S.; Halsey, J. L.; Fode, K. A.; Remsen, C. C.; Collins, M. L. (1999): Detection of methanotrophs in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2), S. 648–651.
- Cirne, D. G.; Lehtomaki, A.; Bjornsson, L.; Blackall, L. L. (2007): Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology* 103 (3), S. 516–527.
- Collins, G.; Kavanagh, S.; McHugh, S.; Connaughton, S.; Kearny, A.; Rice, O.; Carrigg, C.; Scully C.; Bhreathnach, N.; Mahony, T.; Madden, P.; Enright, A. N. (2006): Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: Recent advances through polyphasic experiments. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 41 (5), S. 897–922.
- Conklin, A.; Stensel, H. D.; Ferguson, J. (2006): Growth Kinetics and Competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in Mesophilic Anaerobic Digestion. *Water Environment Research* 78 (5), S. 486–496.
- Conrad, R.; Rothfuss, F. (1991): Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 12 (1), S. 28–32.
- Conrad, R. (2005): Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Organic Geochemistry* 36 (5), S. 739–752.
- Conrad, R.; Chan, O.-C.; Claus, P.; Casper, P. (2007): Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnology and Oceanography* 52 (4), S. 1393–1406.
- Crabbe, B. R.; Plugge, C. M.; McInerney, M. J.; Stams, A. J. M. (2011): Formate formation and formate conversion in biological fuels production. *Enzyme Research* 2011 (1), S. 1–8.
- Dar, S. A.; Kleerebezem, R.; Stams, A. J. M.; Kuenen, J. G.; Muyzer, G. (2008): Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (6), S. 1045–1055.

- Datta, R.; Ogeltree, J. (1983): Methanol bioconversion by *Butyribacterium methylotrophicum* - batch fermentation yield and kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. 25 (4), S. 991–998.
- Davidova, I. A.; Stams, A. J. M. (1996): Sulfate reduction with methanol by a thermophilic consortium obtained from a methanogenic reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (3), S. 297–302.
- Demirel, B.; Scherer, P. (2008): The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7 (2), S. 173–190.
- DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) (2015a): 63. *Desulfovibrio* Medium (Freshwater). [Http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium63.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium63.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) (2015b): 334. *Methanothrix* Medium. [Http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium334.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium334.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) (2014a): 287. *Methanogenium olentangyi* Medium. [Http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium-287.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium-287.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) (2014b): 318. *Methanosarcina* (BCYT) Medium. [Http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium318.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium318.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) (2014c): 120. *Methanosarcina mazei* Medium. [Http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium120.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium120.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) (2014d): 141. *Methanogenium* Medium (H₂ / CO₂). [Http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium-141.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium-141.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- Dhanasekaran, S.; Doherty, T. M.; Kenneth, J. (2010): Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods* 354 (1-2), S. 34–39.
- Dogan, T.; Ince, O.; Oz, N. A.; Ince, B. K. (2005): Inhibition of volatile fatty acid production in granular sludge from a UASB reactor. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 40 (3), S. 633–644.
- Dong, X.; Stams, A. J. (1995): Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation. *Anaerobe* 1 (1), S. 35–39.
- Duskova, D.; Marounek, M. (2001): Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Letters in Applied Microbiology* 33 (2), S. 159–163.
- Dworkin, L. L. (2002): Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *Archives of Ophthalmology* 120 (11), S. 1534–1539.
- Eder, B.; Krieg, A. (2012): Biogas-Praxis. Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit, Umwelt. 5. überarbeitete Auflage, Staufen bei Freiburg: Ökobuch.
- Einen, J.; Thorseth, I. H.; Øvreås, L. (2008): Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters* 282 (2), S. 182–187.

- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) (2013): Leitfaden Biogas. Von der Gewinnung zur Nutzung. Gülzow, FNR.
- Fachverband Biogas e.V. (2014): Branchenzahlprognose für die Jahre 2014 und 2015. [http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/\\$file/14-11-25_Biogas%20Branchenzahlen_Prognose_2014-2015.pdf](http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/$file/14-11-25_Biogas%20Branchenzahlen_Prognose_2014-2015.pdf), zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- Felchner-Zwirello, M. (2014): Propionic acid degradation by syntrophic bacteria during anaerobic biowaste digestion. Karlsruhe, KIT Scientific Publishing.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4), S. 783–791.
