

Propionsäureabbau in NawaRo-Biogasanlagen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stephan Ahlert
geboren am 24. September 1984 in Göttingen

Mainz, August 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	8
2.1	Relevanz erneuerbarer Energien	8
2.2	Biogas als Baustein des Energiemixes	9
2.3	Mikrobiologie der Biogasbildung	11
2.3.1	Hydrolyse	11
2.3.2	Acidogenese	13
2.3.3	Acetogenese	13
2.3.4	Methanogenese	14
2.4	Syntrophie	17
2.4.1	Definition von Syntrophie	17
2.4.2	Beispiele von Syntrophie	17
2.4.3	Phylogenie syntropher Bakterien	19
2.4.4	Organisation der Syntrophie	19
2.5	Oxidation von Propionat	21
2.5.1	Energetik der Propionat-Oxidation in Syntrophie	22
2.5.2	Biochemie der Propionat-Oxidation in Syntrophie	23
2.5.3	Propionat-Oxidation unter anaerober Atmung	26
2.6	Methoden zur Analyse syntropher Stoffwechselfgemeinschaften	27
2.7	Ziel der vorliegenden Arbeit	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Geräte und Hilfsmittel	30
3.2	Verbrauchsmaterialien	33
3.3	Lösungen, Nährmedien, Puffer	36
3.4	Mikrobielle Proben	39
3.5	Propionat-verwertende Anreicherungskulturen	39
3.5.1	Etablierung	39
3.5.2	Erhaltung	39
3.5.3	Charakterisierung der Kulturbedingungen	41
3.5.4	Kultivierung im Rahmen der sukzessiven Diversitätsanalyse	41
3.6	Mikroskopie und mikroskopische Photographie	42
3.7	Chemische Analytik (HPLC)	42
3.8	Molekularbiologische Methoden	42

3.8.1	DNA-Isolierung	43
3.8.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.8.3	Präparative Gel-Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	44
3.8.4	Molekulare Klonierung	45
3.8.5	Restriktions-Analysen (ARDRA)	45
3.8.6	Sequenzierung pCR-4-TOPO TA-klonierter 16S rDNA-Gene .	46
3.8.7	Quantitative PCR (qPCR)	46
3.9	Bioinformatik	46
3.9.1	Aufbereitung der Sequenzdaten	46
3.9.2	Entfernung chimärer Sequenzen	47
3.9.3	Clusterung von 16S rDNA-Sequenzen	47
3.9.4	Datenbankabgleich von DNA-Sequenzen	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Aktivität Propionat-verwertender Anreicherungskulturen	48
4.2	Charakterisierung Propionat-verwertender Anreicherungskulturen . .	49
4.2.1	Variabilität der Propionat-Verwertung	49
4.2.2	Kultivierungsansprüche der Anreicherungskulturen	51
4.2.3	Auswirkung der Kulturverdünnung auf den Propionat-Abbau	56
4.3	Morphologische Zell-Diversität der Anreicherungskulturen	58
4.4	Sukzession der mikrobiellen Diversität der Anreicherungskulturen . .	67
4.4.1	Vorgehensweise	67
4.4.2	Generierung und Aufarbeitung der Daten	70
4.4.3	Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur Ap1a	85
4.4.4	Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur G12	89
4.4.5	Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur N12	94
4.4.6	Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur Wp2a	98
4.4.7	Potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies	101
4.4.8	Bakterielle und archaeelle Zellzahlen	106
5	Diskussion	108
5.1	Propionsäure-Abbau in NawaRo-Biogasanlagen	108
5.1.1	Propionsäure verwertende Schlüssel-Organismen	110
5.1.2	Methanbakterien	111
5.1.3	Syntroph Acetat-oxidierende Bakterien	113
5.1.4	Potentiell autotroph homoacetogene Bakterien	114

5.1.5	Propionat-Verwertung und Transfer von Wachstumsfaktoren	116
5.2	Modellierung der syntrophen Propionat-Oxidation	117
5.2.1	Propionat-Oxidation und Wasserstoff-Partialdruck	117
5.3	Vollständige Propionat-Oxidation im Netzwerk	122
5.4	Übergeordnete Bedeutung der Homoacetat-Konversion	124
5.5	Ausblick	124
6	Literatur	126
7	Anhang	146
8	Abkürzungsverzeichnis	211

1 Zusammenfassung

Die Energiewende ist begleitet von dem Ausbau erneuerbarer Energien. Dabei spielt die Energiegewinnung aus Biomasse eine wichtige Rolle. Der optimale Betrieb einer Biogasanlage erfordert eine stabile Methanproduktion, welche jedoch durch die Akkumulation von Propionsäure nachhaltig gestört werden kann. Aus diesem Grund ist der mikrobielle Abbau dieser Substanz von besonderem Interesse. Die Thermodynamik des anaeroben bakteriellen Abbaus von Propionsäure erfordert die syntrophe Verwertung des entstehenden Wasserstoffs durch Wasserstoff-verbrauchende Mikroorganismen, beispielsweise methanogene Archaea.

Mit dem Ziel, die Erkenntnislage der Propionat-Verwertung in NawaRo-Biogasanlagen zu erweitern, sollten Propionat-verwertende Anreicherungskulturen aus NawaRo-Biogasanlagen etabliert, charakterisiert und molekularbiologisch analysiert werden. Aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurden reproduzierbar Propionat-verwertende Anreicherungskulturen mittels anaerober Kultivierungstechniken etabliert. Die anaerob Propionat-verwertende Aktivität der Kulturen blieb über Jahre erhalten und konnte unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden. Die Analyse der sukzessiven Diversität von vier Anreicherungskulturen ermöglichte einen Einblick in die sich während der Propionat-Verwertung sukzessiv verändernde mikrobielle Diversität. Dabei wurden die aus der 16S rDNA-Analyse resultierenden Sequenzcluster MP-1 (*Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp.), MP-6 und MP-15 (beide "*Candidatus* Cloacamonas sp."), sowie MP-9 (*Syntrophobacter sulfatireducens*) als potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies identifiziert. Mit *S. sulfatireducens* wurde eine bekannte syntroph Propionat-verwertende Spezies gefunden. Die Sequenzen von MP-1 waren nahe verwandt mit *Pelotomaculum schinkii*, ebenfalls eine beschriebene syntroph Propionat-verwertende Spezies. Bei dem nächsten Verwandten der Cluster MP-6 und MP-15 handelte es sich um "*Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans", eine bisher unkultivierbare Spezies, dessen Genom für den gesamten Abbauweg der syntrophen Propionat-Oxidation codiert. *S. sulfatireducens* kam zusammen mit Vertretern der methanogenen Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosaeta* und *Methanomethylivorans* vor. Als methanogener Partner von *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. dominierte die Gattung *Methanosarcina*. Aufgrund der starken Präsenz der syntroph Acetat-oxidierenden Spezies *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Sequenz-Cluster MP-3), sowie potentiell homoacetogener Arten, wurde zudem ein theoretischer Zusammenhang der Propionat-Verwertung mit der syntrophen Acetat-Oxidation und der autotrophen Homoacetogenese vorgeschlagen.

Abstract Sustainable energy transition requires increasing energy production from renewable resources. In this respect, biomass digestion offers a flexible approach of decentralized energy generation. Agricultural renewable resource biogas plants generate clean energy through stable methane formation. Yet, this process can become severely destabilized by propionic acid accumulation. Therefore, microbial propionic acid degradation during anaerobic digestion is of specific interest. Anaerobic microbial propionic acid degradation is achieved by obligately mutualistic metabolism (syntrophy) between propionate-oxidizing bacteria and hydrogen disposing microorganisms, e. g. methanogenic archaea.

In order to extend the knowledge of propionate degradation in agricultural renewable resource biogas plants, propionate degrading enrichment cultures were to be attained and subsequently analysed in different aspects.

Propionate degrading enrichment cultures could be established from different agricultural renewable resource biogas fermenters. Their propionate degradation performance was studied under variable conditions and remained stable for years. Furthermore, the successive shift of microbial diversity during propionate degradation in batch was investigated in terms of 16S rRNA gene analysis. Sequence clusters MP-1 (*Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp.), MP-6 and MP-15 (both “*Candidatus* Cloacamonas sp.”), as much as MP-9 (*Syntrophobacter sulfatireducens*) were identified as potential propionate oxidizing key species. *Syntrophobacter sulfatireducens* is a published species and known for its ability to oxidize propionate in syntrophy. The *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. cluster (MP-1) was closely related to *Pelotomaculum schinkii*, another syntrophic propionate oxidizing species. The nearest species relation of clusters MP-6 and MP-15 was “*Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans”. This so far unculturable species is genomically analyzed and features all the genes involved in syntrophic propionate oxidation. Growth of *Syntrophobacter sulfatireducens* came along with methanogenic genera *Methanoculleus*, *Methanosaeta* and *Methanome-thylovorans*. Methanogenic company of *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. (cluster MP-1) consisted mainly of *Methanosarcina*. Due to the overall presence of syntrophic acetate oxidizing *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (16S rRNA-gene cluster MP-3) and potentially autotrophic homoacetogenic bacteria, a theoretical interrelationship between syntrophic propionate oxidation, syntrophic acetate oxidation and autotrophic homoacetogenesis was proposed.

2 Einleitung

2.1 Relevanz erneuerbarer Energien

Ein Großteil (87 %, 463 EJ) der weltweit verbrauchten Energie wurde im Jahr 2013 durch die Nutzung fossiler Energieträger gedeckt. Dabei handelte es sich um Erdöl (33%), Erdgas (24 %) und Kohle (30 %). Uran trug 4 % des Bedarfs in Form von Kernenergie bei. Auf Wasserkraft entfielen 7% und weitere erneuerbare Energien kamen auf 2% (BP, 2014).

Im Folgenden sollen einige Aspekte den Bedarf an erneuerbaren Energien verdeutlichen. Die **Verfügbarkeit fossiler Energieträger** wird mittel- bis langfristig zu ausgeprägten Engpässen der Ressourcen führen. Insbesondere im Fall von Erdöl erwartet die Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR) eine steigende Nachfrage, die in den kommenden Jahrzehnten wahrscheinlich nicht gedeckt werden kann (BGR, 2014). Des Weiteren erkennt die EU eine potentielle Verwundbarkeit hinsichtlich Preiserhöhungen oder Versorgungsdefiziten aufgrund der **Energie-Abhängigkeit** der EU-Staaten gegenüber einzelnen Anbieterstaaten (European Commission, 2014). Auch **ökologische Gründe** spielen eine Rolle. Neben der lokalen Zerstörung der Umwelt durch Ölförderung und Kohlebergbau wird die Freisetzung fossil gebundener Treibhausgase für die globale Erwärmung verantwortlich gemacht. Insbesondere die Anreicherung von Kohlenstoffdioxid in der Erdatmosphäre spielt hierbei eine Rolle (Solomon et al., 2009). Die Auswirkungen des Klimawandels werden nach einer Berechnung des Deutschen Instituts für Wirtschaftsforschung (DIW) zu beträchtlichen **ökonomischen Folgekosten** führen. So könnten sich die Kosten bis 2050 allein in Deutschland auf knapp 800 Milliarden Euro aufsummieren (DIW, 2007). Um der Erderwärmung zu entgehen, setzen viele Länder weiterhin auf Atomkraft. So befanden sich Ende 2013 70 Kernkraftanlagen in 15 Ländern im Bau, darunter allein 29 in China. Weitere 125 Kernkraftwerke befanden sich in der Planungs- oder Genehmigungsphase (BGR, 2014). Die **Nuklearkatastrophen** von Tschernobyl (1986) und Fukushima (2011) belegen jedoch, dass Nuklearenergie immer ein unkalkulierbares Risiko mit sich bringt. Darüber hinaus bleibt das Problem der zukunftssicheren Endlagerung weiterhin ungelöst. Insofern erscheint die intensive Förderung regenerativer Energietechnologien innerhalb der kommenden Jahrzehnte, insbesondere unter Berücksichtigung der weltweit steigenden Primärenergienachfrage (IEA, 2013, 1,2 % pro Jahr von 2011 bis 2035), alternativlos. Auf Grundlage des Fünften Sachstandsbericht des IPCC haben daher die führenden Industrienationen bei ihrem G7-Gipfel im Juni 2015 in Elmau bekräftigt, im Rahmen der anstehenden

Klimakonferenz im Dezember 2015 in Paris eine rechtlich verbindliche Übereinkunft zur Bekämpfung des Klimawandels anzustreben. Diese soll mit Hilfe starker Verringerung der Treibhausgasemissionen und Dekarbonisierung der Weltwirtschaft dazu führen, dass die durchschnittliche globale Erwärmung unterhalb von 2 °C gehalten wird (G7, 2015).

2.2 Biogas als Baustein des Energiemixes

Die Energiewende bezeichnet die Entwicklung von fossilen Energieträgern sowie von Kernenergie in Richtung erneuerbarer Energien und Energieeffizienz. Der nach der Reaktorkatastrophe von Fukushima im Jahre 2011 durch die deutsche Bundesregierung beschlossene Atomausstieg zielt auf das Jahr 2022. Erneuerbare Energien sollen im Jahr 2030 30 % des Bruttoendenergieverbrauchs Deutschlands einnehmen. Außerdem besteht das Ziel, die jährlichen Treibhausgasemissionen gegenüber dem Jahr 1990 um 55 % (2030), 70 % (2040) bzw. 80-95 % (2050) zu reduzieren (BMW, 2013). Um diese ambitionierten Ziele zu erreichen, verfolgt die Bundesregierung eine Verbesserung von Energieverbrauch und Effizienz (insbesondere Gebäudebereich, Verkehr), die Anpassung der Organisation des Strommarktes, den Ausbau der Netzinfrastruktur, die Berücksichtigung der Energiepreise und -Kosten, die Förderung der Energieforschung, sowie den Ausbau der erneuerbaren Energien (BMW, 2014). Der letzte Punkt stellt dabei die zentrale Säule der Energiewende dar.

Hinsichtlich des Primärenergieverbrauchs in Deutschland machten erneuerbare Energien im Jahr 2014 einen Anteil von 11,1 % aus (BMW, 2015b). Biogas steuerte im Jahr 2012 15,1 % der Stromerzeugung und 7,8 % der Wärmebereitstellung aus erneuerbaren Energien bei. 7515 Biogasanlagen (BGA) in Deutschland (Stand Ende 2012) verkörpern das Konzept der dezentralen Energieerzeugung. Die ökonomische Struktur des ländlichen Raumes wird gestärkt und die Risiken zentral organisierter Energieerzeugung gesenkt. Die installierte Leistung der 7515 BGA von 3352 MW übersteigt die von 5 Kohle- oder 2 Atomkraftwerken. Dabei gilt das technische Potenzial von Biogas, insbesondere im landwirtschaftlichen Sektor, als noch längst nicht ausgeschöpft (FNR, 2013a).

Biogas kann auf vielfältige Weise genutzt werden (Abbildung 1). Der Weg über die Verbrennung in Blockheizkraftwerken liefert Strom und Wärme. Alternativ kann aufbereitetes Biogas als Biomethan in das Erdgasnetz eingespeist werden und so als Quelle für Strom, Wärme oder Biokraftstoff genutzt werden. Darüber hinaus liefert die Möglichkeit der Speicherung von Biogas einen wichtigen Zusatz an Flexibi-

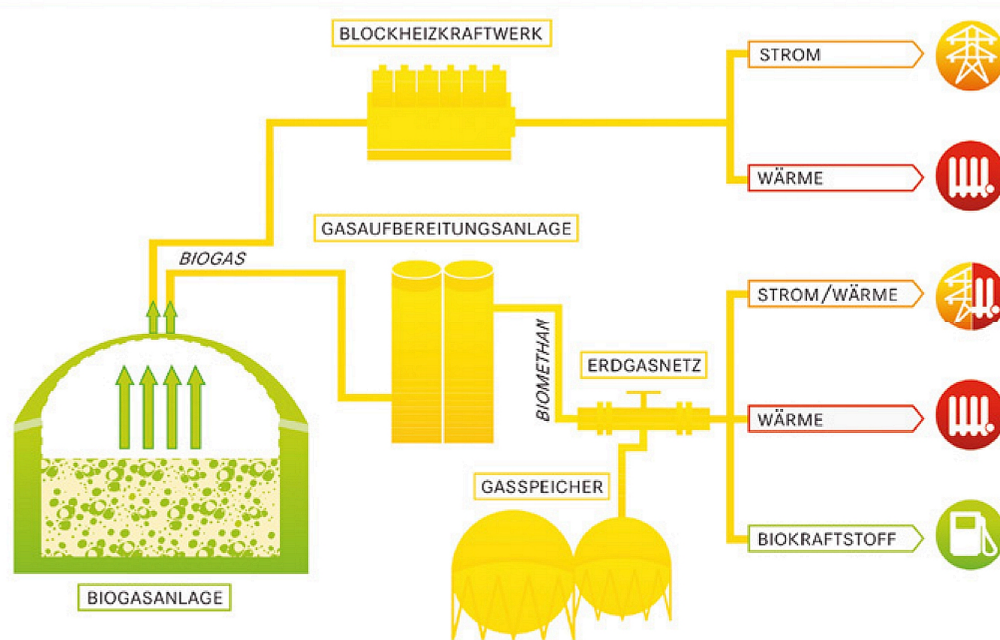


Abbildung 1: **Nutzungsmöglichkeiten von Biogas.**
(FNR, 2013a, Druckerlaubnis erhalten am 13.07.2015).

lität. Unterschiedliche Energiespeicher-Technologie werden derzeit bezüglich einer optimalen Lastenverteilung erforscht (Mahlia et al., 2014). Während elektrische Energiespeicher (Batterien) insbesondere hinsichtlich Kostenaufwand und Sicherheit noch Entwicklungsbedarf aufweisen (Dunn et al., 2011), bietet die Möglichkeit der Nachfrage-orientierten Energiebereitstellung durch Biogas-Speicherung und angepasste Biogas-Produktion eine attraktive Zusatzoption der Energiegewinnung aus Biomasse (Hahn et al., 2014). Zudem ist die Biogasproduktion unabhängig von Tageszeit, Sonneneinstrahlung sowie Windaufkommen und damit ein sinnvoller Baustein im Energiemix der erneuerbaren Energien (FNR, 2013a).

Neben den Vorteilen von Biogas existieren auch Kritikpunkte. Als Beispiel sei der Anbau von Monokulturen wie Mais genannt. Hier wird versucht, der Vereinheitlichung der Landwirtschaft durch die Etablierung sinnvoller Fruchtfolgen zu entgehen und so neben der Biodiversität auch die Bodenregeneration zu fördern (FNR, 2013b). Des Weiteren existiert Forschung über alternative Energiepflanzen und Mischfruchtanbau (Zegada-Lizarazu and Monti, 2011; FNR, 2012; González-García et al., 2013). Im Endeffekt erfordert die Energiewende neben der Erschließung alternativer Energieproduktion auch die Optimierung der neuen Produktionswege, um die Nachhaltigkeitsziele

erreichen zu können. Die Forschung spielt dabei eine wichtige Rolle.

2.3 Mikrobiologie der Biogasbildung

Biogas entsteht als Produkt des anaeroben Abbaus von Biomasse. Das Ausgangsmaterial ist von komplexer Zusammensetzung und enthält große Anteile an Eiweiß, Kohlenhydraten und Fetten. Der mikrobielle Abbau erfolgt schematisch in vier Stufen (Abbildung 2):

- 1 - **Hydrolyse**, Spaltung der polymeren Ausgangsmaterialien in niedermolekulare Einheiten (z. B. Monomere)
- 2 - **Acidogenese**, primäre Vergärung der Hydrolyse-Produkte zu kurzkettigen Fettsäuren, CO₂ und H₂, sowie weiteren Fermentationsprodukten (z. B. Alkoholen)
- 3 - **Acetogenese**, sekundäre Vergärung der Fermentationsprodukte zu Acetat, CO₂ und H₂
- 4 - **Methanogenese**, Verwertung von Acetat, H₂/ CO₂ und Methanol zur Bildung von Methan

Das Schema stellt eine Vereinfachung der Verhältnisse dar. Das tatsächliche Geschehen in einem Biogasfermenter ist von einer Vielzahl chemischer Parameter (u. a. pH-Wert, Temperatur, Substratzusammensetzung, Hemmstoffe, Redoxpotential, Spurenelemente), biochemischer Reaktionen und mikrobiologischer Assoziationen geprägt, die alle räumlich und zeitlich parallel Einfluss nehmen und statt finden (FNR, 2013b).

2.3.1 Hydrolyse

Hydrolytische Bakterien produzieren Enzyme, welche die Zerkleinerung der polymeren Ausgangsstoffe durchführen. Neben Cellulose, Fettsäuren und Proteinen können beispielsweise auch Hemicellulosen, Stärke, Pektine sowie Lignocellulose und Lignin hydrolysiert werden (Deublin and Steinhauser, 2008). Der Abbau der letztgenannten erfolgt nach aktuellem Kenntnisstand jedoch nur unter aeroben Bedingungen (Bugg et al., 2011; Brown and Chang, 2014). Häufig wirkt eine Mischung spezifischer Enzyme zusammen, die von verschiedenen Bakterien und auch Pilzen teilweise als Exoenzyme gebildet werden, um die Polymere zu zerkleinern. Die Komplexität kann dabei beträchtlich sein (Burns et al., 2013). Bei den Enzymen handelt es sich im Prinzip um Hydrolasen, folglich Enzyme, die verschiedene kovalente Bindungen in reversibler

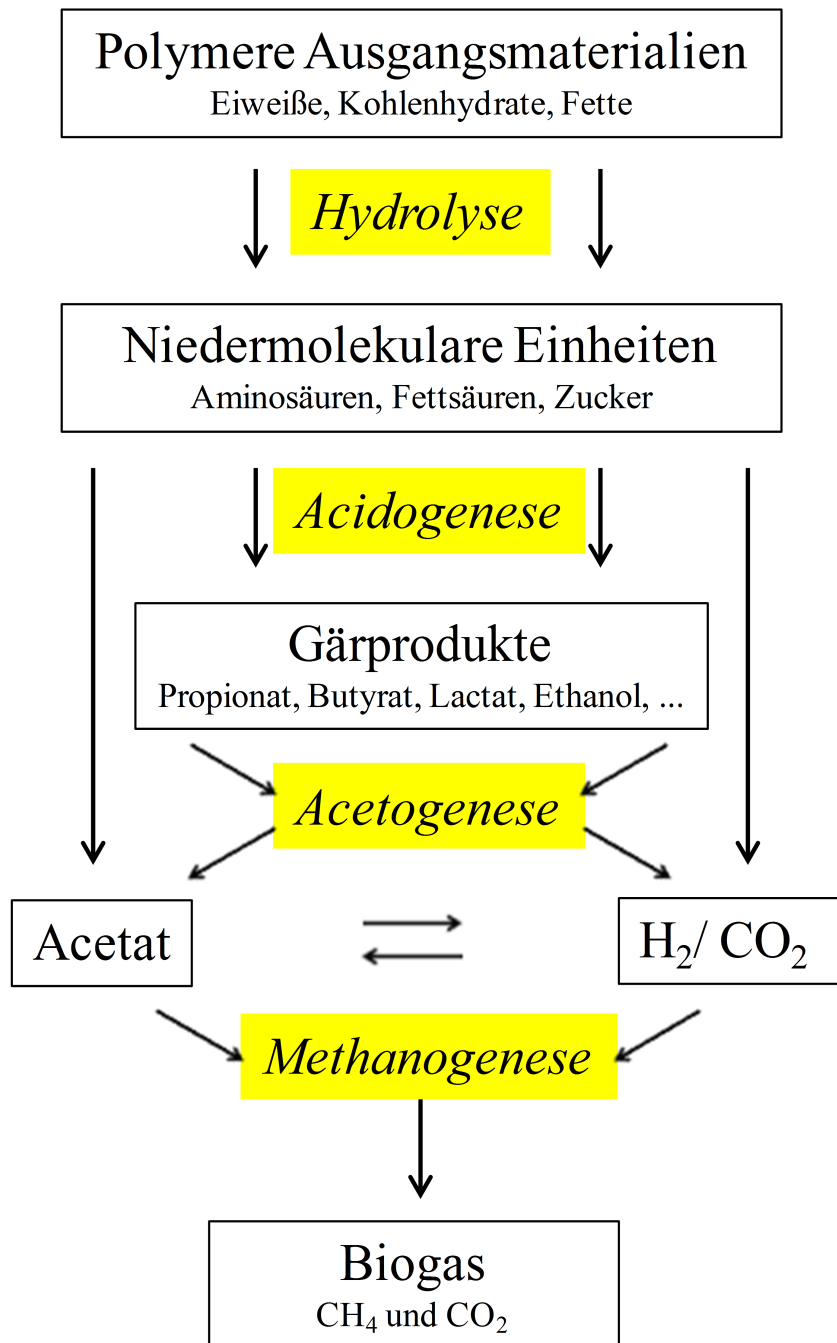


Abbildung 2: Schematische Darstellung des anaeroben Abbaus.

Reaktion mit Wasser spalten. Diese Hydrolasen können jedoch in übergeordnete Proteinstrukturen integriert sein (Fontes and Gilbert, 2010, Cellulosomen). Viele primäre Gärer produzieren hydrolytische Enzyme und sind somit sowohl in Phase 1 (Hydrolyse), als auch in Phase 2 (Acidogenese) involviert. Zu ihnen gehören beispielsweise Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Clostridium* (Deublin and Steinhauser, 2008).

2.3.2 Acidogenese

Die Acidogenese ist geprägt von der Verwertung der Hydrolyse-Produkte. Fakultativ anaerobe oder strikt anaerobe Bakterien vergären die energiereichen Substrate (z. B. Zucker, Aminosäuren) zu niederen Fettsäuren, Alkoholen, CO₂ und H₂, sowie weiteren Gärprodukten wie Lactat oder Glycerin. Unter den kurzkettigen Fettsäuren sind Propionsäure und Buttersäure von besonderer Bedeutung (Tabelle 1). Es werden aber auch Valerian-, Isovalerian- oder Capronsäure gebildet. Als Beispielgattungen können die oben genannten (siehe Hydrolyse) dienen, sowie Vertreter der Gattungen *Lactobacillus* oder *Propionibacterium* (Deublin and Steinhauser, 2008).

2.3.3 Acetogenese

Die Produkte der primären Gärungen (Acidogenese) stellen die Substrate der sekundären Gärer dar. Zu ihnen gehören beispielsweise Vertreter der Gattungen *Aminobacterium*, *Desulfovibrio*, *Pelotomaculum*, *Syntrophomonas* oder *Syntrophobacter* (Deublin and Steinhauser, 2008; McInerney et al., 2008). Diese verwerten genannte Fettsäuren und Alkohole im Rahmen der Acetogenese zu Acetat (Tabelle 1). Sie werden auch als (heterotroph) acetogene Bakterien bezeichnet. Die acetogene Verwertung einiger ihrer Substrate (z.B. Benzoesäure, Buttersäure, Propionsäure, Ethanol) ist unter Standardbedingungen endergon (Thauer et al., 1977). Zur effizienten Verwertung dieser energiearmen Substrate haben sich syntrophe Stoffwechselfgemeinschaften aus acetogenen Bakterien und Methanbakterien gebildet (siehe Abschnitt 2.4, S. 17). Um die acetogenen Reaktionen durchführen zu können, generieren die Mikroorganismen einen niedrigen Wasserstoffpartialdruck ($5E^{-4}$ atm), den sie aufrecht erhalten (Schmidt and Ahring, 1993). Dieser kann jedoch nicht beliebig gering sein, da die Wasserstoff-verwertenden hydrogenotrophen Methanbakterien höhere Werte als $6,4E^{-5}$ atm zur Bildung von Methan benötigen (Lovley, 1985). Daraus ergibt sich ein schmales Energiefenster, in dem diese Reaktionen in Syntrophie stattfinden können. Ebenfalls von Bedeutung sind autotroph acetogene Mikroorganismen, sogenannte

Homoacetogene (Kim and Gadd, 2008, z. B. *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa* spp.). Sie konkurrieren mit Methanbakterien um die Produkte der heterotroph acetogenen Bakterien, CO₂ und H₂ (Kotsyurbenko et al., 2001; Siriwongrungson et al., 2007). Da sie zusätzlich zu einem breiten Substratspektrum mit niedrigen Wasserstoffpartialdrücken zurechtkommen und von hohen Drücken nicht inhibiert werden, sind sie weniger stressanfällig als heterotroph acetogene und methanogene Mikroorganismen (Saady, 2013). Sind externe Elektronenakzeptoren wie Sulfat oder Nitrat verfügbar, so können die energiearmen Substrate der sekundären Gärer anaerob veratmet werden (Tabelle 1, siehe auch Abschnitt 2.5.3, S.26). Diese Reaktionen stehen somit ebenfalls in Konkurrenz zur Methanbildung und sind daher im Zuge der Biogasproduktion unerwünscht (Achnich et al., 1995).

2.3.4 Methanogenese

Die Methanogenese ist schließlich jene Phase, in der Methanbakterien Methan bilden. Neben hydrogenotrophen Methanbakterien (z. B. *Methanoculleus*), denen H₂ und CO₂ zur Methanogenese dienen, wird Acetat von acetiklastischen Methanbakterien (z. B. *Methanosaeta*) verwendet. Vertreter der Gattung *Methanosarcina* sind darüber hinaus in der Lage, sowohl hydrogenotroph, als auch acetiklastisch Methan zu bilden (Abbildung 3). Während die hydrogenotrophe Reaktion unter Standardbedingungen deutlich mehr Freie Energie liefert als die acetiklastische Reaktion, kann sich das Verhältnis unter Bedingungen niedrigen Wasserstoffpartialdrucks deutlich verändern (Tabelle 1). Des Weiteren gibt es Arten, die auch aus Formiat, Methanol und weitere Alkoholen, aus Methanthiol und Dimethylsulfid, sowie aus Methylaminen und weiteren Substanzen Methan bilden können (Demirel and Scherer, 2008; Deublin and Steinhauser, 2008). Die kontinuierliche Methanogenese ist Voraussetzung für den reibungslosen Prozess der Biogasproduktion. Ist die Methanogenese gestört, beispielsweise durch einen zu geringen pH-Wert (< pH 6,5), so resultiert die Akkumulation von niederen Fettsäuren und Acetat, was sich wiederum senkend auf den pH-Wert und damit negativ auf die Methanogenese auswirkt. In diesem Fall können externe Maßnahmen notwendig werden, um diesen negativen Kreislauf zu unterbrechen und den Prozess zu restabilisieren (FNR, 2013b).

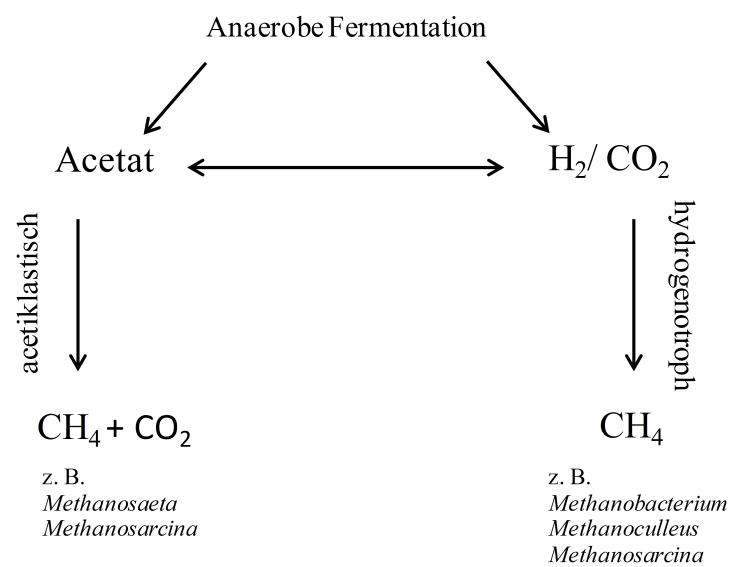


Abbildung 3: **Methanogenese als letzte Phase der Biogasbildung.**

Acetiklastisch: Methanbildung aus Acetat, hydrogenotroph: Methanbildung aus H₂/CO₂.

Tabelle 1: **Anaerobe Reaktionen im Zuge der Biogasbildung.**

$\Delta G^{öko}$: Werte aus und nach Zinder (1984) für anaerobe Ökosysteme (anoxic freshwater ecosystem) mit 1 mmol/L Acetat, Butyrat, Propionat, Lactat und Ethanol, 2,5 μ mol/L Formiat (Boone et al., 1989), 20 mmol/L HCO_3^- , 10 μ mol/L Glucose, 0,6 atm CH_4 und 10^{-4} atm H_2 . ΔG in kJ/Rkt.

Reaktion	$\Delta G^{0'}$	$\Delta G^{öko}$
acidogene Reaktionen		
(1) Glucose + 2 H_2O	→ Butyrat ⁻ + 2 HCO_3^- + 3 H^+ + 2 H_2	-254,5 ^e -310,3 ^f
(2) Glucose + H_2O	→ Lactat ⁻ + Ethanol + HCO_3^- + 2 H^+	-211,9 ^e -227,9 ^f
(3) 3Lactat	→ 2Propionat ⁻ + Acetat ⁻ + HCO_3^- + H^+	-165,0 ^e -175,1 ^f
heterotroph acetogene Reaktionen		
(4) Butyrat ⁻ + 2 H_2O	→ 2Acetat ⁻ + H^+ + 2 H_2	+48,1 ^b -17,4 ^b
(5) Propionat ⁻ + 3 H_2O	→ Acetat ⁻ + HCO_3^- + H^+ + 3 H_2	+76,1 ^b -5,4 ^b
(6) Ethanol + H_2O	→ Acetat ⁻ + H^+ + 2 H_2	+9,6 ^a -37,9 ^f
autotroph (homo)acetogene Reaktion (red., ox.)		
(7) 4 H_2 + 2 HCO_3^- + H^+	→ Acetat ⁻ + 4 H_2O	-104,6 ^b -7,0 ^b
(8) Acetat ⁻ + 4 H_2O	→ 2 HCO_3^- + H^+ + 4 H_2	+7,0 ^b +104,6 ^b
methanogene Reaktionen		
(9) 4 H_2 + HCO_3^- + H^+	→ CH_4 + 3 H_2O	-135,6 ^b -31,6 ^b
(10) Acetat ⁻ + H_2O	→ CH_4 + HCO_3^-	-31,0 ^b -24,5 ^b
(11) 4Formiat ⁻ + H_2O + H^+	→ CH_4 + 3 HCO_3^-	-130,4 ^d -28,9 ^f
Reaktionen unter Sulfatreduktion		
(12) Acetat ⁻ + SO_4^{2-}	→ HS^- + 2 HCO_3^-	-47,3 ^c
(13) Butyrat ⁻ + SO_4^{2-} + 2 H_2 + 6 H_2O	→ 2Acetat ⁻ + HS^-	-103,8 ^c
(14) 2Ethanol + SO_4^{2-}	→ 2Acetat ⁻ + HS^- + 2 H_2O + H^+	-132,7 ^c
(15) Propionat ⁻ + SO_4^{2-} + H_2	→ HS^- + HCO_3^- + Acetat ⁻ + H_2O	-75,8 ^c

^a(Thauer et al., 1977), ^b(Zinder, 1984), ^c(Liamlean and Amnachhatre, 2007), ^d(Deublin and Steinhauser, 2008),

^eerrechnet nach $\Delta G = \sum \Delta G_f(\text{Produkte}) - \sum \Delta G_f(\text{Edukte})$ (Cypionka, 2010), ^ferrechnet nach $\Delta G' = \Delta G^{0'} + 5,94 \log \frac{C_{\text{Edukte}}}{C_{\text{Produkte}}}$ (Zinder, 1984).

2.4 Syntrophie

2.4.1 Definition von Syntrophie

Unter Syntrophie versteht man die gegenseitige metabolische Abhängigkeit unterschiedlicher Spezies, welche ein Substrat in Kooperation verwerten (Schink and Stams, 2013). Als Beispiel sei die Verwertung von Propionat durch *Pelotomaculum schinkii* und *Methanospirillum hungatei* genannt (de Bok et al., 2005). Während *P. schinkii* die Oxidation der Säure zu Acetat durchführt, sorgt der methanogene Partner dafür, dass der entstehende Wasserstoff laufend entsorgt und somit die Reaktion energieliefernd durchgeführt werden kann (detailliert erklärt in Abschnitt 2.5, S. 21). Keine der beiden Spezies ist in der Lage das Substrat ohne den Partner abzubauen, weshalb es sich hier um einen Fall obligater Syntrophie handelt. Andere Spezies sind fakultativ syntroph und verwerten ein Substrat sowohl in Reinkultur, als auch in syntropher Co-Kultur, jedoch hinsichtlich Wachstum und Stoffwechsel auf jeweils unterschiedliche Weise (Stams and Plugge, 2009). Die Ursache hierfür liegt darin, dass der syntrophe Partner durch die Entsorgung von Reduktionsäquivalenten alternative Reaktionswege energetisch möglich macht. Insofern wird Syntrophie besonders unter energetisch stark limitierten Bedingungen beobachtet. Wenn sowohl aerobe Atmung, als auch alternative Wege der anaeroben Atmung nicht verfügbar sind, wird der energetisch ungünstigere Abbauweg, die Reduktion von CO₂ zu Methan in Syntrophie durchgeführt (Schink and Stams, 2013). So werden auch energiereiche Substrate wie beispielsweise Glucose syntroph in Kooperation mit methanogenen Archaea verwertet (Müller et al., 2008). Da der Begriff der Syntrophie gelegentlich unterschiedlich interpretiert wird, führten Morris et al. (2013) die Bezeichnung *obligat mutualistischer Stoffwechsel* ein. Dieser betont den übergeordnet metabolischen Prozess, von dem die beteiligten Mikroorganismen profitieren.

2.4.2 Beispiele von Syntrophie

Neben den oben genannten Beispielen zur Verwertung von Propionat und Glucose werden eine Reihe weiterer Substanzen syntroph umgesetzt. Darunter fallen Alkohole, Aminosäuren, aromatische Verbindungen, Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe, sowie weitere organische Säuren und Zucker (Sieber et al., 2012; Schink and Stams, 2013). Einige Beispiele sollen im Folgenden die Vielfältigkeit syntropher Stoffwechselbeziehungen verdeutlichen.

So verwertet *Desulfovibrio vulgaris* **Laktat** und **Ethanol** in Abwesenheit von Sulfat syntroph in Gemeinschaft mit *Methanosarcina barkeri* bzw. *Methanobacterium for-*

micicum. In Reinkultur wächst die Art ebenfalls auf diesen Substraten, jedoch nur in Gegenwart von Sulfat, das im Rahmen der Sulfatatmung reduziert wird (Bryant et al., 1977; McInerney and Bryant, 1981).

Buttersäure wird beispielsweise von *Syntrophomonas wolfei* als Substrat genutzt. *Desulfovibrio* sp. G11 oder *Methanospirillum hungatei* wurden hier als Wasserstoff konsumierende Partner identifiziert (McInerney et al., 1981). Während die Fermentation von Buttersäure zu Acetat und Wasserstoff unter Standardbedingungen endergon ist ($\Delta G^{0'} = +48,1$ kJ/mol), liefert die Reaktion unter realen Umweltbedingungen bei einem Wasserstoffpartialdruck von 10^{-4} atm Freie Energie in Höhe von $\Delta G = -17,4$ kJ/mol (Zinder, 1984).

Auch **Acetat** wird unter gegebenen Bedingungen syntroph oxidiert (Nüsslein et al., 2001; Müller et al., 2013, 2015). Syntroph Acetat oxidierende Bakterien (SAOB) oxidieren Acetat unter Bildung von CO_2 und H_2 , die von hydrogenotrophen Archaea laufend zu Methan umgesetzt werden. Obwohl Acetat im Zuge der acetiklastischen Methanogenese energetisch günstiger direkt in Methan umgesetzt werden kann (Thauer et al., 1977), können die Umweltbedingungen (Acetat- und Ammonium-Konzentration, Temperatur, Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft) dazu führen, dass der Methanbildung durch SAOB und hydrogenotrophe Methanbakterien eine bedeutende Rolle zukommt (Ahring et al., 1993; Schnürer and Nordberg, 2008; Westerholm et al., 2012). Bisher wurden fünf SAOB isoliert. Phylogenetisch gehören mit *Clostridium ultunense* (Schnürer et al., 1996), *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm et al., 2010), *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Westerholm et al., 2011) und *Thermacetogenium phaeum* (Hattori et al., 2000) vier davon zum Phylum der Firmicutes und mit *Thermotoga lettingae* (Balk et al., 2002) einer zu den Thermotogae.

Neben den beschriebenen Gärprodukten werden auch **Aminosäuren** syntroph abgebaut. Dabei handelt es sich um eine oxidative Desaminierung, bei der die Reduktionsäquivalente durch einen H_2 konsumierenden Partner entsorgt werden. Je nach Verfügbarkeit kommen hierfür Sulfatreduzierer, hydrogenotrophe Methanbakterien oder homoacetogene Bakterien in Frage (Schink and Stams, 2013). Auf den syntrophen Partner kann unter Umständen verzichtet werden, indem die oxidative Desaminierung an die Reduktion einer weiteren Aminosäure gekoppelt wird (Stickland-Reaktion). Während mit *Eubacterium acidaminophilum* ein Organismus bekannt ist, der Aminosäuren (Alanin und Glycin) sowohl syntroph, als auch via Stickland-Reaktion verwerten kann (Zindel et al., 1988), wurde mit *Aminobacterium colombiense* eine syntrophe Spezies beschrieben, für die keine Stickland-Reaktion nachgewiesen werden konnte (Baena et al., 1998b).