- Fey, A.; Conrad, R. (2000): Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (11), S. 4790–4797.
- Florencio, L. (1994): The Fate of Methanol in Anaerobic Bioreactors. Dissertation, Wageningen University. Wageningen, Niederlande.
- Florencio, L.; Field, J. A.; Lettinga, G. (1994): Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1), S. 227–234.
- Florencio, L.; Field, J.A.; Lettinga, G. (1995): Substrate competition between methanogens and acetogens during the degradation of methanol in UASB reactors. *Water Research* 29 (3), S. 915–922.
- Francioso, O.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Montecchio, D.; Salomoni, C.; Caputo, A.; Palenzona, D. (2010): Chemical characterization of municipal wastewater sludges produced by two-phase anaerobic digestion for biogas production. *Journal of Hazardous Materials* 175 (1-3), S. 740–746.
- Fukuzaki, S.; Nishio, N. (1997): Methanogenic fermentation and growth of granular methanogenic sludge on a methanol-propionate mixture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (4), S. 382–385.
- Garcia, J.-L.; Patel, B. K.C; Ollivier, B. (2000): Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe* 6 (4), S. 205–226.
- Garrity, G.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. R. (2007): Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York, Springer.
- Gelwicks, J. T.; Risatti, J. B.; Hayes, J. M. (1994): Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (2), S. 467–472.
- Ghali, M.B; Scott, P.T; Al Jassim, R.A.M (2004): Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and rusa deer. *Letters in Applied Microbiology* 39 (4), S. 341–346.
- Godornes, C.; Leader, B. T.; Molini, B. J.; Centurion-Lara, A.; Lukehart, S. A. (2007): Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine* 38 (1), S. 1–7.
- Govert, D.; Conrad, R. (2009): Effect of substrate concentration on carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *M. acetivorans* and in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (9), S. 2605–2612.
- Graaf, W. de; Wellsbury, P.; Parkes, R. J.; Cappenberg, T. E. (1996): Comparison of acetate turnover in methanogenic and sulfate-reducing sediments by radiolabeling and stable isotope labeling and by use of

- specific inhibitors: Evidence for isotopic exchange. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3), S. 772–777.
- Graham, D. W.; Chaudhary, J. A.; Hanson, R. S.; Arnold, R. G. (1993): Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors. *Microbial Ecology* 25 (1), S. 1–17.
- Griffin, M. E.; McMahon, K. D.; Mackie, R. I.; Raskin, L. (1998): Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering* 57 (3), S. 342–355.
- Griswold, K. E.; White, B. A.; Mackie, R. I. (1999): Proteolytic activities of the starch-fermenting ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. *Current Microbiology* 39 (4), S. 180–186.
- Habib, G.; Hoen, B.; Tornos, P.; Thuny, F.; Prendergast, B.; Vilacosta, I. et al. (2009): Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): The task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 30 (19), S. 2369–2413.
- Hao, L.-P.; Lu, F.; He, P.-J.; Li, L.; Shao, L.-M. (2011): Predominant contribution of syntrophic acetate oxidation to thermophilic methane formation at high acetate concentrations. *Environmental Science and Technology* 45 (2), S. 508–513.
- Hattori, S.; Kamagata, Y.; Hanada, S.; Shoun, H. (2000): *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 (4), S. 1601–1609.
- Hattori, S.; Nashimoto, H.; Kimura, H.; Kobe, K.; Yamada, K.; Shimizu, M. et al. (2012): Hydrogen and carbon isotope fractionation by thermophilic hydrogenotrophic methanogens from a deep aquifer under coculture with fermenters. *Geochemical Journal*. 46 (3), S. 193–200.
- Heijthuijsen, J.H.F.G; Hansen, T.A (1986): Interspecies hydrogen transfer in co-cultures of methanol-utilizing acidogens and sulfate-reducing or methanogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 38 (1), S. 57–64.
- Heyer, J.; Galchenko, V. F.; Dunfield, P. F. (2002): Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* 148 (9), S. 2831–2846.