2.4.3 Phylogenie syntropher Bakterien

Die gegenseitige Abhängigkeit syntropher Organismen voneinander und das häufig langsame Wachstum künstlich isolierter Co-Kulturen erschweren die Kultivierung und biochemische Charakterisierung dieser Spezies (Schink and Stams, 2013). So kann die Verdoppelungszeit, wie im Fall von *Pelotomaculum schinkii* beobachtet, 7 Tage betragen (de Bok et al., 2005). Zwar lassen sich die Organismen teilweise mit alternativen Substraten (beispielsweise Pyruvat anstelle von Propionat) reinkultivieren, syntrophe Stoffwechselanalysen erfordern dennoch die Analyse definierter Co-Kulturen. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass erst ein geringer Anteil der syntroph aktiven Bakterien kultiviert und beschrieben worden ist. Diese gehören überwiegend den Phyla der Firmicutes, Proteobacteria und Synergistetes an (Sieber et al., 2012). Mit *Thermotoga lettingae* wurde auch eine syntrophe Spezies des Phylums Thermotogae beschrieben (Balk et al., 2002). Zusätzlich wurden Thermotoga-assoziierte Gene gefunden, welche eine Beteiligung an der syntrophen Oxidation von Butyrat vermuten lassen (Lykidis et al., 2011). Dazu kommt mit "*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*" ein phylogenetisch unklassifizierter Vertreter (candidate division WWE1), dessen Zuordnung als syntrophe Spezies bisher lediglich auf der Analyse seines Genoms beruht (Pelletier et al., 2008).

Innerhalb der Firmicutes spielen besonders Vertreter der Familien der *Peptococaceae* (z.B. *Desulfotomaculum* sp., *Pelotomaculum* sp.) *Syntrophomonadaceae* (z.B. *Syntrophomonas* sp.) und *Thermoanaerobacteraceae* (z.B. *Syntrophaceticus* sp., *Tepidanaerobacter* sp., *Thermacetogenium* sp.) eine Rolle. Bei den Proteobacteria sind es vorwiegend Vertreter der δ -Proteobacteria, welche nachweislich syntroph aktiv sind. Darunter fallen beispielsweise Spezies der Gattungen *Desulfovibrio* oder *Syntrophobacter* (Sieber et al., 2012).

2.4.4 Organisation der Syntrophie

Syntroph kooperierende Stoffwechselgemeinschaften sind in der Lage thermodynamisch extrem ungünstige Bedingungen für ihren Wachstums- und Energiestoffwechsel auszunutzen. In diesem Zusammenhang haben sie Fähigkeiten erworben, welche es ihnen ermöglichen, folgende Hindernisse zu bewältigen: (1) Nutzung geringster Mengen Freier Energie im Bereich von -20 kJ/mol (Schink, 1997) und niedriger (Scholten and Conrad, 2000; Hoehler et al., 2001; Jackson and McInerney, 2002), (2) Übertragung von Elektronen auf die Partnerspezies (de Bok et al., 2004; Stams and Plugge, 2009) und (3) Koordinierung des Stoffwechsels zwischen kooperierenden

Spezies (Kato et al., 2009; Kato and Watanabe, 2010; Benomar et al., 2015).

Ein zentrales Konzept für (1) ist das des reversen Elektronentransports. Dieser beinhaltet den Elektronentransport einer exergonen Reaktion, jedoch in entgegengesetzter Richtung und ermöglicht auf diese Weise die Durchführung endergoner Einzelreaktionen. Hierbei investiert ein Organismus Energie, damit entscheidende Redox-Reaktionen durchgeführt werden können, die unter biologisch relevanten Bedingungen in jedem Fall endergon sind (Schink, 1997). Als Beispiel sei die Reaktion von Succinat zu Fumarat im Zuge der syntrophen Propionat-Oxidation genannt, dessen Freie Energie unter Standardbedingungen $\Delta G^{0'} = +82$ kJ/mol beträgt. Aktuell geht man davon aus, dass die Oxidation von Succinat mit einer Reduktion von Menachinon einhergeht, dessen Oxidation mit der membran-gebundenen Bildung von H_2 (Hydrogenase) oder Formiat (Formiat-Dehydrogenase) gekoppelt ist (Stams and Plugge, 2009; Sieber et al., 2012). Die benötigte Energie wird hier in Form von ATP bzw. eines Ionengradienten investiert (Van Kuijk et al., 1998; Schirawski and Unden, 1998). Weitere Formen zur Überwindung endergoner Reaktionen sind electron bifurcation und dessen Umkehrung, electron confurcation. Dabei handelt es sich um gekoppelte Redoxreaktionen, bei denen eine stark exergone Reaktion den endergonen Elektronentransfer der gekoppelten Reaktion ermöglicht (Müller et al., 2010; Buckel and Thauer, 2013; Schoepp-Cothenet et al., 2013).

(2) Die für syntrophe Prozesse charakteristische Übertragung von Elektronen zur kooperierenden Partnerspezies (interspecies electron transfer) kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Untersuchungen belegen die Beteiligung von H^+ / H_2 und CO_2 / Formiat (Dong and Stams, 1995). Darüber hinaus können aber auch andere Substanzen als Überträger dienen. Hierfür kommen Cystein/ Cystin (Kaden et al., 2002), Substanzen des Schwefelkreislaufes (Warthmann et al., 1992) oder auch Humine in Frage (Lovley et al., 1996). Weitere Studien geben Hinweise darauf, dass auch die Möglichkeit des direkten Elektronentransfers besteht. Dabei werden die Elektronen über elektronenleitende Pili oder Nanowires übertragen (Lovley, 2012; Kouzuma et al., 2015). Eine Voraussetzung für effizienten Elektronentransfer, sowohl im Fall von Pili oder Nanowires, als auch mittels elektronenübertragenden Substanzen ist räumliche Nähe. So ist die Übertragungsrates optimal, wenn die beteiligten Organismen direkten Kontakt zueinander aufweisen (Ishii et al., 2005; Felchner-Zwirrello et al., 2013). Des Weiteren wird hierdurch der Austausch weiterer Metabolite erleichtert (Warikoo et al., 1996, z. B. Acetat). Aus diesem Grund tendieren syntrophe Stoffwechselgemeinschaften zur Bildung von Zellaggregaten, die von den verschiedenen kooperierenden Spezies gebildet werden (Gonzalez-Gil et al., 2001; Díaz et al., 2006).

(3) Der Koordination und Regulation von Syntrophie zwischen unterschiedlichen Spezies (interspecies interactions) wird eine bedeutende Rolle zugesprochen (Benomar et al., 2015; Kouzuma et al., 2015). So wurden Hinweise gefunden, dass *Pelotomaculum thermopropionicum* Flagellum-Proteine (FliC, FliD) nutzt, um seinen syntrophen Partner zunächst an sich zu binden und in einem zweiten Schritt die Übertragung von Signalen zu steuern (Shimoyama et al., 2009; Kato and Watanabe, 2010). Des Weiteren konnte mittels Transkriptom-Analyse gezeigt werden, dass *P. thermopropionicum* seinen Stoffwechsel hinsichtlich syntropher Partner und Wachstumssubstrate entsprechend anpasst (Kato et al., 2009). Genregulative Änderungen wurden auch bei *Desulfovibrio vulgaris* beobachtet, wenn dieser seinen Stoffwechsel von Syntrophie auf Sulfatatmung umstellte (Plugge et al., 2010). PAS Domänen in den Genomen syntropher Organismen lassen außerdem auf eine Sensibilität hinsichtlich sich verändernder Umweltbedingungen schließen (McInerney et al., 2009).

2.5 Oxidation von Propionat

Der optimale Betrieb einer Biogasanlage erfordert eine stabile Methanproduktion. Da die Akkumulation von Propionsäure als Folge von Hemmstoffen oder überhöhter Raumbelastung den Prozess nachhaltig stören kann (FNR, 2013b), ist der mikrobielle Abbau dieser Substanz von besonderem Interesse (Gan et al., 2012; Ban et al., 2013, 2015). Die Akkumulation führt zunächst zu einem Absinken des pH-Wertes und in dessen Folge zu einer Hemmung der Methanogenese, was in wirtschaftlich betriebenen Anlagen finanzielle Verluste zur Folge hat. Bricht die anaerobe Fermentation komplett zusammen, kann es zu einer vorübergehenden Stilllegung kommen, die mit hohen Kosten verbunden ist (FNR, 2013b).

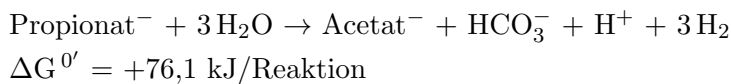
Mit einem pK_S von 4,87 (Lide, 2004) ist Propionsäure eine schwache Säure. Bei einem pH-Wert von 7 liegen mehr als 99 % der Moleküle dissoziiert vor ($pH = pK_S + \log \frac{[CH_3CH_2COO^-]}{[CH_3CH_2COOH]}$). Aus diesem Grund wird im Verlauf der Arbeit überwiegend von Propionat gesprochen. Die Oxidation von Propionat kann auf unterschiedlich Art und Weise erfolgen. Dabei ist es entscheidend, welche Elektronen-Akzeptoren vorliegen. Neben Sauerstoff können beispielsweise Nitrat (NO_3^-), Eisen in Form von Fe(III) oder Sulfat (SO_4^{2-}) im Zuge der Propionat-Oxidation reduziert werden (siehe Abschnitt 2.5.3, S. 26). Sind keine externen Elektronenakzeptoren verfügbar, welche energiebringend reduziert werden können, so übernehmen Methanbakterien die Rolle des finalen Entsorgers der Elektronen über die Reduktion von CO_2 zu CH_4 (Syntrophie). Die Elektronen werden dabei zwischen den verschiedenen Spezies

transferiert (siehe Abschnitt 2.4.4, S. 19).

2.5.1 Energetik der Propionat-Oxidation in Syntrophie

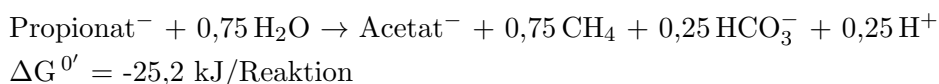
Bei der anaeroben Oxidation von Propionat in Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren wie O_2 , NO_3^- , Fe(III) oder SO_4^{2-} kommt es entweder zur Reduktion von Protonen zu H_2 , von CO_2 zu Formiat oder zur direkten Übertragung der Elektronen mittels Pili oder Nanowires zu Methanbakterien, welche schließlich CO_2 zu CH_4 reduzieren (Stams and Plugge, 2009). Die Schwierigkeit der anaeroben Verwertung von Propionsäure liegt darin, dass seine Oxidation ohne den Schritt der Methanogenese zu wenig Freie Energie liefert. So ist die Protonen-reduzierende Reaktion unter biochemischen Standardbedingungen (25 °C, 1 mol/L gelöste Stoffe, 1 bar Gasdruck, pH 7) mit $\Delta G^{0'} = +76,1$ kJ/Rkt endergon (Thauer et al., 1977).

Reaktion der Propionat-Oxidation



Unter Anpassung der Bedingungen für anaerobe Ökosysteme (siehe Tabelle 1 auf S. 16) wird die Reaktion exergon (Zinder, 1984). Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Wasserstoffpartialdruck. Folglich bedingt die Oxidation von Propionsäure die laufende Verwertung des anfallenden Wasserstoffs bzw. der entsprechenden Elektronen. Während unter Laborbedingungen gezeigt wurde, dass dies unter der Zugabe von Chemikalien (Stams et al., 1993, Fumarat) und mittels Amperometrie (Emde and Schink, 1990) erreicht werden kann, wird der Wasserstoff-Partialdruck unter methanogenen Bedingungen hauptsächlich durch die syntrophe Aktivität methanogener Archaea gering gehalten. So ergibt sich für die unvollständige Oxidation von Propionat in Syntrophie mit hydrogenotrophen Methanbakterien eine Freie Energie unter Standardbedingungen von $\Delta G^{0'} = -25,2$ kJ/Reaktion (errechnet nach $\Delta G = \sum \Delta G_f(\text{Produkte}) - \sum \Delta G_f(\text{Edukte})$ mit den Werten der Bildungsenthalpien aus Thauer et al. (1977); Cypionka (2010)).

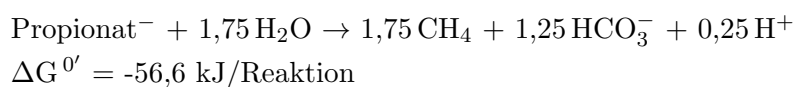
Reaktion der unvollständigen Propionat-Oxidation in Syntrophie



Neben Methanbakterien kann der Wasserstoff-Partialdruck auch durch die syntrophe Aktivität denitrifizierender, Eisen- oder Sulfat-reduzierender, sowie homoacetogener Bakterien niedrig gehalten werden (siehe Heimann et al. (2010) und Abschnitt 2.5.3, S. 26).

Die komplette Oxidation erfordert zudem die Verwertung von Acetat mittels acetiklastischer Methanbakterien, so dass unter Standardbedingungen insgesamt eine Freie Energie in Höhe von $\Delta G^{0'} = -56,6$ kJ/Reaktion (etwa 1 ATP) zur Verfügung steht (Stams, 1994).

Reaktion der vollständigen Propionat-Oxidation in Syntrophie



Für die Verwertung von 4 mol Propionat ergibt sich folglich: $4\text{Propionat}^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Die Verwertung in Dreifachkultur mit dem Propionat-Verwerter und je einer Spezies hydrogenotropher und acetiklastischer Methanbakterien (Abbildung 4) verläuft am effizientesten, was darauf hinweist, dass neben dem niedrigen Wasserstoff-Partialdruck eine geringe Acetat-Konzentration für die Propionat-Verwertung günstig ist (Dong et al., 1994; Liu et al., 1999). Ebenso ist zu erwarten, dass das Entweichen von CO_2 und CH_4 förderlich ist.

2.5.2 Biochemie der Propionat-Oxidation in Syntrophie

Zwei biochemische Abbauwege von Propionat in Syntrophie sind bekannt. Zum einen der Methylmalonyl-CoA-Weg (MMC-Weg), der als der häufigere Abbauweg angesehen wird (Li et al., 2012), und der C-6-Dismutations-Weg, welcher nur von *Smithella propionica* bekannt ist. Dieser von de Bok et al. (2001) vorgeschlagene Weg verläuft über die Kondensation zweier Propionat-Moleküle zu einem C-6-Produkt, welches nach einer Methylgruppen-Umlagerung zu Butyrat und Acetat disproportioniert wird. Das Butyrat wird in Folge zu 2 mol Acetat abgebaut, so dass aus 2 mol Propionat 3 mol Acetat entstehen. Der MMC-Weg beginnt mit der Aktivierung von Propionat und der folgenden Carboxylierung zum namensgebenden Methylmalonyl-CoA, welches ein Zwischenprodukt in Richtung Succinyl-CoA darstellt. Es folgt die Hydrolyse dieses CoA-Esters, wobei das anfangs investierte ATP wiedergewonnen wird und Succinat entsteht. Die folgende Oxidation von Succinat zu Fumarat ist die energetisch ungünstigste Reaktion des Abbaus. Unter Standardbedingungen besträgt

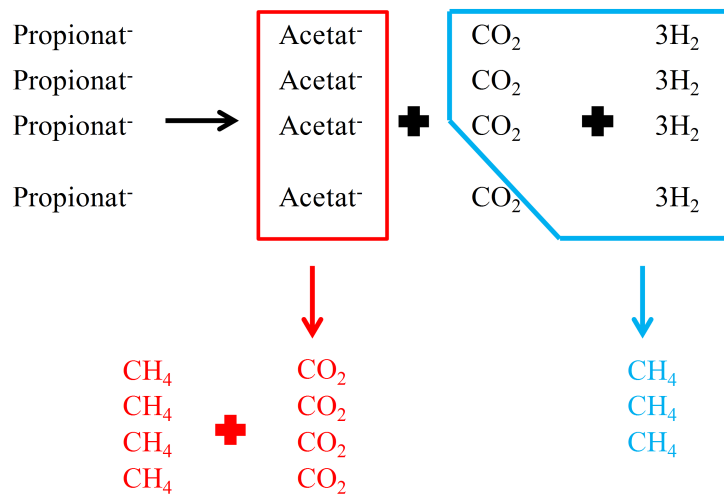


Abbildung 4: **Syntrophen Verwertung von Propionat in Dreifachkultur.**

Vereinfachte Darstellung. Stöchiometrie: $4\text{Propionat}^- + 4\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{CO}_2$ (Schink, 1997, $\Delta G^{0'} = -249 \text{ kJ/Rkt}$). Schwarz: Propionat-Oxidation, **rot**: acetiklastische Methanogenese, **blau**: hydrogenotrophe Methanogenese.

die Freie Energie $\Delta G^{0'} = +82 \text{ kJ/Reaktion}$ (Stams and Plugge, 2009, siehe auch Abschnitt 2.4.4). Ein niedriger Wasserstoffpartialdruck jenseits des für die hydrogenotrophe Methanogenese möglichen wäre notwendig, damit die Reaktion exergon würde (Schink, 1997). Der Überwindung dieser Hürde dient der reverse Elektronentransport (siehe Abschnitt 2.4.4, S. 19). $\frac{2}{3}\text{ATP}$ werden aufgebracht, um im Zuge der Oxidation von Succinat einen Protonengradienten über die Membran aufzubauen und Wasserstoff oder Formiat zu bilden (Van Kuyk et al., 1998), welche daraufhin syntroph entsorgt werden (interspecies electron transfer, siehe Abschnitt 2.4.4, S. 19). Nach folgender Addition von Wasser entsteht aus Fumarat Malat, dessen Oxidation zu Oxalacetat unter Standardbedingungen ebenfalls endergon ist. Es wird angenommen, dass NADH-abhängig über eine Ferredoxin-gekoppelte Hydrogenase Wasserstoff gebildet wird (Stams and Plugge, 2009). Bei der anschließenden Decarboxylierung von Oxalacetat entsteht Pyruvat, das über Acetyl-CoA zu Acetat umgesetzt wird. Derzeit wurde erst eine geringe Anzahl syntroph Propionat-oxidierender Bakterien beschrieben. Dabei handelt es sich sowohl um Vertreter der δ -Proteobacteria, als auch der Clostridia. Aus beiden Klassen wurden Sulfat-reduzierende sowie nicht Sulfat-reduzierende syntroph Propionat-verwertende Organismen isoliert. Tabelle 2 listet die publizierten Isolate syntroph Propionat-oxidierender Spezies auf.

Tabelle 2: Syntroph Propionat-oxidierende Spezies.

D.: *Desulfotomaculum*, *Mb.*: *Methanobacterium*, *Mtb.*: *Methanothermobacter*, *Mtc.*: *Methanothermococcus*, *P.*: *Pelotomaculum*, Red.: Reduktion, *Syn.*: *Syntrophobacter*.

Spezies	syntropher Partner	Substrate in co-Kultur	SO ₄ ²⁻ Red.	Referenz
Proteobacteria (Klasse δ-Proteobacteria)				
<i>Smithella propionica</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i>	But, Fum, Mal, Propionat	-	Liu et al. (1999)
<i>Syn. fumaroxydans*</i>	<i>M. hungatei</i>	Propionat	+	Harmsen et al. (1998)
<i>Syn. pfennigii</i>	<i>M. hungatei</i>	Propionat, PropOH	+	Wallrabenstein et al. (1995)
<i>Syn. sulfatireducens</i>	<i>M. hungatei</i>	Propionat	+	Chen et al. (2005)
<i>Syn. wolinii</i>	<i>M. hungatei</i> oder <i>Desulfovibrio</i> sp.	Propionat	+	Boone and Bryant (1980)
Firmicutes (Klasse Clostridia)				
<i>D. thermocisternum*</i>	<i>Mtc. thermolithotrophicus</i>	Propionat	+	Nilsen et al. (1996)
<i>D. thermobenzoicum</i>	<i>Mb. thermoautotrophicum</i>	Mal, Propionat, Ala, Gly	+	Plugge et al. (2002)
subsp. <i>thermosyntrophicum</i>				
<i>P. propionicicum</i>	<i>M. hungatei</i>	Propionat	-	Imachi et al. (2007)
<i>P. schinkii</i>	<i>M. hungatei</i>	Propionat	-	de Bok et al. (2005)
<i>P. thermopropionicum*</i>	<i>Mtb. thermoautotrophicus</i>	Lac, Propionat, ButOH, EtOH, PentOH,	-	Imachi et al. (2002)
		PropOH, 1,3-PropOH		
		Ethylenglykol		

But: Butyrat, Fum: Fumarat, Lac: Lactat, Mal: Malat, ButOH: Butanol, EtOH: Ethanol, PentOH: Pentanol, PropOH: Propanol.

* Genomsequenzen liegen vor (GenBank ID: NC_008554.1, NZ_JMLG00000000.1 und NC_009454.1)

2.5.3 Propionat-Oxidation unter anaerober Atmung

Sulfat- und Schwefel-reduzierende Bakterien kommen in methanogenen Bioreaktoren neben Methanbakterien vor (Oude Elferink et al., 1994). Sie können in Gegenwart von Sulfat (SO_4^{2-}) oder Schwefel (S^0) Propionat veratmen (Liamleam and Annachatre, 2007). Dabei werden die anfallenden Elektronen auf diese Elektronenakzeptoren übertragen. Die Oxidation kann dabei je nach Spezies sowohl unvollständig zu Acetat, als auch vollständig erfolgen. Beispiele hierfür sind *Desulfobulbus propionicus* (Widdel and Pfennig, 1982, unvollständige Sulfatreduktion), *Desulfovirga adipica* (Tanaka et al., 2000, vollständige Sulfatreduktion) und *Desulfuromusa kysingii* (Liesack and Finster, 1994, vollständige Reduktion elementaren Schwefels). Neben diesen, den δ -Proteobacteria angehörenden Spezies, sind mit *Desulfotomaculum thermocisternum* oder *Desulfotomaculum thermobenzoicum* auch Propionat-verwertende Sulfatreduzierer der Firmicutes bekannt (Tasaki et al., 1991; Nilsen et al., 1996; Plugge et al., 2002). Eine Sonderstellung nehmen solche Sulfat- oder Schwefel-reduzierenden Spezies ein, die ihren Stoffwechsel in Abwesenheit der Elektronenakzeptoren von anaerober Atmung auf Syntrophie umstellen können. Hierzu gehören wiederum Vertreter der δ -Proteobacteria (Chen et al., 2005, z. B. *Syntrophobacter sulfatireducens*), genauso wie Arten der Firmicutes (Plugge et al., 2002, z. B. *D. thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum*). Der Stoffwechsel Sulfat-reduzierender Bakterien (H_2 -Konsum, S^{2-} -Bildung) kann zur Korrosion von Eisen sowie Stahl und damit zu hohen finanziellen Schäden industrieller Anlagen führen (Coetser and Cloete, 2005). Aus diesem Grund sind Betreiber großtechnischer Anlagen bestrebt, das Wachstum Sulfat-reduzierender Organismen einzudämmen (Ahammad et al., 2008).

Fe(III)-reduzierende Bakterien koppeln die Oxidation von Elektronen-Donoren mit der Reduktion von Fe(III). Da das Metallion aufgrund seiner geringen Löslichkeit extracellulär reduziert werden muss, erfolgt die Reduktion entweder in direktem Kontakt mit dem Metall, oder über Elektronen-Mediatoren. Letztere können mikrobieller oder externer Herkunft sein (Luu and Ramsay, 2003, Cytochrome, Humine). Auch Cystein/ Cystin oder Flavin vermittelter Elektronen-Transfer wurde beschrieben (Doong and Schink, 2002; Kotloski and Gralnick, 2013). Externe Elektronen-Mediatoren ermöglichen zudem die indirekte Reduktion von Fe(III) durch Organismen, welche gewöhnlich nicht als Eisen-Reduzierer betrachtet wurden (Schink, 2002). Als Beispiel sei die für die Propionsäure-Gärung bekannte Spezies *Propionibacterium freudenreii*

chii genannt. So konnte gezeigt werden, dass diese Spezies, neben weiteren Gärern, in der Lage ist, Huminsäuren im Zuge der Oxidation verschiedener Substrate zu reduzieren, welche wiederum in der Lage sind, in einem zweiten Schritt Eisen chemisch zu reduzieren (Benz et al., 1998). Die Fe(III) gekoppelte Oxidation von Propionat wurde bei Vertretern der Gattung *Geobacter* (*G. hydrogenophilus*, *G. metallireducens*, δ -Proteobacteria) beobachtet. Neben Propionat können diesen Spezies beispielsweise auch Acetat, Butyrat oder Ethanol als Elektronen-Donatoren dienen (Coates et al., 2001). Die Relevanz Fe(III)-reduzierender Bakterien im Rahmen der Verwertung von Biomasse zu Methan ist Gegenstand aktueller Forschung. So zeigten Rotaru et al. (2014), dass *Methanosaeta harundinacea* Elektronen von *Geobacter metallireducens* über direkten Elektronentransfer (direkt interspecies electron transfer) empfängt. Dies erfolgte während der stöchiometrischen Verwertung von Ethanol zu Methan.

Die Reduktion von Nitrat führt zur Hemmung der Methanogenese (Klüber and Conrad, 1998). Die Ursache hierfür liegt offenbar in der Toxizität der Zwischenprodukte (Roy and Conrad, 1999; Tugtas and Pavlostathis, 2008). So wird Propionat mit Nitrat zwar abgebaut, jedoch auf Kosten der Methanproduktion (Roy and Conrad, 1999). Eine interessante Beobachtung machten Tang et al. (2010). Sie gewannen aus Granulat-Körnern eines Methanreaktors eine Anammox (anaerobe Ammonium Oxidation) aktive Anreicherung mit “*Candidatus Brocadia*” als dominierende Population. Daneben wurde DNA von “*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*” nachgewiesen. Die Anreicherung dieses Organismus wurde von (Kartal et al., 2007) beschrieben. Sie beobachteten die Oxidation von Propionat in Gegenwart von Ammonium, Nitrat und Nitrit.

2.6 Methoden zur Analyse syntropher Stoffwechselgemeinschaften

Syntroph kooperierende Stoffwechsel-Gemeinschaften zeichnen sich durch metabolische Abhängigkeiten verschiedener Spezies aus. Eine Möglichkeit, diese Abhängigkeiten zu untersuchen, ist es, die beteiligten Organismen zu isolieren. Auf diese Weise konnten Co-Kulturen aufgeklärt und beschrieben werden (siehe Tabelle 2, S. 25). Dong et al. (1994) sowie Chen and Dong (2005) beobachteten daraufhin, dass ihre Co-Kulturen durch das Hinzufügen eines dritten Organismus das Substrat (Propionat) effizienter verwerteten. Folglich sind syntrophe Stoffwechselgemeinschaften nicht auf die zentralen Schlüsselspezies beschränkt, sondern weisen für die optimale Verwertung eines Substrates weitere assoziierte Organismen auf. Insbesondere Metagenomanaly-

sen lassen eine deutlich höhere Komplexität der metabolischen Netzwerke vermuten (Nobu et al., 2014). Insofern erfordert die Analyse komplexer Stoffwechselgemeinschaften die Unterscheidung zwischen metabolisch aktiven Organismen und solchen, die zwar koexistieren, an der optimalen Verwertung eines Substrates jedoch nicht beteiligt sind.

Eine Methode, die in diesem Zusammenhang angewendet wird, ist DNA-SIP (stable isotope probing). Dabei werden in kulturabhängigen Versuchen Substrate eingesetzt, die mit stabilen Isotopen (^{13}C , ^{15}N oder ^{18}O) markiert sind. Organismen, die das Substrat oder aus diesem Substrat gebildete Folgeprodukte verwerten können, akkumulieren die Isotope in ihrer DNA und RNA. Mittels Gradienten-Dichtezentrifugation lassen sich die markierten Nukleinsäuren von unmarkierten trennen und so unabhängig voneinander analysieren (Radajewski et al., 2003; Dumont and Murrell, 2005; Friedrich, 2006). Auf diese Weise wurden in Propionat-verwertenden Mischkulturen aus Reis-Feldern die Gattungen *Syntrophobacter*, *Pelotomaculum* und *Smithella*, welche alle Propionat-verwertende Spezies beinhalten, identifiziert (Lueders et al., 2004; Gan et al., 2012). Eine Variante davon ist die Einzelzell-Analyse mittels Raman-FISH. Die Raman-Spektroskopie detektiert dabei Zellen, welche die Isotope in ihre Zellstrukturen inkorporieren und die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide identifiziert deren phylogenetische Stellung (Huang et al., 2007). Auf vergleichbare Weise kombiniert die NanoSIMS (nanometer scale secondary ion mass spectrometry) die Analyse der metabolischen Aktivität mit der phylogenetischen Analyse auf Einzelzell-Niveau (Musat et al., 2008). Einen analogen Ansatz verfolgt auch die FISH-Microautoradiographie. Diese Methode kombiniert die Analyse Radioisotop-markierter Substrate und fluoreszenzmarkierter 16S rRNA Sonden. Während die Radioisotopie dazu ausgenutzt wird, Substrat-verwertende Zellen zu identifizieren, ermöglicht die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter 16S rRNA Sonden wiederum die phylogenetische Identifikation der Zellen (Lee et al., 1999; Wagner et al., 2006).

Umfassende Informationen liefern zudem Genom-, Metagenom- und Ecogenomanalysen. So können ganze Genome neuer, bisher unkultivierter Arten aufgeklärt und interpretiert werden (Pelletier et al., 2008). Ebenfalls lassen sich mikrobielle Gemeinschaften ganzheitlich auf Genomebene (Lykidis et al., 2011) oder auf verschiedenen Ebenen analysieren (Nobu et al., 2014; Vanwonterghem et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sich sukzessive verändernde bakterielle Diversität Propionat-verwertender Anreicherungskulturen in Batch mittels 16S rDNA Analyse ermittelt und mit der Propionat-Konzentration in Zusammenhang gesetzt, um von der Propionat-Verwertung profitierende Spezies korrelativ zu identifizieren.

2.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Energiewende ist begleitet von dem Ausbau erneuerbarer Energien und dem effizienten Umgang mit Energie (BMWi, 2015a). Die Verwertung von Biomasse spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie stellte 2014 den größten Anteil (50 %) des Primärenergieverbrauchs aus erneuerbaren Energien in Deutschland (BMWi, 2015b). Biogasanlagen ermöglichen die Strom- und Wärmeproduktion aus Biomasse. In Kombination mit einer Gasaufbereitung ist darüber hinaus die Produktion von Erdgas, sowie die Nutzung bestehender Gasnetze möglich. Der optimale Betrieb einer Biogasanlage erfordert eine stabile Methanproduktion. Um diese zu gewährleisten wird der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die mikrobielle Flora intensiv erforscht. Einer dieser Parameter ist die Akkumulation von Propionsäure als Folge von Hemmstoffen oder überhöhter Raumbelastung (FNR, 2013b).

Die Thermodynamik der anaeroben Verwertung von Propionat mit Kohlenstoffdioxid als einzigem externen Elektronenakzeptor erfordert einen niedrigen Wasserstoff-Partialdruck. Da die Propionat-Oxidation und die Wasserstoff-Verwertung durch verschiedene Mikroorganismen durchgeführt werden, bedingt die Propionat-Verwertung das Zusammenspiel syntropher Stoffwechselgemeinschaften. Zehn syntroph Propionat-oxidierende Spezies aus vier Gattungen (*Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Smithella* und *Syntrophobacter*) wurden bisher isoliert und beschrieben (Li et al., 2012). Diese Isolate entstammten kommunalen Abwasseranlagen, Industrieabwässern (Brauerei-, Tofu-, Zucker-, Kartoffel- und Ölindustrie), sowie einem Nassreiskulturboden (Boone and Bryant, 1980; Stams et al., 1992; Wallrabenstein et al., 1995; Nilsen et al., 1996; Harmsen et al., 1998; Liu et al., 1999; Imachi et al., 2000; Chen et al., 2005; de Bok et al., 2005; Imachi et al., 2006). Genetische Analysen Propionat-verwertender Mischkulturen bezogen sich auf Erdproben von Reisfeldern und synthetische Abwässer (Lueders et al., 2004; Gan et al., 2012; Ban et al., 2013, 2015).

Da nach Seyfarth (2012) bisher unbekannt oder bisher noch nicht als Propionsäure-Abbauer identifizierte Bakterien in NawaRo-BGA vermutet wurden, stand im Rahmen dieser Arbeit die Aufklärung der Diversität Propionat-abbauender Anreicherungskulturen aus NawaRo-BGA sowie die Identifizierung ihrer Propionat-oxidierenden Schlüsselspezies im Vordergrund. Propionat-verwertende Anreicherungskulturen sollten in diesem Zusammenhang etabliert, optimiert und analysiert werden. Anaerobe Kultivierungstechniken, sowie chemische Analysemethoden und auf der 16S rDNA basierende phylogenetische Untersuchungen kamen hierbei zum Einsatz.

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und durchgeführten Methoden aufgeführt.

3.1 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 3 listet die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel, sowie ihre Modell- und Herstellerangaben auf.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Anaerobenkammer	Type B komplett	Coy Lab Products
Anaeroben-Kulturgefäße	Bormioli-Fläschchen Hungate-Röhrchen Serum-Flaschen	
Autoklaven	FVS/1 VE-40 VX-150	ibs tecnomara Systec Systec
Brutschränke	Be 400 UM 800	Memmert Memmert
Eisbereiter	AF 103	Scotsman
Elektrophoresekammern	Sub-Cell Model 96 Wide Mini-Sub	Bio-Rad Laboratories Bio-Rad Laboratories
Puffer-Filtrieranlage	Membranpumpe Filter	Sartorius
Fluoreszenzfilter	HC-343/17 HC-BS 452 HC-458RS	AHF Analysetechnik AHF Analysetechnik AHF Analysetechnik
Gel-Dokumentation	CN-3000-WL/LC Infinity	Vilber Lourmat

Tabelle 3: Fortsetzung

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Haushaltsmikrowelle		
Heizblöcke	Thermomixer Comfort HTM 130	Eppendorf HLC Biotech
Heizplatte	IKA Combimag RCT	IKA Werke
HPLC	Entgaser S 7505 Pumpe LC-6A Controler SCL-6B Autosampler SIL-6B Säulenofen STH 585 UV-Vis Detektor SPD-10A Schreiber C-R8A	Sykam Shimadzu Shimadzu Shimadzu Gynkotec-Göhler Shimadzu Shimadzu
Laborwaagen	L610 A120S	Sartorius Sartorius
Mikroskope	Axioskop 40 Biozero BZ8000	Carl Zeiss Keyence Corporation
pH-Meter	CG 840	Schott AG
Pipetten	diverse Modelle diverse Modelle	Eppendorf Starlab International
Reinstwasseranlagen	Milli-Q Plus 185 Millipore RiOs 30	Merck Millipore Merck Millipore
Spannungsgeber	Power Supply Model 202	VWR International
Thermocycler	Mastercycler gradient S1000 Thermal Cycler Mastercycler ep realplex2	Eppendorf Bio-Rad Laboratories Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex RK 106	Bandelin Electronic
Vakuum-Exsikkator		

Tabelle 3: Fortsetzung

Bezeichnung	Modell	Hersteller
	Duran Vakuum Exsikkator	Duran Group
	Vakuum-Pumpe Trivac D 4B	Oerlikon leybold
	Magnetrührer KMO 2	IKA Werke
Vortex-Gerät	Vibrofix VF1	IKA Werke
Zentrifugen	Micro Star 17	VWR International
	Cryofuge 5000	Heraeus
	Avanti J-E	Beckman Coulter
	2-16K	Sigma
Wärmeschrank	Venticell 55/300 R	MMM Group

3.2 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Gase Tabelle 4 listet die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gase samt Hersteller auf. Darauf folgen Auflistungen der eingesetzten Enzyme (Tabelle 5), verwendeter Primer (Tabelle 6), Reaktionskits (Tabelle 7) und sonstiger Verbrauchsmaterialien (Tabelle 8).

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Gase.

Substanz	Hersteller
Agarose (peqGold Standard)	Peqlab
p-Aminobenzoessäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid	Merck
Biotin	Sigma-Aldrich
Borsäure	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich
D-Calciumpantothenat	Merck
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	Carl Roth
DNA-Größenstandard (SM0331)	Thermo Fisher
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Merck
Ethanol	Carl Roth
Folsäure	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Marcor
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kanamycin	Carl Roth
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Carl Roth
Liponsäure	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Carl Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumcarbonat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth

Tabelle 4: Fortsetzung

Substanz	Hersteller
di-Natriumethyldiamintetraessigsäure-Dihydrat	Carl Roth
di-Natriumfumarat	Sigma-Aldrich
Natriumformiat	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck
Natriumpropionat	Sigma-Aldrich
Natriumselenit-Pentahydrat	Sigma-Aldrich
Natriumsulfid-Nonahydrat	Sigma-Aldrich
Natriumwolframat-Dihydrat	Carl Roth
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Merck
Nicotinsäure	Sigma-Aldrich
Oxalessigsäure	Carl Roth
2-Propanol	Carl Roth
Pyridoxinhydrochlorid	Merck
Resazurin	Sigma-Aldrich
Riboflavin	Merck
Salzsäure	Carl Roth
Stickstoff	Westfalen
Stickstoff/ Kohlenstoffdioxid (80 %/ 20 %)	Westfalen
Stickstoff/ Wasserstoff (95 %/ 5 %)	Westfalen
Thiaminhydrochlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich
TRIS	Carl Roth
Trypton	Carl Roth
Vitamin B12	Carl Roth
Wasser (DEPC-behandelt)	Carl Roth
Zinkchlorid	Carl Roth

Tabelle 5: Verwendete Enzyme und Enzym-Reaktionspuffer.

Enzym	Reaktionspuffer	Hersteller
BsuRI (HaeIII)	Buffer R	Thermo Fisher
HhaI	FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher
Hinfl	FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher
SmaI	Tango Buffer	Thermo Fisher
Taq (peqGold)	Buffer Y	Peqlab
XhoI	Buffer Red	Thermo Fisher

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer.

Bez.	Sequenz (5'-3')	Referenz
931F	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A	Einen et al. (2008)
BAC338F	ACT CCT ACG GGA GGC AG	Yu et al. (2005)
BAC805R	GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC	Yu et al. (2005)
E5f	AGA GTT TGA TCM TGG CT	Dröge et al. (2005)
E1541r	AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA	von Wintzingerode et al. (1999)
M1100R	BGG GTC TCG CTC GTT RCC	Einen et al. (2008)
Met86f	GCT CAG TAA CAC GTG G	Wright and Pimm (2003)
Ar1530	GGA GGT GAT CCA GCC G	Stantscheff (2013)
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	Klonierungskit
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Klonierungskit

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Reaktionskits.

Reaktionskit		
Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Isolierung	GeneMatrix Stool DNA Purification Kit	EURx
Gel-Extraktion	GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher
Klonierung	TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Thermo Fisher
PCR	peqGold Taq all inclusive	Peqlab
PCR-Aufreinigung	ExoSAP-IT	Affymetrix

Tabelle 8: Auflistung weiterer Verbrauchsmaterialien.

Material		
Anwendung	Typ	Hersteller
HPLC-Säule	ODS2	Bischoff
HPLC-Vorsäule	ODS2	Bischoff
Rundfilter	0,2 μm PES	Sartorius
Vakuum-Filtrationsgerät	0,2 μm PES	VWR

3.3 Lösungen, Nährmedien, Puffer

Im Zuge der Etablierung und Erhaltung der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen sowie zur Durchführung der sukzessiven Diversitätsanalyse wurde das unter Tabelle 9 aufgeführte PI-Medium verwendet. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wurden zur Herstellung eine Spurenelementelösung (SL-10), eine Vitaminlösung, sowie eine Selen/ Wolfram-Lösung hinzugefügt. Die Zusammensetzungen dieser Lösungen sind den entsprechenden Tabellen 10, 11 und 12 zu entnehmen. Die Lösungen erfolgten jeweils in VE-Wasser. Darüber hinaus wurde dem Medium ein Reaktorfiltrat (RF) zugesetzt, welches wie folgt hergestellt wurde. Fermenter-Biomasse (Herkunft BGA Wallhalben, Tabelle 13, S. 40) wurde in Portionen von 500 g für 20 min bei 4000 U/min abzentrifugiert (Cryofuge 5000, Rotor 5260). Der Überstand wurde daraufhin zweimal für 2 h bei 10.000 rpm abzentrifugiert (Avanti J-E, Rotor JA-12), jeweils dekantiert und ein weiteres mal für 3 h zentrifugiert und dekantiert. Das finale Zentrifugat wurde anschließend mittels 0,2 μm -Vakuumfiltrationsgerät (PES-Membran) sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Herstellung anaeroben PI-Mediums wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde VE-Wasser im Überschuss in einer 500 mL Serumflasche mit der benötigten Menge Resazurin versetzt und in einer Haushaltsmikrowelle zum Kochen gebracht. Nach 3 Minuten Kochen wurde die Serumflasche umgehend mit einem Gummistopfen und Schraubschelle verschlossen, damit der Sauerstoffeintrag in die Flasche minimal gehalten wurde. Daraufhin wurden auf das abkühlende Wasser 0,5 bar Stickstoff aufgepresst, um es daraufhin zur weiteren Verwendung in die Anaerobenkammer einzuschleusen. Hier wurden in dem zwischenzeitlich abgekühlten Wasser die weiteren Medienbestandteile gelöst, der pH-Wert eingestellt und die Aliquotierung vorgenommen. Vor dem Autoklavieren (121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min) wurde den Kulturgefäßen (Hungate-Röhrchen, Bormioli-Fläschchen) ein Überdruck von 1 bar

Tabelle 9: **Zusammensetzung des PI-Mediums.**

Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

Bestandteil	g/L	mg/L	mL/L
KH ₂ PO ₄	0,56		
K ₂ HPO ₄	1,7		
Cystein-HCl x H ₂ O	0,5		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,4		
NaCl	0,4		
NH ₄ Cl	0,3		
CaCl ₂		38	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O		2	
Resazurin		2	
Na-Propionat	1,95		
SL-10 (Tabelle 10)			2,5
Vitaminlg. (Tabelle 11)			2,5
Se/ Wo-Lsg. (Tabelle 12)			1
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,3		
Reaktorfiltrat			10 ^a 100 ^a

^aIm Zuge der Etablierung und Erhaltung der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen wurden Reaktorfiltratanteile von 1 % und 10 % eingesetzt (siehe Abschnitt 3.5, S. 39).