- Hoffmann, R. A.; Garcia, M. L.; Veskivar, M.; Karim, K.; Al-Dahhan, M. H.; Angenent, L. T. (2008): Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. *Biotechnology and Bioengineering* 100 (1), S. 38–48.
- Hori, T.; Haruta, S.; Ueno, Y.; Ishii, M.; Igarashi, Y. (2006): Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2), S. 1623–1630.
- Hunik, J. H.; Hamelers, H. V. M; Koster, I. W (1990): Growth-rate inhibition of acetoclastic methanogens by ammonia and pH in poultry manure digestion. *Biological Wastes* 32 (4), S. 285–297.
- Imachi, H.; Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Ohashi, A.; Harada, H. (2000): Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8), S. 3608–3615.
- Invitrogen™ (2014): Userguide TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing. Life technologies™, Carlsbad, USA.

- Janssen, P. H.; Kirs, M. (2008): Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12), S. 3619–3625.
- Jetten, M. S. M.; Stams, A. J. M.; Zehnder, A. J. B. (1990): Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 73 (4), S. 339–344.
- Jetten, M. S. M.; Stams, A. J. M.; Zehnder, A. J. B. (1992): Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Letters* 88 (3-4), S. 181–198.
- Jukes, T. H.; Cantor, C. R. (1969): Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (Ed.) *Mammalian protein metabolism* 3. Amsterdam, Elsevier, S. 21–132.
- Kaltschmitt, M. (2009): Energie aus Biomasse. Grundlagen, Techniken und Verfahren. 2. Auflage. Dordrecht, Heidelberg, Springer.
- Kampmann, K.; Ratering, S.; Baumann, R.; Schmidt, M.; Zerr, W.; Schnell, S. (2012): Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Systematic and Applied Microbiology* 35 (6), S. 404–413.
- Karakashev, D.; Batstone, D. J.; Angelidaki, I. (2005): Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1), S. 331–338.
- Karakashev, D.; Batstone, D. J.; Trably, E.; Angelidaki, I. (2006): Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosacetaceae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7), S. 5138–5141.
- Keltjens, J. T.; Vogels, G. D. (1993): Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. In: Ferry, J. G. (Ed.): *Methanogenesis*. New York, Springer (Chapman & Hall Microbiology Series), S. 253–303.
- Keppler, F.; Laukenmann, S.; Rinne, J.; Heuwinkel, H.; Greule, M.; Whiticar, M.; Lelieveld, J. (2010): Measurements of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ methane from anaerobic digesters: comparison of optical spectrometry with continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 44 (13), S. 5067–5073.
- Kerby, R.; Zeikus, J. G. (1987): Catabolic enzymes of the acetogen *Butyrivacterium methylotrophicum* grown on single-carbon substrates. *Journal of Bacteriology* 169 (12), S. 5605–5609.
- Khanal, S. (2011): Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications. Hoboken, Wiley and Sons.
- Klocke, M.; Nettmann, E.; Bergmann, I.; Mundt, K.; Souidi, K.; Mumme, J.; Linke, B. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31 (3), S. 190–205.
- Kolb, S.; Knief, C.; Stubner, S.; Conrad, R. (2003): Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5), S. 2423–2429.
- Koster, I.W.; Lettinga, G. (1988): Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes* 25 (1), S. 51–59.
- Kröber, M.; Bekel, T.; Diaz, N. N.; Goesmann, A.; Jaenicke, S.; Krause, L.; Miller D.; Runte, K. J.; Viehöver, P.; Pühler, A.; Schlüter, A. (2009): Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial

- community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology* 142 (1), S. 38–49.
- Kruger, M.; Eller, G.; Conrad, R.; Frenzel, P. (2002): Seasonal variation in pathways of CH₄ production and in CH₄ oxidation in rice fields determined by stable carbon isotopes and specific inhibitors. *Global Change Biol* 8 (3), S. 265–280.
- Krzycki, J. A.; Kenealy, W. R.; Deniro, M. J.; Zeikus, J. G. (1987): Stable carbon isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (10), S. 2597–2599.
- Laukenmann, S.; Polag, D.; Heuwinkel, H.; Greule, M.; Gronauer, A.; Lelieveld, J.; Keppler, F. (2010): Identification of methanogenic pathways in anaerobic digesters using stable carbon isotopes. *Engineering in Life Sciences* 10 (6), S. 509–514.