Stickstoff aufgepresst.

Für die Gelelektrophorese wurde TBE-Puffer verwendet. Dieser wurde wie folgt angesetzt. 10,8 g/L Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 5,5 g/L Borsäure und 0,7 g/L Ethylendinitrilotetraessigsäure-Na₂ (EDTA-Na₂) wurden in VE-Wasser gelöst. Zur Herstellung der Gele wurden je nach Anwendung (Checking-, RFLP- und präparatives Gel) 1 bis 2 % Agarose in TBE-Puffer aufgekocht.

Für den Betrieb der HPLC (Abschnitt 3.7, S. 42) wurde ein Kalium-Phosphat-Puffer als Laufmittel verwendet. Zur Herstellung wurden 1 g/L KH₂PO₄ in Reinstwasser gelöst, filtriert (0,2 µm), 45 min im Exsikkator entgast und anschließend der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure auf 2,3 eingestellt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Spurenelementelösung SL-10 (DSMZ-Medium 320).

Bestandteil	g/L	mg/L	mL/L
HCl (25 %, 7,7 M)			10
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5		
ZnCl ₂		70	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O		100	
H ₃ BO ₃		6	
CoCl ₂ x 6 H ₂ O		190	
CuCl ₂ x 2 H ₂ O		2	
NiCl ₂ x 6 H ₂ O		24	
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O		36	

Tabelle 11: Zusammensetzung der Vitaminlösung (DSMZ-Medium 141).

Bestandteil	mg/L
Biotin	2
Folsäure	2
Pyridoxin-HCl	10
Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	5
Riboflavin	5
Nicotinsäure	5
D-Ca-Pantothenat	5
Vitamin B ₁₂	0,1
p-Aminobenzoesäure	5
Liponsäure	5

Tabelle 12: Zusammensetzung der Selen/ Wolfram-Lösung (DSMZ-Medium 385).

Bestandteil	g/L	mg/L
NaOH	0,5	
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O		3
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O		4

3.4 Mikrobielle Proben

Sechs landwirtschaftliche Biogasanlagen und zwei Fermenter einer Pilot-Anlage im Labormaßstab dienten als Quellen der mikrobiellen Proben. Letztere war in einem Projekt zur zweistufigen Druckfermentation zum Einsatz gekommen und zeichnete sich durch den Betrieb bei erhöhtem Druck bis zu 10 bar aus (Chen et al., 2014). Tabelle 13 listet die beprobten Biogasanlagen auf. Den Biogasanlagen konnten an speziellen Ablass-Vorrichtungen Proben entnommen werden. Diese wurden in 0,5-1,0 L Plastikflaschen gefüllt und möglichst zeitnah (innerhalb weniger Stunden) zur Verarbeitung in das IMW transportiert. Die mikrobiellen Proben der Biogasanlagen von Arenrath und Steinweiler wurden im Rahmen eines vorhergehenden Projektes gewonnen (Seyfarth, 2012) und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.5 Propionat-verwertende Anreicherungskulturen

Biomasseproben aus NawaRo-Biogasanlagen dienten als Quelle der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kulturen. Im Folgenden werden die Etablierung Propionat-verwertender Anreicherungskulturen, die Erhaltung reproduzierbar Propionat-verwertender Kulturen, die Charakterisierung der Kulturbedingungen, sowie die Kultivierung im Rahmen der sukzessiven Diversitätsanalyse beschrieben.

3.5.1 Etablierung

Mikrobielle Fermenterproben (Tabelle 13, S. 40) wurden unter anaeroben Bedingungen verarbeitet. Portionen von 5 g Biomasse wurden in Bormioli-Fläschchen mit je 20 mL PI-Medium (Tabelle 9, S. 37, 1 % RF) überführt und bei 39 °C kultiviert. Im Abstand von einer Woche wurde laufend die Propionsäurekonzentration bestimmt (siehe HPLC, Abschnitt 3.7, S. 42). Ab einer Verringerung der Konzentration um mehr als 25 % der Ausgangskonzentration (2 g/L Na-Propionat) wurde die Propionat-Verwertung als positiv betrachtet. Positive Proben wurden 10 %-ig in frisches PI-Medium überimpft.

3.5.2 Erhaltung

Zum Zweck der Kulturerhaltung wurden die Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen in einem Abstand von 4 bis 10 Wochen 10 %-ig in frisches PI-Medium überimpft. Den genauen Zeitpunkt bestimmte dabei die Propionat-Konzentration. Wurde eine Verringerung der Konzentration um mehr als 25 % der Ausgangskonzen-

Tabelle 13: **Herkunft der mikrobiellen Proben.**

BGA: Biogasanlage, GPS: Ganzpflanzensilage, GS: Grassilage, LARW: Längsachsentrührwerk, MS: Maissilage, PLZ: Postleitzahl, RG: Rindergülle, SG: Schweinegülle, TMRW: Tauchmotorrührwerk.

landwirtschaftliche Biogasanlagen							
Betreiber	Arenrath	Theo & Ingrid	Obere Blies	Hubert Wagner	P. Neumann	BioEnergie	
Ort	GmbH & Co KG Arenrath	Friedrich GbR Hochdorf	GmbH & Co. KG Oberthal	& Sohn GbR Steinweiler	Biogas-Anlage Wallhalben	Glahn	
Fermenter	Rührkessel	Hochfermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Zweibrücken	
Rührung	LARW/TMRW	Zentralrührweg	LARW/TMRW	Zentralrührweg	TMRW	LARW/TMRW	
<i>Vbrutto</i> [m ³]	1 x 1400	2 x 980	1 x 1200	2 x 1000	1 x 1000	1 x 1200	
Nachgärer	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	-	Rührkessel	
Rührung	TMRW	LRW	TMRW	LARW	-	TMRW	
<i>Vbrutto</i> [m ³]	1 x 1400	1 x 1200	1 x 1200	1 x 1000	-	1 x 1250	
Leistung [kW]	345	500	345	380	400	500	
Inputstoffe	MS, GS, RG	MS, SG	MS, GS, RG	MS, GPS, SG	MS, RG	MS, SG	
Temp. [°C]	40	43 - 47	40	39	42	ca. 43	
pH-Wert	7,3-7,5	7,7	7,5/7,6	7,2-7,6	-	-	
Labor-Pilotanlagen							
Betreiber	Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie						
Ort	Hohenheim	Hohenheim					
Fermenter	Labormaßstab	Labormaßstab					
Rührung	Pumpzirkulation	Pumpzirkulation					
Vbrutto	20 l fixed bed	20 l fixed bed					
Inputstoffe	MS	MS					
Temp. [°C]	37-40	37-40					
Druck	1,5 bar	9 bar					
pH-Wert	-	-					

tration (2 g/L Na-Propionat) gemessen, so wurde die Probe überimpft. Andernfalls wurde die Propionat-Konzentration im Abstand von 2 Wochen erneut bestimmt und im Falle des positiven Abbaus (> 25 %) die Kultur überimpft. Trat kein entsprechender Abbau innerhalb von 10 Wochen auf, was durchaus wiederholt eintrat, so wurden Rückstellproben älterer positiver Generationen herangezogen und in mehreren Parallelen 10 %-ig in frisches PI-Medium überimpft. Auf diese Weise ließen sich aktiv Propionat-verwertende Anreicherungskulturen über Monate und Jahre hinweg erhalten.

3.5.3 Charakterisierung der Kulturbedingungen

Mit dem Ziel die optimalen Kultivierungsbedingungen hinsichtlich pH-Wert und RF-Anteil, sowie die Toleranzspanne gegenüber erhöhten Propionat-Konzentrationen zu bestimmen, wurden Versuche mit der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 (siehe Tabelle 14, S. 49) durchgeführt. Das PI-Medium mit 1 % RF-Anteil aus Tabelle 9 (S. 37) wurde hinsichtlich der genannten Parameter variiert. So wurden die Auswirkungen von 0 %, 0,1 %, 1 % und 10 % RF-Anteil, 1,5 g/L, 2 g/L, 3 g/L und 3,5 g/L Na-Propionat, sowie von verschiedenen pH-Werten (7.5, 7.7, 8.1 und 8.3) auf die Propionat-Verwertung über einen Zeitraum von 7 Wochen getestet. Die Versuche wurden jeweils in drei Parallelen Hungate-Kulturen durchgeführt.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sehr sich die Verdünnung Propionat-verwertender Anreicherungskulturen auf die Propionat-verwertende Aktivität auswirkte. Hierfür kamen die Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen G113, S2 und N12 (siehe Tabelle 14, S. 49) in PI-Medium mit 10 % RF-Anteil zum Einsatz. Diese wurden seriell bis 10^{-7} verdünnt. Die Propionat-Konzentration wurde mittels HPLC über einen Zeitraum von 14 Wochen bestimmt (siehe HPLC, Abschnitt 3.7, S. 42).

3.5.4 Kultivierung im Rahmen der sukzessiven Diversitätsanalyse

Zur Ermittlung der sukzessiven Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a (siehe Tabelle 14, S. 49) wurden diese 10 %-ig in steriles PI-Medium (Tabelle 9, S. 37) mit 10 % RF-Anteil überimpft. Dabei kamen Bormioli-Fläschchen mit 40 mL Probenvolumen zum Einsatz, um zu drei Zeitpunkten (nach 14, 39 und 56 Tagen) ein Probenvolumen von 5 mL für die weiteren Proben-Analysen (HPLC und molekularbiologische Untersuchungen) entnehmen zu können.

3.6 Mikroskopie und mikroskopische Fotografie

Während der Arbeit mit den Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen wurden regelmäßig mikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um gegebenenfalls Gemeinsamkeiten, Unterschiede und sukzessive Veränderungen feststellen zu können. Die mikroskopischen Aufnahmen unter Phasenkontrast entstanden an einem Axioskop 40. Die Fotografien wurden mittels integrierter Digitalkamera und zugehöriger Software durchgeführt. Zur Identifizierung methanogener Archaea wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop (Biozero BZ8000) verwendet. Der bei Methanbakterien verbreitete Enzym-Kofaktor F_{420} wird durch Licht mit 420 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz (520 nm) angeregt, die anhand des entsprechenden Filters beobachtet werden konnte. Die Aufnahmen an diesem Mikroskop wurden wiederum mittels integrierter Kamera durchgeführt.

3.7 Chemische Analytik (HPLC)

Die Bestimmung der Propionsäure-Konzentration wurde mittels HPLC durchgeführt. Als Laufmittel diente ein Kalium-Phosphat-Puffer. Zur Herstellung wurden 1 g/L KH_2PO_4 in Reinstwasser gelöst, filtriert ($0,2 \mu m$), 45 min im Exsikkator entgast und anschließend der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure auf 2,3 eingestellt. Dem Puffer-Reservoir folgten ein Entgaser, Pumpe A und Pumpe B. Das Säulensystem (Vor- und Hauptsäule ODS2, siehe Tabelle 8, S. 36) war in einem Säulofen plaziert und auf $30 \text{ }^\circ C$ temperiert. Detektiert wurde mittels UV-Detektor bei 210 nm. Die Kontrolleinheit, ein Autosampler, sowie ein Schreiber komplettierten die Anlage. Die Modell- und Herstellerangaben der Komponenten sind in Tabelle 3 (S. 30) aufgelistet. Während Pumpe A wurde mit dem Eluenten betrieben wurde, war Pumpe B an ein Methanol-Reservoir (100 % Methanol) angeschlossen, mit dem die Trennsäule in regelmäßigen Abständen rekonstituiert wurde. Das Methanol wurde zuvor für 20 min im Ultraschallbad entgast. Für jede Analyse wurden den Kulturen Aliquots von 1 mL Kulturflüssigkeit entnommen und mittels $0,2 \mu m$ Spritzen-Vorsatzfilter aufbereitet. $2 \mu L$ Probe wurden injiziert und bei einer Flussrate von 1 mL/min gemessen. Zur Quantifizierung der Propionat-Konzentration wurde ein Standard mit 1,95 g/L Na-Propionat (1,5 g/L Propionsäure) eingesetzt.

3.8 Molekularbiologische Methoden

Im Zuge der Bestimmung der Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen kamen eine Reihe molekularbiologischer Methoden zum Einsatz. Diese

werden im Folgenden beschrieben.

3.8.1 DNA-Isolierung

Um die Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen untersuchen zu können, wurde eine DNA-Extraktion mit dem kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskit Gene-MATRIX Stool Purification Kit (siehe Tabelle 7, S. 35) durchgeführt. Dieses Kit wurde speziell zur Isolierung von DNA aus Stuhlproben entwickelt. Es ermöglicht ebenso die DNA-Isolierung aus Flüssigkulturen. Diese wurden jedoch vor der DNA-Isolierung in 2 mL Reaktionsgefäßen aufkonzentriert (10 min, 13000 rpm), da das Kit für Probenvolumen von maximal 200 μ L konzipiert wurde.

3.8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten. Sie wurde angewendet, um das phylogenetisch relevante 16S-rRNA Gen der Bakterien und Archaeen zu vervielfältigen. Des weiteren wurde sie im Rahmen der Analyse klonierter 16S rDNA-Gene (siehe Abschnitt 3.8.4, S. 45) durchgeführt. Da sich die Zusammensetzungen der Reaktionen, sowie die Programme der Reaktionsdurchläufe unterschieden, werden diese folgend einzeln aufgeführt.

Amplifikation bakterieller 16S rDNA-Gene Für die Amplifikation bakterieller 16S rDNA Sequenzen wurden die Primer E5f und E1541r (siehe Tabelle 6, S. 35) eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit den Chemikalien des peqGold Taq all inclusive Reaktionskit (siehe Tabelle 7, S. 35) durchgeführt. Die Ansätze bestanden aus 36,8 μ L DEPC-Wasser, 1 μ L $MgCl_2$, 1 μ L dNTP-Mix, Primern à 2 μ L, 5 μ L Reaktionspuffer (red) und 0,2 μ L Taq-Polymerase. 2 μ L Template-DNA komplettierten die Reaktionsansätze. Die Reaktionen wurden mittels Thermocycler (siehe Tabelle 3, S. 30) durchgeführt und folgten einem Touchdown-Programm, bei dem die Annealing-Temperatur schrittweise je Zyklus herabgesetzt wurde. Nach einer Denaturierungsphase von 5 min bei 95 °C folgten 20 Touchdown-Zyklen (Denaturierung: 1 min/ 95 °C, Annealing: 1 min/ 59,3 °C mit -0,5 °C je Zyklus, Elongation: 2 min/ 72 °C) und 10 konstante Zyklen (Denaturierung: 1 min/ 95 °C, Annealing: 1 min/ 49,3 °C, Elongation: 2 min/ 72 °C). Abschließend wurde für 10 min bei 72 °C die Elongation unfertiger Amplifikate gewährleistet

Amplifikation archaeeller 16S rDNA-Gene Die Amplifikation archaeeller 16S rDNA Sequenzen wurden mit den Primer Met86f und Ar1530 (siehe Tabelle 6, S. 35) durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden wiederum mit den Chemikalien des peqGold Taq all inclusive Reaktionskit (siehe Tabelle 7, S. 35) angesetzt. Die Reaktionsansätze bestanden aus 36,8 μL DEPC-Wasser, 1 μL MgCl_2 , 1 μL dNTP-Mix, Primern à 2 μL , 5 μL Reaktionspuffer (red) und 0,2 μL Taq-Polymerase. 2 μL Template-DNA komplettierten die Reaktionsansätze. Die Reaktionen wurden mittels Thermocycler (siehe Tabelle 3, S. 30) durchgeführt und folgten einem Programm nach Stantscheff (2013), bei dem die Annealing-Temperatur schrittweise je Zyklus heraufgesetzt wurde. Nach einer Denaturierungsphase von 5 min bei 95 °C folgten 15 Zyklen mit steigender Annealing-Temperatur (Denaturierung: 00:30 min/ 95 °C, Annealing: 00:45 min/ 55,0 °C mit +0,1 °C je Zyklus, Elongation: 01:30 min/ 72 °C) und 20 konstante Zyklen (Denaturierung: 00:30 min/ 95 °C, Annealing: 00:45 min/ 56,0 °C, Elongation: 01:30 min/ 72 °C). Abschließend wurde auch hier für 5 min bei 72 °C die Elongation unfertiger Amplifikate gewährleistet

Amplifikation TOPO TA-klonierter 16S rDNA-Gene Die Amplifikation TOPO TA-klonierter 16S rDNA-Gene (siehe Abschnitt 3.8.4) wurde als Kolonie-PCR durchgeführt. Folglich wurden Kolonien transformierter *E. coli*-Zellen den Reaktionsansätzen hinzugefügt. Insofern dienten rekombinante pCR4-TOPO Vektormoleküle als Template-DNA.

Die Primer T3 und T7 (siehe Tabelle 6, S. 35) zielten auf die Insert-flankierenden Vektorsequenzen. Die Reaktionsansätze wurden mit den Chemikalien des peqGold Taq all inclusive Reaktionskit (siehe Tabelle 7, S. 35) angesetzt. Sie bestanden aus 35,8 μL DEPC-Wasser, 1 μL MgCl_2 , 1 μL dNTP-Mix, Primern à 1 μL , 5 μL Reaktionspuffer (red) und 0,2 μL Taq-Polymerase. Kolonien transformierter *E. coli*-Zellen (s. o.) komplettierten die Reaktionsansätze. Die Reaktionen wurden mittels Thermocycler (siehe Tabelle 3, S. 30) nach folgendem Programm durchgeführt. Einer Zellyse- und Denaturierungsphase von 10 min bei 95 °C folgten 40 konstante Zyklen (Denaturierung: 1 min/ 94 °C, Annealing: 1 min/ 45,0 °C, Elongation: 2 min/ 72 °C). Zum Abschluss wurde für 10 min bei 72 °C die Elongation unfertiger Amplifikate gewährleistet.

3.8.3 Präparative Gel-Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Um eine reibungslose molekulare Klonierung (siehe Abschnitt 3.8.4) zu gewährleisten, wurden die 16S rDNA Amplifikate vor der Klonierung präparativ aufgereinigt. Insbe-

sondere das Entfernen niedermolekularer DNA (z. B. Primer) ist für die Klonierung längerer DNA-Fragmente entscheidend. Die Auftrennung wurde in einem 1,5 %igen Agarosegel (Abschnitt 3.3) durchgeführt. Die präparative Aufreinigung erfolgte nach der Betriebsanleitung des entsprechenden Gel-Extraktions-Kit (siehe Tabelle 7, S. 35).

3.8.4 Molekulare Klonierung

Die molekulare Klonierung diente der Trennung amplifizierter 16S rDNA Moleküle voneinander, um diese im Rahmen der Diversitätsanalyse sequenzieren lassen zu können (siehe Abschnitt 3.8.6). Sie wurde nach der Betriebsanleitung des Klonierungskits (siehe 7, S. 35) durchgeführt. Folgende Parameter wurden gewählt. Die Inkubation der TOPO-cloning reaction erfolgte für 30 min. Dabei kamen 4 μL aufgereinigtes PCR-Produkt (siehe 3.8.3, S. 44) zum Einsatz. Die Transformation wurde nach dem Kanamycin-Protokoll durchgeführt.

3.8.5 Restriktions-Analysen (ARDRA)

Mit dem Ziel Sequenzierungen einzusparen, wurden die klonierten 16S rDNA-Fragmente aus Abschnitt 3.8.2 mittels ARDRA-Analyse (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) in phylogenetische Gruppen sortiert. Hierzu wurden die Amplifikate mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Einteilung erfolgte auf Basis der daraus resultierenden Schnittmuster. Die Restriktions-Reaktionen werden im Folgenden beschrieben.

Verdau bakterieller 16S rDNA-Fragmente Bakterielle Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen HhaI und HinfI in separaten Reaktionen geschnitten. Die Enzyme und Reaktionspuffer sind in Tabelle 5 (S. 35) aufgeführt. Die eingesetzten Enzymlösungen hatten eine Konzentration von 10 U/ μL . 8,7 μL PCR-Produkt wurden mit 0,3 μL Enzymlösung und 1 μL Reaktionspuffer für 5 h bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene DNA wurden gelelektrophoretisch (2 % Agarose-Gel, siehe Abschnitt 3.3) aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung fotografiert und analysiert.

Verdau archaeeiler 16S rDNA-Fragmente Archaeelle Fragmente wurden nach Stantscheff (2013) mit den Restriktionsenzymen SmaI/XhoI (Doppelverdau) und BsuRI in separaten Reaktionen geschnitten. Die Enzyme und Reaktionspuffer sind in Tabelle 5 (S. 35) aufgeführt. Die eingesetzten Enzymlösungen hatten eine Konzentration von 10 U/ μL . Der SmaI/XhoI-Doppelverdau wurde wie folgt durchgeführt. 10 μL

PCR-Produkt wurden mit 1 μL SmaI-Enzymlösung und 1 μL Tango-Reaktionspuffer für 1 h bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurden 1 μL XhoI-Enzymlösung und 1,5 μL Puffer R hinzugefügt und bei 37 °C für eine weitere Stunde inkubiert. Im Zuge des BsuRI-Verdau wurden 10 μL PCR-Produkt mit 1 μL Enzymlösung und 1 μL Reaktionspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Die geschnittene DNA wurden gelelektrophoretisch (2 % Agarose-Gel, siehe Abschnitt 3.3) aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung fotografiert und analysiert.

3.8.6 Sequenzierung pCR-4-TOPO TA-klonierter 16S rDNA-Gene

Die Ermittlung der 16S rDNA-Sequenzen wurde durch einen Dienstleister (LGC Genomics GmbH) durchgeführt. Zuvor wurden die jeweiligen PCR-Produkte aus Abschnitt 3.8.2 (S. 44) mit dem Reaktionskit ExoSAP-IT (siehe Tabelle 7, S. 35) aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Primer des Klonierungskits (T3, T7, Tabelle 6, S. 35).

3.8.7 Quantitative PCR (qPCR)

Zur Ermittlung der bakteriellen und archaellen Zellzahlen wurde eine quantitative PCR (qPCR) nach May et al. (2015) durchgeführt. Dabei kamen die Primerkombinationen BAC338F/ BAC805R und 931F/ M1100R (siehe Tabelle 6, S. 35) zur Amplifikation bakterieller und archaeller 16S rDNA-Fragmente zum Einsatz.

3.9 Bioinformatik

Die Auswertung der bakteriellen und archaellen 16S rDNA-Sequenzen erforderte den Einsatz bioinformatischer Online- und Offline-Tools. Diese werden im Folgenden beschrieben.

3.9.1 Aufbereitung der Sequenzdaten

Die Rohdaten der bakteriellen Sequenzen im ABI-Format (Chromatogramme) wurden mit *DNA-Baser* (Version 4.20.0.36) in FASTA-Dateien übersetzt. Dabei wurde aus den ABI-Dateien eine multiFASTA-Datei erstellt. Die Konvertierung beinhaltete die Optimierung der Sequenzenden. Enden wurden geschnitten, bis mehr als 75 % *gute* Basen in einem 20 Bp-Fenster ausgemacht wurden. Um als *gute* Base zu gelten, wurde ein Quality Value (QV) höher als 26 vorausgesetzt. Diese Einstellung wird qualitativ hochwertigen Sequenzen gerecht.

3.9.2 Entfernung chimärer Sequenzen

Unter chimären PCR-Produkten versteht man hybride DNA-Moleküle, die während der Amplifizierung mittels PCR entstehen. Die Ursache liegt in unvollständig elongierten Amplifikaten, die sich im Folgezyklus an homologe Sequenzen anlagern und hier fälschlicherweise als Primer fungieren und chimär zu Ende elongiert werden. Sie setzen sich somit aus mindestens zwei Ursprungsmolekülen zusammen und sind daher wertlose Artefakte. Bleiben solche chimären Sequenzen unentdeckt, so können sie eine erhöhte Biodiversität vortäuschen, die nicht existiert (Wang and Wang, 1996; Ashelford et al., 2006; Haas et al., 2011). Aus diesem Grund wurden die bakteriellen 16S rDNA Sequenzen mit Hilfe des Online-Tools *DECIPHER's Find Chimeras* auf chimäre Sequenzen hin analysiert. Das Programm platziert eine Sequenz in seine entsprechende phylogenetische Gruppe und sucht daraufhin nach Sequenzfragmenten innerhalb der Sequenz, welche für diese phylogenetische Gruppe untypisch, für andere phylogenetische Gruppen jedoch bekannt sind (Wright et al., 2012). Das Tool ist über <http://decipher.cee.wisc.edu/index.html> erreichbar (Stand 10.07.2015).

3.9.3 Clusterung von 16S rDNA-Sequenzen

Die bakteriellen 16S rDNA-Sequenzen wurden mit dem Online-Tool *BLASTclust* in Gruppen eingeteilt. Das Programm führt eine hierarchische Clusteranalyse mit Single-Linkage Fusionierung durch. 70 % minimale Sequenzabdeckung und 97 % minimale Sequenzidentität wurden als Parameter für die Gruppeneinteilung gewählt. Der Wert der minimalen Sequenzabdeckung ermöglichte die Gruppierung unterschiedlich langer Sequenzen (747 bp bis 1141) ohne Informationsverlust durch Längennormalisierung. Das Tool ist über <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/blastclust> erreichbar (Stand 10.07.2015).

3.9.4 Datenbankabgleich von DNA-Sequenzen

Die Identifizierung der nächsten Verwandten bakterieller und archaeeller 16S rDNA-Sequenzen wurde über einen NCBI Datenbankabgleich durchgeführt. Hierzu wurde ein Standard Nucleotide BLAST (blastn) der Datenbank für 16S ribosomale RNA Sequenzen (Bacteria und Archaea) durchgeführt. Das Tool ist über https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch erreichbar (Stand 10.07.2015).

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Propionsäure-Abbau von NawaRo-Biogasanlagen untersucht werden. NawaRo-Biogasanlagen werden mit nachwachsenden Rohstoffen wie beispielsweise Maissilage, Ganzpflanzensilage (verschiedene Getreidepflanzen) oder Grassilage betrieben. Insofern unterscheiden sich die Substratbedingungen für die anaerobe Fermentation in NawaRo-Biogasanlagen von denen in anderen anaeroben Biotopen (z. B. Faultürme von Kläranlagen, stehende Gewässer (Hypolimnion-Schichten), Moore oder Verdauungstrakte von Tieren). Letztendlich sollte aufgeklärt werden, welche Organismen an der Verwertung von Propionat in NawaRo-Biogasanlagen beteiligt sind und ob sich diese von bekannten Propionat-Verwertern unterscheiden. In den folgenden Abschnitten und Unterabschnitten werden die bezüglich dieser Fragestellung erzielten Ergebnisse dargestellt. Dabei geht es zunächst um die Etablierung und Erhaltung reproduzierbar Propionat-verwertender Anreicherungskulturen (Abschnitt 4.1). Es folgen Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Kulturen, sowie zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen (Abschnitt 4.2). Schließlich werden in Abschnitt 4.4 die Ergebnisse zur Analyse der sukzessiven Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen während der Propionat-Verwertung dargelegt und hinsichtlich der Propionat-verwertenden Schlüsselorganismen präsentiert. Dieser Abschnitt schließt den Ergebnisteil.

4.1 Aktivität Propionat-verwertender Anreicherungskulturen

Um Untersuchungen bezüglich der Propionat-Verwertung von NawaRo-BGA durchführen zu können, wurden aus den Proben der Biogasanlagen (siehe Tabelle 13, S. 40) reproduzierbar Propionat-verwertende Anreicherungskulturen in Kultur gewonnen. Die Vorteile der Laborkulturen gegenüber frischen Fermenterproben liegen in den konstanten Kultivierungsbedingungen, in der Manipulierbarkeit der Bedingungen (Simulation unterschiedlicher Bedingungen), aber auch in der ständigen Verfügbarkeit der Proben. Die Vorgehensweise der Etablierung ist unter Abschnitt 3.5.1 (S. 39) beschrieben. Im Prinzip wurde Propionat-haltiges Nährmedium mit einer Fermenterprobe beimpft, auf den positiven Abbau von Propionat hin überprüft und danach fortlaufend 10 %ig in frisches Nährmedium überführt. Kam der Propionat-Abbau einer Kultur ins Stocken, so wurde versucht, diesen aus Rückstellproben zu reaktivieren. Mit dieser Vorgehensweise wurden reproduzierbar Propionat-verwertende Anreicherungskulturen gewonnen, welche über einen Zeitraum von mehreren Jahren ihre Propionat-verwertende Aktivität beibehielten und analysiert werden konnten.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und etablierten Propionat-verwertenden Konsortien.

Tabelle 14: **Propionat-verwertende Anreicherungskulturen.**

Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und etablierten Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen unter Angabe der jüngst gemessenen Propionat-verwertenden Aktivität.

Anreicherungs- kultur	Herkunftsanlage (Tabelle 13)	Beginn der Etablierung	Aktivität ^a Dez14/ Jan15	Alter der Kultur
Ap1a ^b	Arenrath	vor 2011	+	>4 Jahre
F13	Hochdorf-Assenheim	28.11.2012	+	>2 Jahre
G12	Oberthal	06.03.2012	-	>2,5 Jahre
G13	Zweibrücken	28.11.2012	+	>2 Jahre
N12	Wallhalben	06.03.2012	+++	>2,5 Jahre
N13	Wallhalben	28.11.2012	+++	>2 Jahre
S1	Hohenheim	17.09.2013	+++	>1 Jahr
S2	Hohenheim	17.09.2013	++	>1 Jahr
Wp2a ^b	Steinweiler	vor 2011	+	>4 Jahre

^a Verwertung von 2 g/L Na-Propionat innerhalb von maximal 4 Wochen:

+: 0,2 - 0,59 g/L Verwertung

++: 0,6 - 1,19 g/L Verwertung

+++ : 1,2 - 1,8 g/L Verwertung

-: keine Propionat-Verwertung

^b Anreicherungskulturen aus Vorgängerprojekt (Seyfarth, 2012)

Die Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a und Wp2a wurden im Rahmen eines Vorgängerprojektes etabliert (Seyfarth, 2012) und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.2 Charakterisierung Propionat-verwertender Anreicherungskulturen

4.2.1 Variabilität der Propionat-Verwertung

Während der Arbeit mit den Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen fiel auf, dass sich die Verläufe der Propionat-Verwertung stark unterscheiden konnten.

Abbildung 5 zeigt vier verschiedene Verläufe, welche diese Variabilität verdeutlichen.

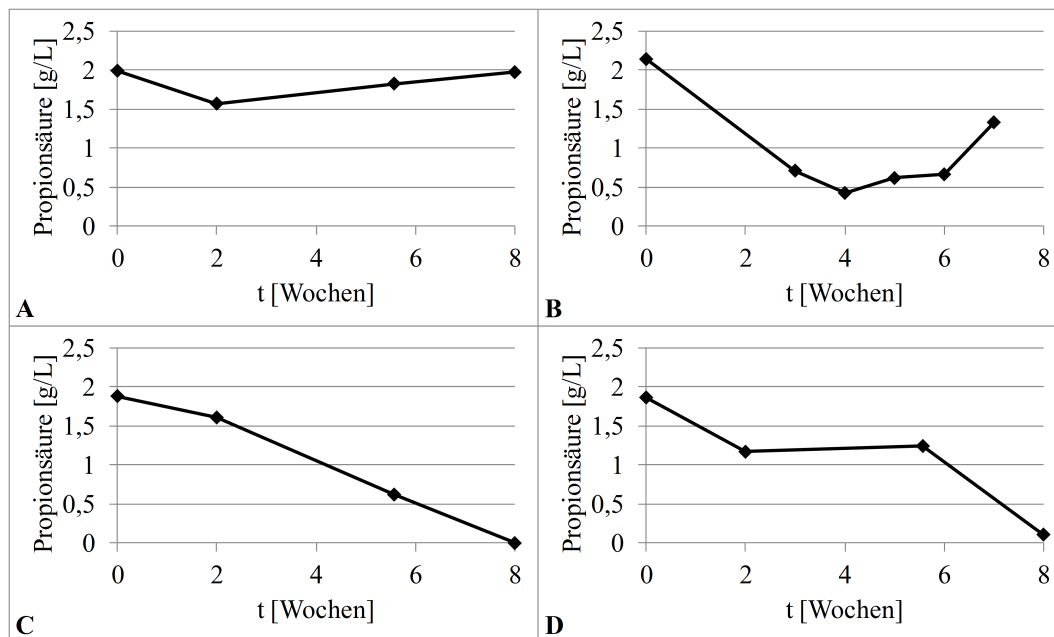


Abbildung 5: **Beispielhafte Verläufe des Propionat-Abbaus.**

Die Verläufe wurden während der Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen F13 (A), N12 (B), Ap1a (C), Wp2a (D) aufgenommen.

So war bei Kultur F13 zunächst ein Abbau der Propionsäure erkennbar, auf den jedoch nach zwei Wochen ein Anstieg der Säure erfolgte. Ein ähnlicher Verlauf wurde bei Kultur N12 beobachtet, mit dem Unterschied, dass hier eine deutlich aktivere Abbauphase vorgelegen hatte, bevor nach vier Wochen vermehrt Propionat-Bildung einsetzte. Demgegenüber konnte für die Kulturen Ap1a und Wp2a während des acht-wöchigen Untersuchungszeitraumes eine komplette (Kultur Ap1a) bzw. nahezu komplette (Kultur Wp2a) Verwertung der Propionsäure beobachtet werden. Diese zwei Verläufe unterschieden sich jedoch im Propionat-Konzentrationsplateau der Kultur Wp2a, welches eine vorübergehende Stockung der Gärvorgänge andeutete. Ob auch in diesen Kulturen nach erfolgter Propionat-Verwertung ein Anstieg der Propionat-Konzentration erfolgte, wurde nicht dokumentiert.

Die Verläufe der Propionat-Verwertung variierten jedoch nicht ausschließlich zwischen den verschiedenen Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen, es konnte auch ein und dieselbe Kultur unterschiedliche Verläufe aufweisen. Abbildung 6 zeigt zwei Verläufe der Propionat-Verwertung, die während der Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 aufgenommen wurden. Im ersten Fall (linkes

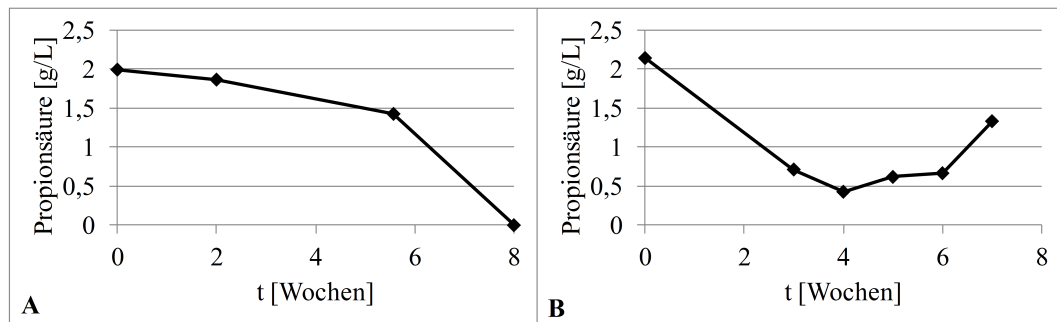


Abbildung 6: **Variabilität der Verläufe des Propionat-Abbaus.**

Die Verläufe **A** und **B** wurden während der Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 aufgenommen.

Diagramm) erfolgte eine kontinuierliche Verringerung der Propionat-Konzentration bis hin zur kompletten Verwertung der Säure nach acht Wochen. Der zweite Verlauf (rechtes Diagramm) zeigte hingegen eine unvollständige Propionat-Verwertung mit einem Konzentrationsminimum nach vier Wochen, auf das ein dynamischer Anstieg der Konzentration erfolgte.

4.2.2 Kultivierungsansprüche der Anreicherungskulturen

Mit dem Ziel die Kultivierungsbedingungen hinsichtlich Reaktorfiltrat-Anteil, Propionat-Ausgangskonzentration und pH-Wert zu optimieren, wurden entsprechende Analysen mit der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 durchgeführt. Hierzu wurde das PI-Medium aus Abschnitt 3.3 (S. 36) hinsichtlich der genannten Komponenten variiert, mit der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 beimpft und der Verlauf der Propionat-Verwertung gemessen. Es wurden jeweils drei Parallele Ansätze untersucht.

Reaktorfiltrat-Anteil Zunächst werden in Abbildung 7 die Ergebnisse hinsichtlich variiertes RF-Anteile dargestellt. Die Ansätze mit 0 %, 0,1 % und 1 % Reaktorfiltrat-Anteil zeigten ähnliche Verläufe der Propionat-Verwertung. Nach einer etwa dreiwöchigen Anlaufphase gewann der Abbau an Dynamik und führte nach sieben-wöchiger Inkubation zu Propionat-Konzentrationen von knapp über bzw. unter 0,5 g/L. Der Verlauf der Ansätze in PI-Medium mit 10 % Reaktorfiltrat unterschied sich davon deutlich. Der Abbau verlief zu Beginn dynamischer, endete jedoch nach fünf Wochen, gefolgt von einem starken Anstieg. Die Standardabweichung des letzten Messwertes wies darauf hin, dass sich die drei parallel angesetzten Kulturen unterschiedlich verhielten.

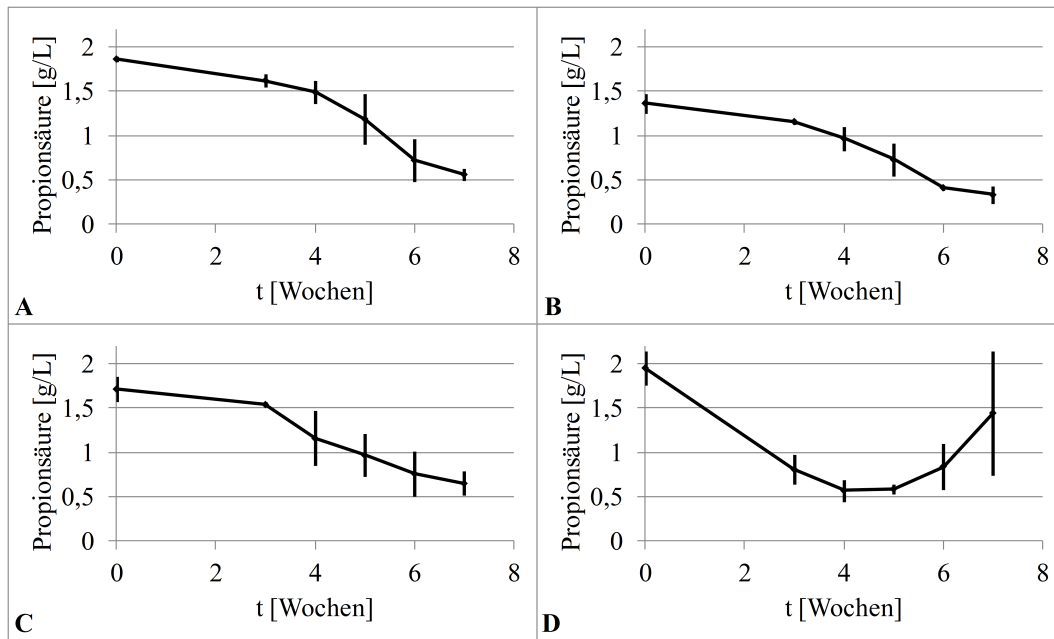


Abbildung 7: **Propionat-Abbau bei variablen Reaktorfiltrat-Anteilen.**

A: 0 %, **B:** 0,1 %, **C:** 1 %, **D:** 10 % Reaktorfiltratanteil. Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 in PI-Medium (s. S. 37). Angegeben sind die Mittelwerte drei paralleler Ansätze mit Standardabweichung der Messreihe.

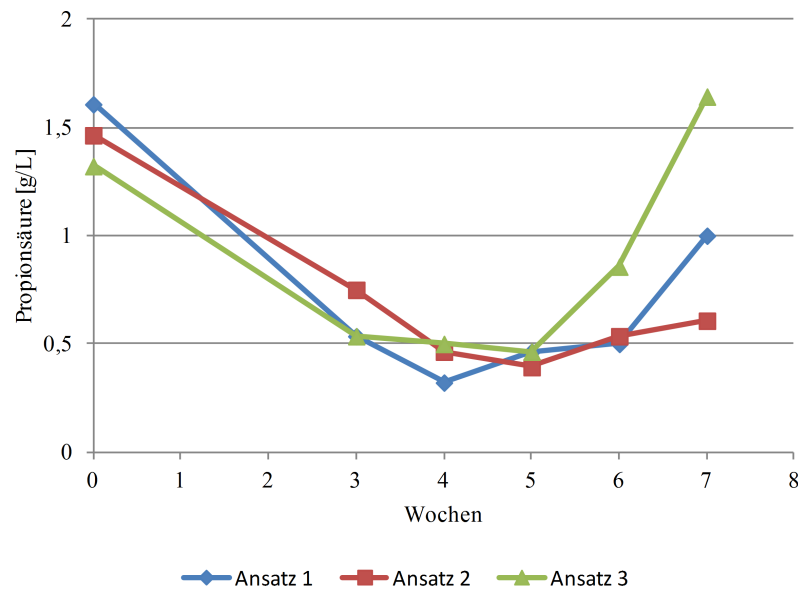


Abbildung 8: **Propionat-Abbau bei einem Reaktorfiltrat-Anteil von 10 %.** Kultivierung drei paralleler Ansätze der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 in PI-Medium (s. S. 37).