- Le Mer, J.; Roger, P. (2001): Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37 (1), S. 25–50.
- Lettinga, G.; van der Geest, A. T.; Hobma, S.; Laan, J. V. D. (1979): Anaerobic treatment of methanolic wastes. *Water Research* 13 (8), S. 725–737.
- Lettinga, G.; de Zeeuw, W.; Ouborg, E. (1981): Anaerobic treatment of wastes containing methanol and higher alcohols. *Water Research* 15 (2), S. 171–182.
- Lerm, S.; Kleybocker, A.; Miethling-Graff, R.; Alawi, M.; Kasina, M.; Liebrich, M.; Wurdemann, H. (2012): Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Management* 32 (3), S. 389–399.
- Li, Y.-F.; Wei, S.; Yu, Z. (2013): Feedstocks affect the diversity and distribution of propionate CoA-transferase genes (*pct*) in anaerobic digesters. *Microbial Ecology* 66 (2), S. 351–362.
- Lieberman, R. L.; Rosenzweig, A. C. (2005): Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 434 (7030), S. 177–182.
- Lieser, K. (1991): Einführung in die Kernchemie. 3. Auflage, Weinheim, VCH.
- Ljungdahl, L. G. (1986): The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 40, S. 415–450.
- Londry, K. L.; Dawson, K. G.; Grover, H. D.; Summons, R. E.; Bradley, A. S. (2008): Stable carbon isotope fractionation between substrates and products of *Methanosarcina barkeri*. *Organic Geochemistry* 39 (5), S. 608–621.
- Lovley, D. R.; Dwyer, D. F.; Klug, M. J. (1982): Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (6), S. 1373–1379.
- Lovley, D. R.; Klug, M. J. (1983): Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 45 (1), S. 187–192.
- Lv, Z.; Hu, M.; Harms, H.; Richnow, H. H.; Liebetrau, J.; Nikolausz, M. (2014): Stable isotope composition of biogas allows early warning of complete process failure as a result of ammonia inhibition in anaerobic digesters. *Bioresource Technology* 167, S. 251–259.
- Lynd, L. H.; Zeikus, J. G. (1983): Metabolism of H₂-CO₂, methanol, and glucose by *Butyribacterium methylotrophicum*. *Journal of Bacteriology* 153 (3), S. 1415–1423.

- Ma, J.; Zhao, B.; Frear, C.; Zhao, Q.; Yu, L.; Li, X.; Chen, S. (2013): *Methanosarcina* domination in anaerobic sequencing batch reactor at short hydraulic retention time. *Bioresource Technology* 137, S. 41–50.
- Manzoor, S.; Bongcam-Rudloff, E.; Schnurer, A.; Muller, B. (2013): First Genome Sequence of a Syntrophic Acetate-Oxidizing Bacterium, *Tepidanaerobacter acetatoxydans* Strain Re1. *Genome Announcements* 1 (1), S. e00213-12. DOI: 10.1128/genomeA.00213-12.
- McDonald, I. R.; Murrell, J. C. (1997): The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiology Letters* 156 (2), S. 205–210.
- McDonald, I. R.; Miguez, C. B.; Rogge, G.; Bourque, D.; Wendlandt, K. D.; Groleau, D.; Murrell, J. C. (2006): Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiology Letters* 255 (2), S. 225–232.
- McDonald, I. R.; Smith, K.; Lidstrom, M. E. (2005): Methanotrophic populations in estuarine sediment from Newport Bay, California. *FEMS Microbiology Letters* 250 (2), S. 287–293.
- McMahon, K. D.; Zheng, D.; Stams, A. J. M.; Mackie, R. I.; Raskin, L. (2004): Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 87 (7), S. 823–834.
- Merlin Christy, P.; Gopinath, L. R.; Divya, D. (2014): A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 34 (0), S. 167–173.
- Micheli, F. (2001): Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6 (9), S. 414–419.
- Moestedt, J.; Nilsson P., S.; Schnürer, A. (2013): The effect of substrate and operational parameters on the abundance of sulphate-reducing bacteria in industrial anaerobic biogas digesters. *Bioresource Technology* 132, S. 327–332.
- Mohnen, D. (2008): Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11 (3), S. 266–277.