Abbildung 8 zeigt die Verläufe dieser Ansätze. Während in Ansatz 2 der Anstieg der Propionat-Konzentration von 0,4 auf 0,6 g/L moderat ausfiel, erhöhte sich in den zwei parallelen Proben die Konzentration auf 1,0 (Ansatz 1) bzw. 1,6 g/L (Ansatz 3).

Propionat-Ausgangs-Konzentration Mit der Analyse der Propionat-Ausgangs-Konzentration stand die Frage im Raum, ob die Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen auch stark erhöhte Konzentrationen tolerieren würden. Die Etablierung und Aufrechterhaltung der Kulturen lief in PI-Medium mit einer Propionat-Ausgangskonzentration von 1,5 g/L Propionsäure (1,95 g/L Natrium-Propionat). Die Fragestellung wurde wiederum mit dreifach-Ansätzen der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 untersucht. Abbildung 9 zeigt die Verläufe der Propionat-Verwertung ausgehend von 1,5 g/L, 2,0 g/L, 3,0 g/L und 3,5 g/L Propionat-Konzentration. Auf den ersten Blick erschienen die Verläufe sehr ähnlich. Bei genauerer Betrachtung fiel jedoch auf, dass, je höher die Ausgangskonzentration lag, prozentual weniger Propionsäure verwertet wurde. So betrug die prozentuale Verringerung der Propionat-Konzentration 86,7 %, 81,7 %, 76,8 % und 69,5 % für die Ansätze mit 1,5 g/L, 2,0 g/L, 3,0 g/L und 3,5 g/L Propionsäure. Folglich erhöhte

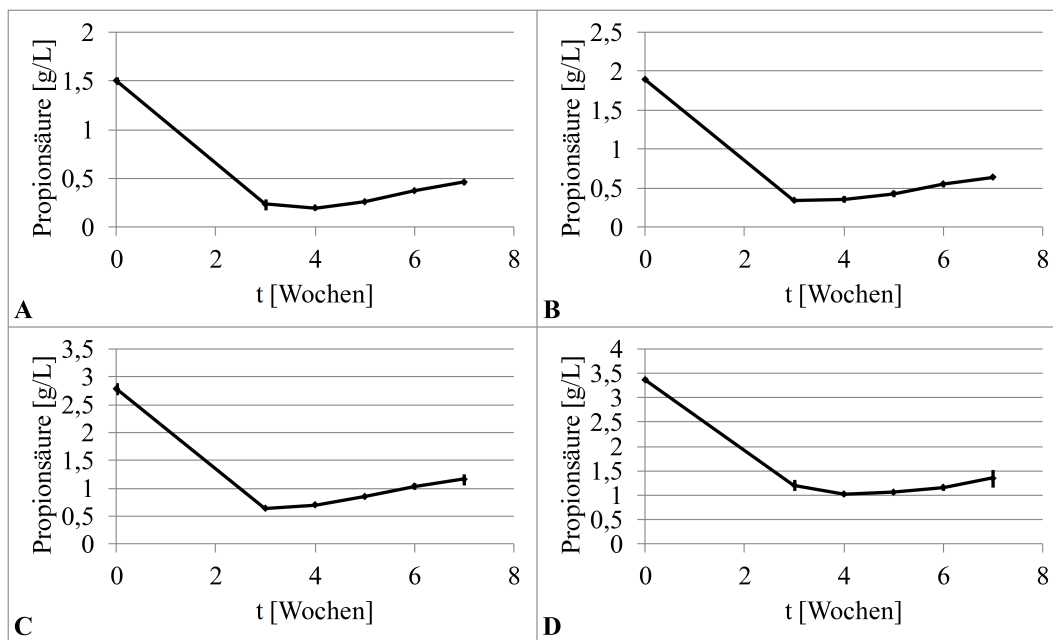


Abbildung 9: **Verwertung variabler Propionsäure-Konzentrationen.**

A: 1,5 g/L, **B:** 2,0 g/L, **C:** 3,0 g/L, **D:** 3,5 g/L Propionsäure. Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 in PI-Medium (s. S. 37). Angegeben sind die Mittelwerte drei paralleler Ansätze mit Standardabweichung der Messreihe.

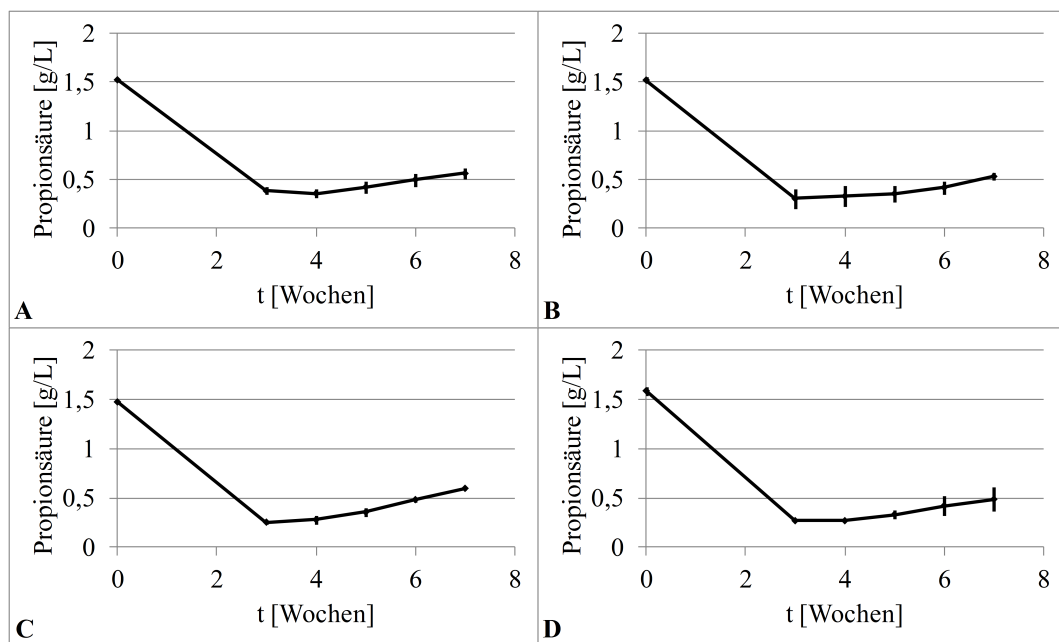


Abbildung 10: **Propionat-Verwertung bei unterschiedlichen pH-Werten.**

Es wurden Ausgangs-pH-Werte von **A:** pH 7.5, **B:** pH 7.7, **C:** pH 8.1, **D:** pH 8.3 getestet. Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 in PI-Medium (s. S. 37). Angegeben sind die Mittelwerte drei paralleler Ansätze mit Standardabweichung der Messreihe.

sich die minimal erreichbare Propionat-Konzentration mit Steigerung der Propionat-Ausgangskonzentration.

pH-Wert Neben den soeben dargestellten Untersuchungen bezüglich RF-Anteil und Propionat-Ausgangskonzentration wurden ebenso Versuche angesetzt, welche die Ansprüche an den pH-Wert des Nährmediums überprüfen sollten. Hierzu wurden drei parallele Ansätze der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 auf die Fähigkeit zur Propionat-Verwertung bei pH 7,5, pH 7,7, pH 8,1 und pH 8,3 hin untersucht. Abbildung 10 stellt die gemessenen Verläufe samt Standardabweichungen der Messreihen dar. Es wurde deutlich, dass sich hier die Unterschiede der Verläufe der Propionat-Verwertung in engen Grenzen hielten. Das Minimum der Propionat-Konzentration wurde jeweils nach drei oder vier Wochen erreicht und lag zwischen 0,23 und 0,42 g/L für die einzelnen Ansätze. Auf das Minimum folgte in den weiteren Wochen jeweils ein moderater Anstieg der Propionat-Konzentration auf maximal 0,61 g/L.

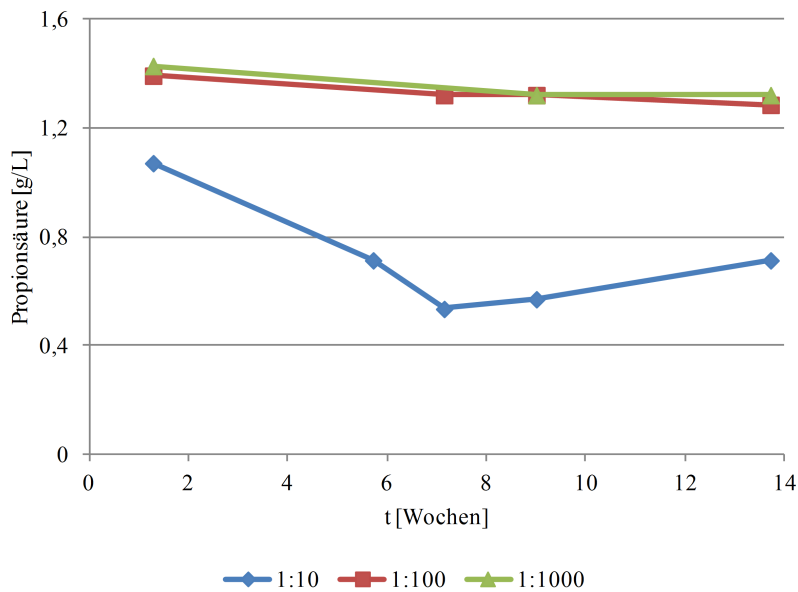


Abbildung 11: **Propionat-Abbau seriell verdünnter Ansätze von G13.**
Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur G13 in PI-Medium (s. S. 37).

4.2.3 Auswirkung der Kulturverdünnung auf den Propionat-Abbau

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen sollte untersucht werden, inwiefern die Propionat-verwertende Aktivität der Anreicherungskulturen durch Verdünnung der mikrobiellen Flora beeinträchtigt wurde. Aus diesem Grund wurde die Propionat-verwertende Aktivität seriell verdünnter Anreicherungskulturen untersucht. Unter Abschnitt 4.2.1 wurde bereits verdeutlicht, dass die Verläufe der Propionat-Verwertung variieren konnten. So wurde die komplette Verwertung der Propionsäure ebenso beobachtet, wie ein zwischenzeitlicher Abbau-Stop bis hin zur Bildung von Propionsäure nach erfolgter Reduzierung der Propionat-Konzentration. Ebenso unterschiedlich fielen die Verläufe der Propionat-Verwertung seriell verdünnter Anreicherungskulturen aus. Abbildung 11 gibt einen Überblick über die Propionat-verwertende Aktivität der Kultur G13. Während die 1:10 verdünnte Kultur die Ausgangskonzentration von 1,5 g/L Propionat (nicht gemessen) auf etwa 0,5 g/L reduzierte, konnte für die 1:100 und 1:1.000 verdünnten Ansätze im Untersuchungszeitraum von 14 Wochen keine Propionat-verwertende Aktivität nachgewiesen werden. Ebenso wie diese zwei Verdünnungsstufen verhielten sich die folgenden 4 seriell verdünnten Ansätze der Kultur G13.

Abbildung 12 zeigt die Propionat-Verwertung seriell verdünnter Proben der Anreiche-

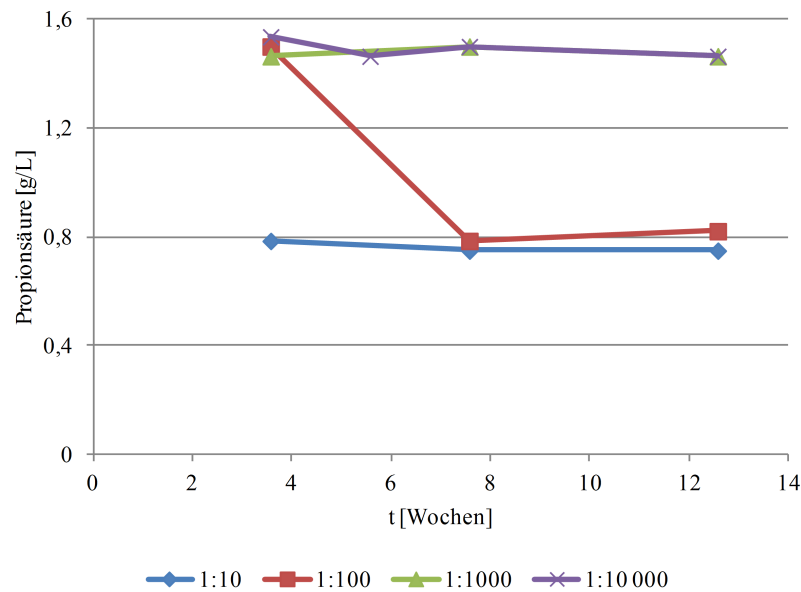


Abbildung 12: **Propionat-Abbau seriell verdünnter Ansätze von S2.**

Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur S2 in PI-Medium (s. S. 37).

rungskultur S2. Wieder lag die Ausgangskonzentration bei 1,5 g/L (nicht gemessen). Während die 1:10 verdünnte Probe die Propionat-Konzentration innerhalb von vier Wochen auf etwa 0,8 g/L senkte, gelang dies der 1:100 verdünnten Probe erst nach vier bis acht Wochen. Die nächsten fünf Verdünnungsstufen zeigten innerhalb von 13 Wochen keine Propionat-Verwertung (gezeigt sind nur die Proben der 1:1.000 und 1:10.000 Verdünnungen).

Ein gänzlich anderes Bild ergaben die seriell verdünnten Proben der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12. In Abbildung 13 ist die Propionat-verwertende Aktivität der ersten fünf Verdünnungsstufen dieser Kultur dargestellt. Wiederum betrug die Ausgangskonzentration 1,5 g/L (nicht gemessen). Erwartungsgemäß zeigte die 1:10-Verdünnung zu Beginn die höchste Propionat-Verwertung. Es folgte die Probe der Verdünnungsstufe 1:100. Die Proben der 1:1.000- und 1:100.000-Verdünnungen zeigten einen in etwa identischen Verlauf. Sie kamen erst spät in Gang, verliefen nach etwa neun Wochen aber umso dynamischer. Interessanterweise zeigte die zwischen diesen beiden Proben liegende 1:10.000-Verdünnung keinen Propionat-Abbau. Ebenso zeigten die Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} keine Propionat-Verwertung.

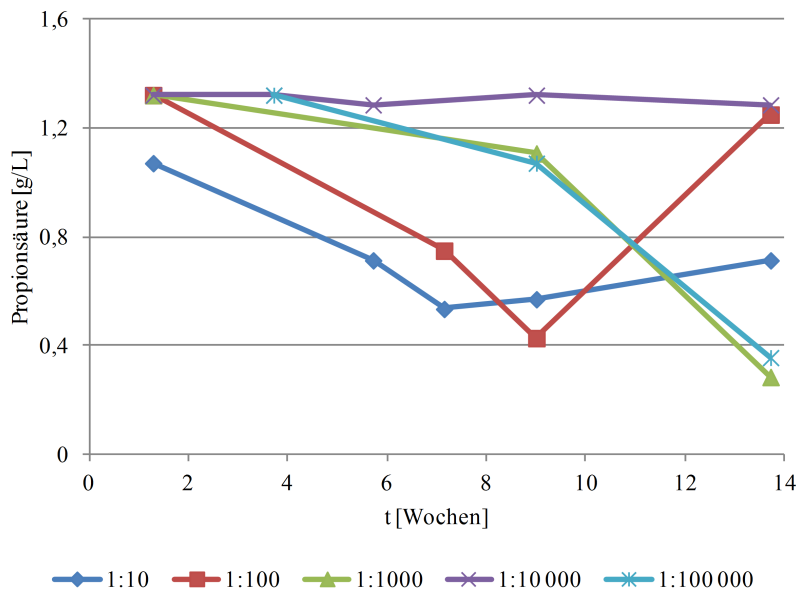


Abbildung 13: **Propionat-Abbau seriell verdünnter Ansätze von N12.**
Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 in PI-Medium (s. S. 37).

4.3 Morphologische Zell-Diversität der Anreicherungskulturen

Während der Arbeit mit den Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen wurden regelmäßig mikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um gegebenenfalls Gemeinsamkeiten, Unterschiede und sukzessive Veränderungen feststellen zu können. Im Folgenden sollen einige Bilder einen Einblick in die mikrobiellen Morphologien der Kulturen geben. Die Aufnahmen beziehen sich auf zwischenzeitlich eingefrorene Proben der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a, welche im Rahmen der sukzessiven Diversitätsanalyse (Abschnitt 4.4) untersucht wurden. Die Probenentnahmen erfolgten 14, 39 und 56 Tage nach überimpfen in frisches PI-Medium. Der Fortschritt der Propionat-Verwertung dieser Proben ist dem Abschnitt über die sukzessive Diversitätsanalyse zu entnehmen (Abbildung 23, S. 70). Einige Aufnahmen ließen vermuten, dass bestimmte Zellformen häufiger vorkamen als andere. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass keines der Bilder quantitative Verhältnisse widerspiegelte. Ebenso konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die Aufnahmen das Spektrum der in den Kulturen vorkommenden Zellformen vollständig repräsentierten.

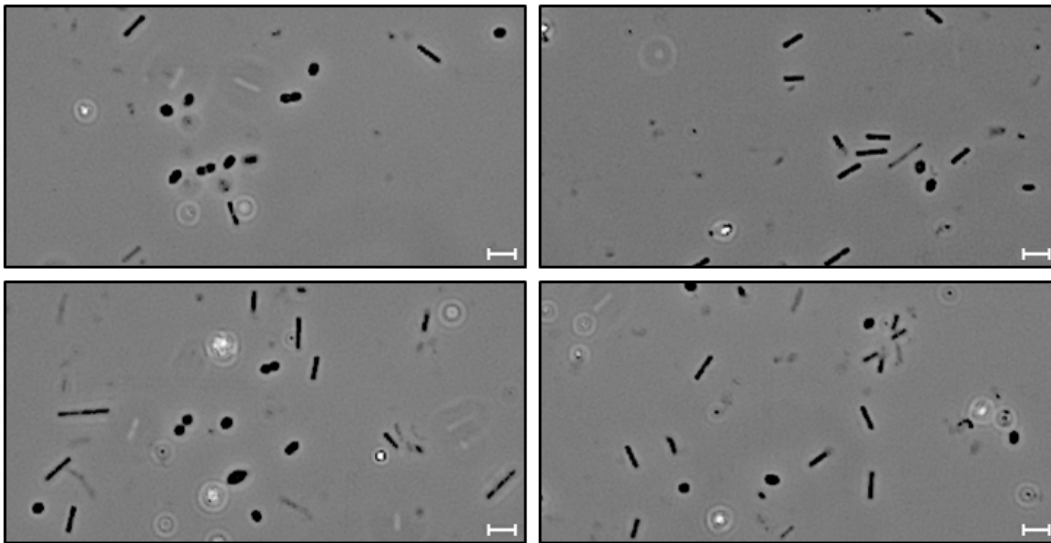
Zunächst werden in den Abbildungen 14, 15, 16 und 17 Aufnahmen gezeigt, welche 39 Tage nach überimpfen aufgenommen wurden. Zu diesem Zeitpunkt hatten die

Anreicherungskulturen 67 % (Ap1a), 0 % (G12), 28 % (N12), sowie 34 % (Wp2a) der zu Beginn vorliegenden Menge an Propionsäure abgebaut.

Die Ausschnitte der Probe Ap2 (Abbildung 14, 67 % Propionat verwertet) ließen überwiegend Stäbchen und Kokken erkennen. Einige der Kokken machten den Eindruck, als teilten sie sich gerade oder hätten die Teilung soeben vollzogen. Im Unterschied zu den weiteren Anreicherungskulturen wurden hier keine Zell-Konglomerate beobachtet. Den Aufnahmen der Probe G2 (Abbildung 15, 0 % Propionat verwertet) fehlten diese Art der Kokken. Stäbchen waren jedoch auch hier vorhanden. Diese waren etwas kleiner als in Probe Ap2. Dazu fielen eine Reihe gekrümmter Stäbchen auf, die beispielsweise von Vertretern der Gattung *Desulfovibrio* bekannt sind (Baena et al., 1998a). Ebenso konnten unregelmäßig geformte lange Stäbchen beobachtet werden. In der Probe N2 (Abbildung 16, 28 % Propionat verwertet) fiel ein Zell-Konglomerat auf (linke Abbildung). Hier ließen sich sowohl Kokken-, als auch Stäbchenformen ausmachen. Darüber hinaus waren unregelmäßige Strukturen und Partikel erkennbar. Diese Form der Agglomeration von Zellen konnte wiederholt beobachtet werden, wobei die Größe der Konglomerate beträchtliche Maße erreichen konnten (siehe Abbildung 20). Die rechte Aufnahme zeigt etwa 1-2 μm lange eiförmige Stäbchen der Probe N2. Abbildung 17 gibt einen Einblick in die Morphologien der Organismen aus der Anreicherungskultur Wp2a (34 % Propionat verwertet). Für die Probe Wp2 konnte ebenfalls solch ein soeben vorgestelltes Zell-Konglomerat aufgenommen werden (linkes Bild). Hier waren deutlich mehr Stäbchen erkennbar als in der Kultur N2 (Abbildung 16). Das mittlere und rechte Bild zeigen weitere Stäbchen und Kokken.