- Mook, W.; Rozanski, Kazimierz (2000): Environmental isotopes in the hydrological cycle. *IAEA Publish* (39).
- Mori, K.; Sunamura, M.; Yanagawa, K.; Ishibashi, J.-i; Miyoshi, Y.; Iino, T. et al. (2008): First cultivation and ecological investigation of a bacterium affiliated with the candidate phylum OP5 from hot springs. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (20), S. 6223–6229.
- Mortimer, C. E.; Müller, U.; Beck, J. (2014): Chemie. Das Basiswissen der Chemie. 11. Auflage, Stuttgart, Thieme.
- Müller, B.; Manzoor, S.; Niazi, A.; Bongcam-Rudloff, E.; Schnürer, A.; Battista, J. R. (2015): Genome-guided analysis of physiological capacities of *Tepidanaerobacter acetatoxydans* provides insights into environmental adaptations and syntrophic acetate oxidation. *PLoS ONE* 10 (3), e0121237.
- Nanninga, H. (1986): Isolation of a sulfate-reducing bacterium growing with methanol. *FEMS Microbiology Letters* 38 (2), S. 125–130.
- Narihiro, T.; Sekiguchi, Y. (2011): Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microbial Biotechnology* 4 (5), S. 585–602.

- NCIMB (National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria) (2015): Recipes for growth media. <http://www.ncimb.com/Files/NCIMB%20Culture%20Media%20v2.0.pdf>, zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- Nettmann, E.; Bergmann, I.; Pramschufner, S.; Mundt, K.; Plogsties, V.; Herrmann, C.; Klocke, M. (2010): Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (8), S. 2540–2548.
- Nielsen, D. A.; Schramm, A.; Nielsen, L. P.; Revsbech, N. P. (2013): Seasonal methane oxidation potential in manure crusts. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (1), S. 407–410.
- Nikolausz, M.; Walter, R. F. H.; Sträuber, H.; Liebetrau, J.; Schmidt, T.; Kleinsteuber, S.; Bratfisch, F.; Günther, U.; Richnow, H. H. (2013): Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digesters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (5), S. 2251–2262.
- Noike, T.; Endo, G.; Chang, J. E.; Yaguchi, J.; Matsumoto, J. (1985): Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering* 27 (10), S. 1482–1489.
- Nultsch, Wilhelm (2001): Allgemeine Botanik. 11. Auflage, Stuttgart, Thieme.
- Ollivier, B. M.; Mah, R. A.; Garcia, J. L.; Boone, D. R. (1986): Isolation and characterization of *Methanogenium bourgense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36 (2), S. 297–301.
- Ollivier, B.; Garcia, J. L. (1990): Thermophilic methanogenesis from pectin by a mixed defined bacterial culture. *Current Microbiology* 20 (2), S. 77–81.
- O'Sullivan, A. (1997): Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4 (3), S. 173–207.
- Palmisano, A. C.; Barlaz, M. A. (1996): Microbiology of Solid Waste: Taylor & Francis, Abingdon.
- Paulo, P. L.; Stams, A J M; Field, J. A.; Dijkema, C.; van Lier, J B; Lettinga, G. (2003): Pathways of methanol conversion in a thermophilic anaerobic (55 °C) sludge consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (3), S. 307–314.
- Paulo, P. L. (2002): The fate of methanol in thermophilic-anaerobic environments. Dissertation, Wageningen University, Wageningen, Niederlande.
- Penger, J.; Conrad, R.; Blaser, M. (2012): Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (21), S. 7596–7602.
- Penning, H.; Claus, P.; Casper, P.; Conrad, R. (2006): Carbon isotope fractionation during acetoclastic methanogenesis by *Methanosaeta concilii* in culture and a lake sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8), S. 5648–5652.
- Pester, M.; Friedrich, M. W.; Schink, B.; Brune, A. (2004): *pmoA*-Based Analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5), S. 3138–3142.
- Peu, P.; Brugere, H.; Pourcher, A.-M; Kerouredan, M.; Godon, J.-J; Delgenes, J.-P; Dabert, P. (2006): Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5), S. 3578–3585.

- Pfannebecker, J. (2008): Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen. Dissertation, Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Plugge, C. M.; Zhang, W.; Scholten, J. C. M.; Stams, A. J. M. (2011): Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2 (82), S. 1–8.
- Polag, D.; Heuwinkel, H.; Laukenmann, S.; Greule, M.; Keppler, F. (2013): Evidence of anaerobic syntrophic acetate oxidation in biogas batch reactors by analysis of ¹³C carbon isotopes. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 49 (3), S. 365–377.
- Qu, X.; Mazéas, L.; Vavilin, V. A.; Epissard, J.; Lemunier, M.; Mouchel, J.-M.; He, P. J.; Bouchez, T. (2009): Combined monitoring of changes in delta13CH4 and archaeal community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste. *FEMS Microbiology Ecology* 68 (2), S. 236–245.
- Rabus, R.; Hansen, T. A.; Widdel, F. (2013): Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing Prokaryotes. Rosenberg, E.; DeLong, E. F.; Lory, S.; Stackebrandt, E.; Thompson, F. (Hg.): *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg, Springer. S. 309-404.
- Rademacher, A.; Zakrzewski, M.; Schlüter, A.; Schönberg, M.; Szczepanowski, R.I.; Goesmann, A.; Pühler, A.; Klocke, M. (2012): Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology* 79 (3), S. 785–799.
- Reuß, J. (2015): Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reduktion des Methanschlupfes von Gasaufbereitungsanlagen mittels Einsatz methanotropher Mikroorganismen. Dissertation, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Reuß, J.; Rachel, R.; Kämpfer, P.; Rabenstein, A.; Kuever, J.; Dröge, S.; König, H. (2015b): Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut. *Microbiological Research* (In Druck).
- Rexova-Benkova, L.; Markovic, O. (1976): Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 33, S. 323–385.
- Russell, J. B.; Robinson, P. H. (1984): Compositions and characteristics of strains of *Streptococcus bovis*. *Journal of Dairy Sciences* 67 (7), S. 1525–1531.
- Ružička, E.; Adámek, J.; Andree, J. (1966): Studium der Reduktion von Resazurin. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften* 97 (6), S. 1558–1567.
- Saidi-Mehrabad, A.; He, Z.; Tamas, I.; Sharp, C. E.; Brady, A. L.; Rochman, F. F.; Bodrossy, L.; Abell, G.C.; Penner, T.; Dong, X.; Sensen, C. W.; Dunfield, P. F. (2012): Methanotrophic bacteria in oilsands tailings ponds of northern Alberta. *International Society for Microbial Ecology* 7 (5), S. 908–921.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4), S. 406–425.
- Sawayama, S.; Tsukahara, K.; Yagishita, T. (2006): Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresource Technology* 97 (1), S. 69–76.
- Schink, B. (1997): Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (2), S. 262–280.
- Schink, B.; Zeikus, J.G (1980): Microbial methanol formation: a major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology* 4 (6), S. 387–389.
- Schlömann, M.; Reineke, W. (2007): *Umweltmikrobiologie*. 1. Auflage, München, Elsevier.

- Schlüter, A.; Bekel, T.; Diaz, N. N.; Dondrup, M.; Eichenlaub, R.; Gartemann, K.-H. et al. (2008): The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136 (1-2), S. 77–90.
- Schmidt, J. E.; Ahring, B. K. (1995): Interspecies electron transfer during propionate and butyrate degradation in mesophilic, granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (7), S. 2765–2767.
- Schnurer, A.; Schink, B.; Svensson, B. H. (1996): *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (4), S. 1145–1152.
- Schweiger, G.; Buckel, W. (1984): On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Letters* 171 (1), S. 79–84.
- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Harada, H. (2001): Recent advances in methane fermentation technology. *Current Opinion in Biotechnology* 12 (3), S. 277–282.
- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Nakamura, K.; Ohashi, A.; Harada, H. (1998): Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3), S. 1280–1288.
- Shin, S. G.; Lee, S.; Lee, C.; Hwang, K.; Hwang, S. (2010): Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge. *Bioresource Technology* 101 (24), S. 9461–9470.
- Shin, S. G.; Zhou, B. W.; Lee, S.; Kim, W.; Hwang, S. (2011): Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. *Process Biochemistry* 46 (4), S. 1035–1038.
- Siragusa, R. J.; Cerda, J. J.; Baig, M. M.; Burgin, C. W.; Robbins, F. L. (1988): Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* 47 (5), S. 848–851.
- Sirotek, K.; Slovakova, L.; Kopečný, J.; Marounek, M. (2004): Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bacteroides caccae*. *Letters of Applied Microbiology* 38 (4), S. 327–332.
- Slovakova, L.; Duskova, D.; Marounek, M. (2002): Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Letters of Applied Microbiology* 35 (2), S. 126–130.
- Smith, K. S.; Ingram-Smith, C. (2007): *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends in Microbiology* 15 (4), S. 150–155.
- Spinnler, H. E.; Lavigne, B.; Blachere, H. (1986): Pectinolytic activity of *Clostridium thermocellum*: its use for anaerobic fermentation of sugar beet pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 23 (6), S. 434–437.
- Stantscheff, R. (2013): Isolierung, Charakterisierung und Nachweis methanogener Archaea aus laufenden Praxis- NawaRo-Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Methanobacterium*. Dissertation, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Stantscheff, R.; Kuever, J.; Rabenstein, A.; Seyfarth, K.; Dröge, S.; König, H. (2014): Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (12), S. 5719–5735.

- Sterling, M. C.; Lacey, R. E.; Engler, C. R.; Ricke, S. C. (2001): Effects of ammonia nitrogen of H₂ and CH₄ production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. *Bioresource Technology* 77 (1), S. 9–18.
- Szymański, P. T. (1981): A note on the fermentation of pectin by pure strains and combined cultures of rumen bacteria. *Acta Microbiologica Polonica* 30 (2), S. 159–163.
- Takeuchi, M.; Kamagata, Y.; Oshima, K.; Hanada, S.; Tamaki, H.; Marumo, K.; Maeda, H.; Nedachi, M.; Hattori, M.; Iwasaki, W.; Sakata, S. (2014): *Methylocaldum marinum* sp. nov., a thermotolerant, methane-oxidizing bacterium isolated from marine sediments, and emended description of the genus *Methylocaldum*. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology* 64 (Pt 9), S. 3240–3246.
- Tale, V. P.; Maki, J. S.; Struble, C. A.; Zitomer, D. H. (2011): Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters. *Water Research* 45 (16), S. 5249–5256.
- Thauer, R. K.; Kaster, A.-K.; Seedorf, H.; Buckel, W.; Hedderich, R. (2008): Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* 6 (8), S. 579–591.
- Traversi, D.; Villa, S.; Lorenzi, E.; Degan, R.; Gilli, G. (2012): Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *Journal of Environmental Management* 111, S. 173–177.
- Umweltbundesamt (2005): 21 Thesen zur Klimaschutzpolitik und Begründungen. <http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2962.pdf>, zuletzt abgerufen am 26.06.2015.
- Umweltbundesamt (2014): Anteile der Energieformen Strom, Wärme und Kraftstoffe. <http://www.umweltbundesamt.de/daten/energiebereitstellung-verbrauch/anteile-der-energieformen-strom-waerme-kraftstoffe>, zuletzt abgerufen am 03.07.2015.
- Valentine, D. L.; Chidthaisong, A.; Rice, A.; Reeburgh, W. S.; Tyler, S. C. (2004): Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68 (7), S. 1571–1590.
- van Bodegom, P.; Stams, F.; Mollema, L.; Boeke, S.; Leffelaar, P. (2001): Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8), S. 3586–3597.
- van der Meijden, P.; van der Drift, C.; Vogels, G. D. (1984): Methanol conversion in *Eubacterium limosum*. *Archives of Microbiology* 138 (4), S. 360–364.
- Viljoen, C. D.; Thompson, G. G.; Sreenivasan, S. (2013): Stability of ultramer as copy number standards in real-time PCR. *Gene* 516 (1), S. 143–145.
- Vrieze, J. de; Hennebel, T.; Boon, N.; Verstraete, W. (2012): *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* 112, S. 1–9.
- Ward, B. B.; Kilpatrick, K. A.; Novelli, P. C.; Scranton, M. I. (1987): Methane oxidation and methane fluxes in the ocean surface layer and deep anoxic waters. *Nature* 327 (6119), S. 226–229.
- Weiss, A.; Jérôme, V.; Freitag, R.; Mayer, H. K. (2008): Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (1), S. 163–173.

- Westerholm, M.; Roos, S.; Schnürer, A. (2010): *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiology Letters*, 309 (1); S. 100–104.
- Westerholm, M.; Roos, S.; Schnürer, A. (2011): *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Systematic and Applied Microbiology* 34 (4), S. 260–266.
- Whiticar, M. J. (1999): Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology* 161 (1-3), S. 291–314.
- Wirth, R.; Kovács, E.; Maróti, G.; Bagi, Z.; Rákhely, G.; Kovács, K. L. (2012): Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for biofuels* 5, S. 41.
- Wojciechowicz, M.; Tomerska, H. (1971): Pectic enzymes in some pectinolytic rumen bacteria. *Acta Microbiologia Polonica A* 3 (1), S. 57–61.
- Wright, A. D. G.; Pimm, C. (2003): Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods* 55 (2), S. 337–349.
- Wright, A. D. G.; Williams, A. J.; Winder, B.; Christophersen, C. T.; Rodgers, S. L.; Smith, K. D. (2004): Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3), S. 1263–1270.
- Yu, Y.; Lee, C.; Kim, J.; Hwang, S. (2005): Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*. 89 (6), S. 670–679.
- Yun, J. J. (2006): Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 34 (12), S. e85.
- Zandvoort, M. H.; Geerts, R.; Lettinga, G.; Lens, P. N. L (2003): Methanol degradation in granular sludge reactors at sub-optimal metal concentrations: role of iron, nickel and cobalt. *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2-3), S. 190–198.
- Zeikus, J.G; Lynd, LeeH; Thompson, T.E; Krzycki, J.A; Weimer, P.J; Hegge, P.W (1980): Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the marburg strain. *Current Microbiology* 3 (6), S. 381–386.
- Zhang, T.; Fang, H. H. P. (2006): Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70 (3), S. 281–289.
- Zhu, C.; Zhang, J.; Tang, Y.; Zhengkai, X.; Song, R. (2011): Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis. *Microbiological Research* 166 (1), S. 27–35.
- Ziganshin, A. M.; Ziganshina, E. E.; Kleinstaub, S.; Pröter, J.; Ilinskaya, O. N. (2012): Methanogenic community dynamics during anaerobic utilization of agricultural Wastes. *Acta Naturae* 4 (4), S. 91–97.

Abkürzungsverzeichnis

ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Polymorphism
ATP	Adenosintriphosphat
BES	2-Bromethansulfonsäure
BGA	Biogasanlage
bp	Basenpaare
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CSTR	Continuous stirred tank reactor
DEPC	Diethyldicarbonat (auch Diethylpyrocarbonat)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DBFZ	Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH, Leipzig
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBGA	Forschungsbiogasanlage (am DBFZ, Leipzig)
FID	Flammenionisationsdetektor
FOS	Flüchtige organische Säuren
GC	Gaschromatograph
GC-C-IRMS	Gas chromatography combustion isotope-ratio mass spectrometry
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRT	Hydraulic retention time
IRMS	Isotopenverhältnismassenspektrometrie
LB(-Medium)	engl. lysogeny broth; Nährmedium für Bakterien
MCS	Multiple Cloning Site
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMS	Nitratmineralsalz
OLR	Organic loading rate
oTS	Organische Trockensubstanz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>pmoA</i>	Genbezeichnung für die Untereinheit A der partikulären Methanmonooxygenase
pMMO	partikuläre Methanmonooxygenase
ppm	Parts per million
qPCR	quantitative (real-time) Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RI-Detektor	Brechungsindexdetektor (refractive index detector)
T	Temperatur
T_A	Annealing Temperature
TAC	Total anorganisches Carbonat
T_M	Melting temperature
TS	Trockensubstanz
VPDB	Vienna Pee Dee Belemnite (Referenz für C-Isotopenverhältnisse)
VSMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water (Referenz für H- und O-Isotopenverhältnisse)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Tobias May, die hier vorliegende Dissertationsarbeit selbstständig und ausschließlich unter Rückgriff auf die angegebenen Hilfsmittel und Quellen erstellt zu haben.

Tobias May, Mainz, 06.07.2015