Zu den Zeitpunkten t-1 nach 14 Tagen und t-3 nach 56 Tagen wurden ebenfalls Aufnahmen gemacht. Abbildung 18 zeigt ausgewählte Ausschnitte, welche den Überblick über die Morphologien aus den Abbildungen 14 bis 17 ergänzen sollen. Hier waren Stäbchen mit Zelleinschlüssen, Stäbchen in Scheiden, hakenförmige Stäbchen, Kokken, unregelmäßige Formen, sowie zitronenförmige Zellen erkennbar. Letztere ähneln der Zell-Morphologie der Propionat-oxidierenden Spezies *Pelotomaculum schinkii* (de Bok et al., 2005).

Aufgrund der Bedeutung von Zell-Konglomeraten für die Zusammenarbeit syntropher Organismen (Ishii et al., 2005; Felchner-Zwirello et al., 2013) sollen drei Aufnahmen von etwas größeren Konglomeraten als jenen aus Abbildung 16 und 17 einen weiteren Einblick in die Organisation der Organismen geben. Abbildung 19 zeigt ein kleines Zell-Konglomerat der Probe N3 (100 % Propionat verwertet). Da es sich zur Zeit der mikroskopischen Untersuchung im Begriff der Auflösung befand, waren einige



Abbildungung 14: **Zell-Morphologien der Anreicherungskultur Ap1a.**

Mikroskopie unter Phasenkontrast nach 39 Tagen Inkubation (Probe Ap2) in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure (z. Z. der Aufnahmen waren 67 % verwertet). Abgebildet ist eine unvollständige Auswahl der in der Kultur vorkommenden Morphologien. Die Probe war vorübergehend eingefroren und wurde für die Aufnahmen aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

Zellformen sehr gut erkennbar. Hierunter fielen recht große Kokken, unterschiedlich lange, jedoch dünne Stäbchen, dicke eiförmige Stäbchen, sowie die bereits erwähnten zitronenförmigen Zellen, welche an die Zell-Morphologie von *Pelotomaculum schinkii* erinnern (de Bok et al., 2005). Dieselben Morphologien schienen das Konglomerat aus Abbildung 20 zu bilden. Dieses entstammte ebenfalls der Probe N3 (nach 56 Tagen Inkubation, 100 % Propionat verwertet) und verdeutlicht die Ausmaße, welche diese Konglomerate annehmen konnten. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die Konglomerate während der Präparation zerbrachen und in der Kultur noch größer ausfielen. Dass Anteile solcher Konglomerate von methanogenen Archaea gebildet wurden, verdeutlicht Abbildung 21. Hier wurde die Propionat-verwertende Anreicherungskultur Wp2a unter Fluoreszenzlicht (420 nm) mikroskopiert, welches den Kofaktor F_{420} der Methanbakterien zu einer Emission grüner Fluoreszenz (520 nm) anregt (Eirich et al., 1978).

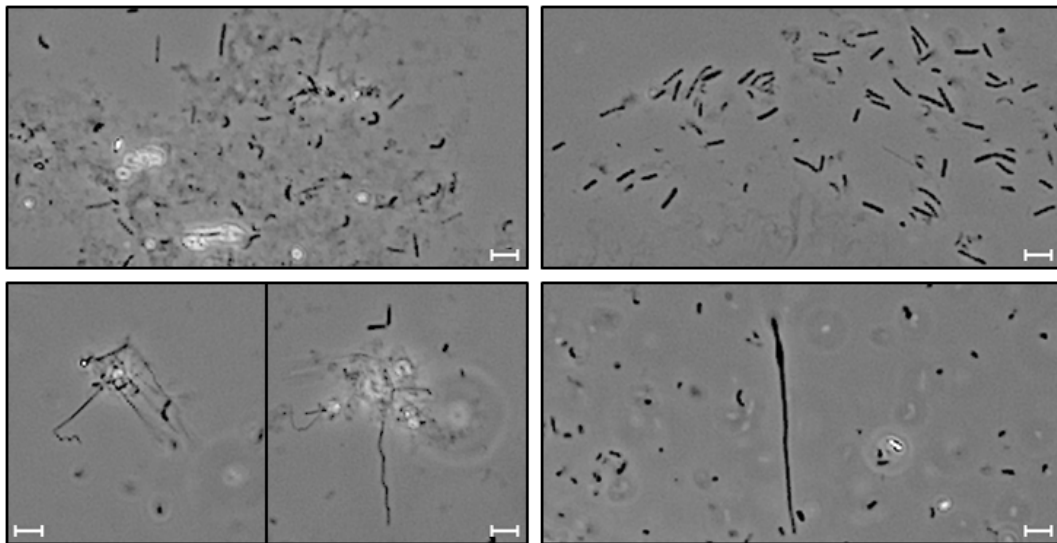


Abbildung 15: **Zell-Morphologien der Anreicherungskultur G12.**

Mikroskopie unter Phasenkontrast nach 39 Tagen Inkubation (Probe G2) in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure (z. Z. der Aufnahmen waren 0 % verwertet). Abgebildet ist eine unvollständige Auswahl der in der Kultur vorkommenden Morphologien. Die Probe war vorübergehend eingefroren und wurde für die Aufnahmen aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

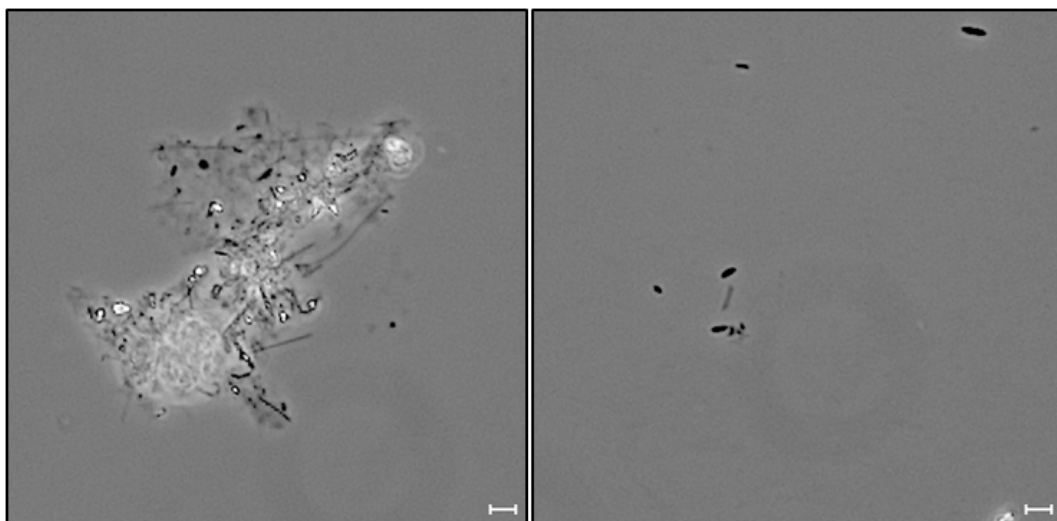


Abbildung 16: **Zell-Morphologien der Anreicherungskultur N12.**

Mikroskopie unter Phasenkontrast nach 39 Tagen Inkubation (Probe N2) in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure (z. Z. der Aufnahmen waren 28 % verwertet). Abgebildet ist eine unvollständige Auswahl der in der Kultur vorkommenden Morphologien. Die Probe war vorübergehend eingefroren und wurde für die Aufnahmen aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

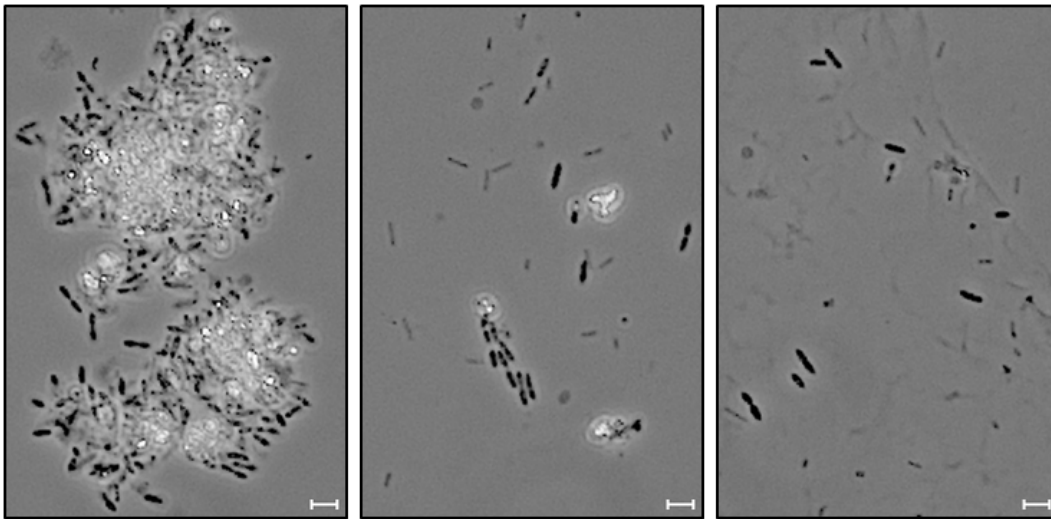


Abbildung 17: **Zell-Morphologien der Anreicherungskultur Wp2a.**

Mikroskopie unter Phasenkontrast nach 39 Tagen Inkubation (Probe Wp2) in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure (z. Z. der Aufnahmen waren 34 % verwertet). Abgebildet ist eine unvollständige Auswahl der in der Kultur vorkommenden Morphologien. Die Probe war vorübergehend eingefroren und wurde für die Aufnahmen aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

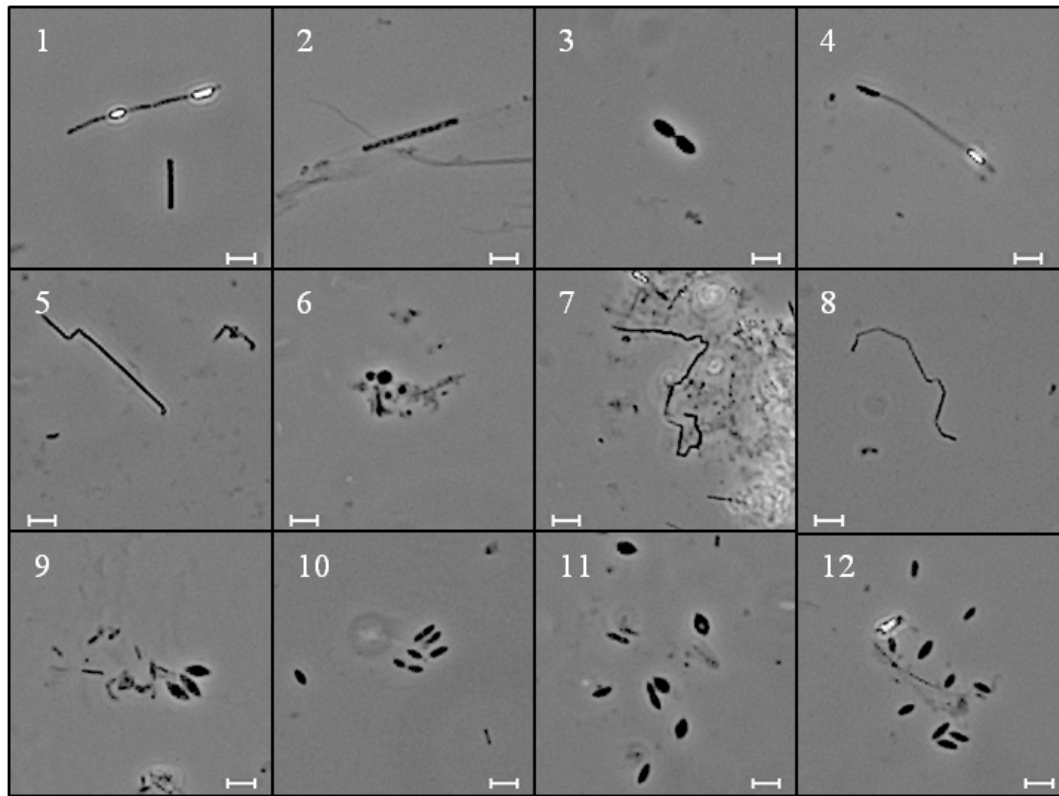


Abbildung 18: **Diversität der Zell-Morphologien (Ergänzung).**

Mikroskopische Aufnahmen unter Phasenkontrast der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a nach 14 (Proben Ap1, Wp1) bzw. 56 Tagen (Proben Ap3, G3, N3, Wp3) Inkubation in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure. **1-3:** Ap1 (15 % Propionat verwertet), **4:** Ap3 (100 % Propionat verwertet), **5-7:** G3 (0 % Propionat verwertet), **8-9:** N3 (100 % Propionat verwertet), **10:** Wp1 (37 % Propionat verwertet), **11-12:** Wp3 (100 % Propionat verwertet). Abgebildet ist eine unvollständige Auswahl der in den Kulturen vorkommenden Morphologien, welche die Einblicke aus den Abbildungen 14 bis 17 ergänzen sollen. Die Proben waren vorübergehend eingefroren und wurden für die Aufnahmen aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

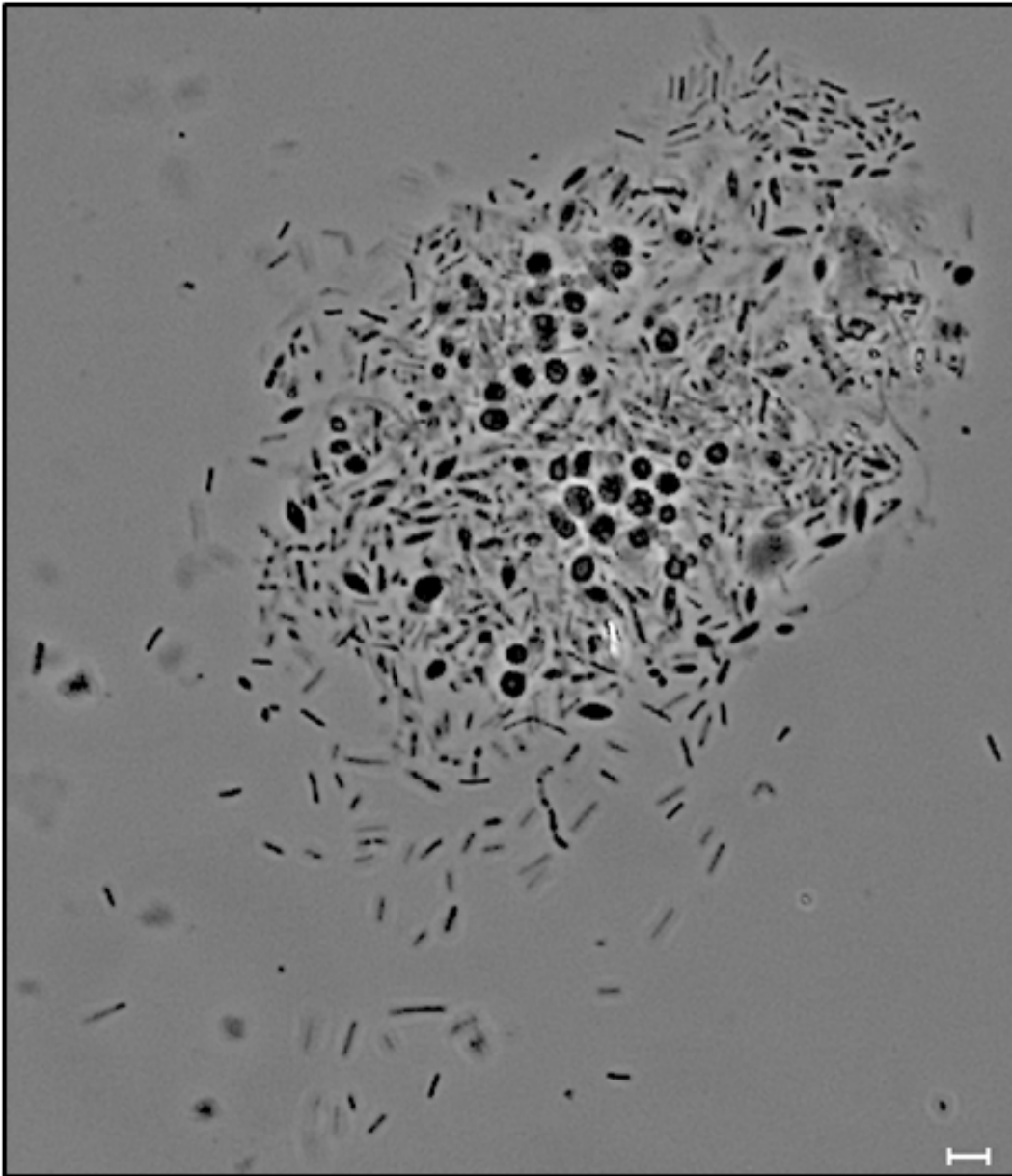


Abbildung 19: **Kleines Zell-Konglomerat der Anreicherungskultur N12.** Mikroskopische Aufnahme unter Phasenkontrast der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 nach 56 Tagen Inkubation (Probe N3) in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure (100 % verwertet). Abgebildet ist ein relativ kleines Konglomerat verschiedener Organismen, welches unterschiedliche Zell-Morphologien erkennen lässt. Die Probe war vorübergehend eingefroren und wurde für die Aufnahme aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

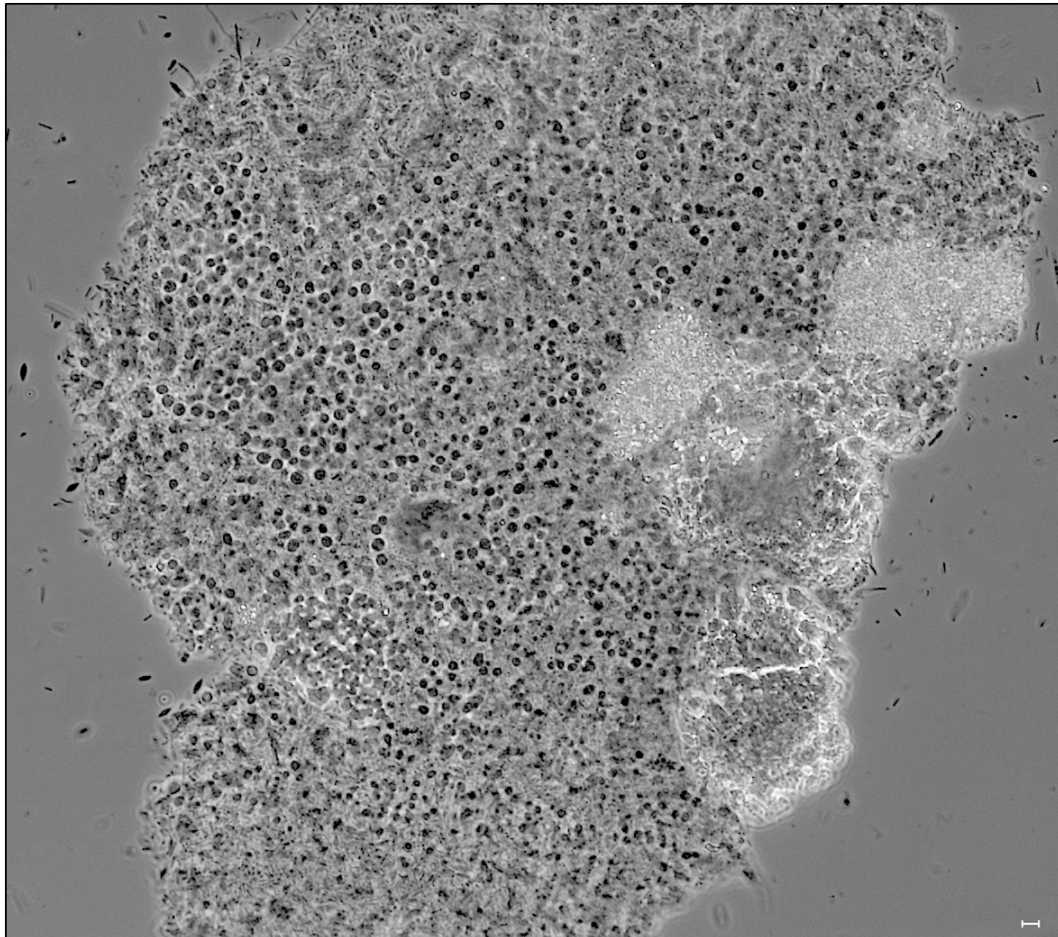


Abbildung 20: **Großes Zell-Konglomerat der Anreicherungskultur N12.** Mikroskopische Aufnahme unter Phasenkontrast der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12 nach 56 Tagen Inkubation (Probe N3) in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure (100 % verwertet). Abgebildet ist ein Konglomerat verschiedener Organismen, welches die Maße großer Konglomerate verdeutlichen soll. Die Probe war vorübergehend eingefroren und wurde für die Aufnahme aufgetaut. Maßstabsbalken: 3 μm .

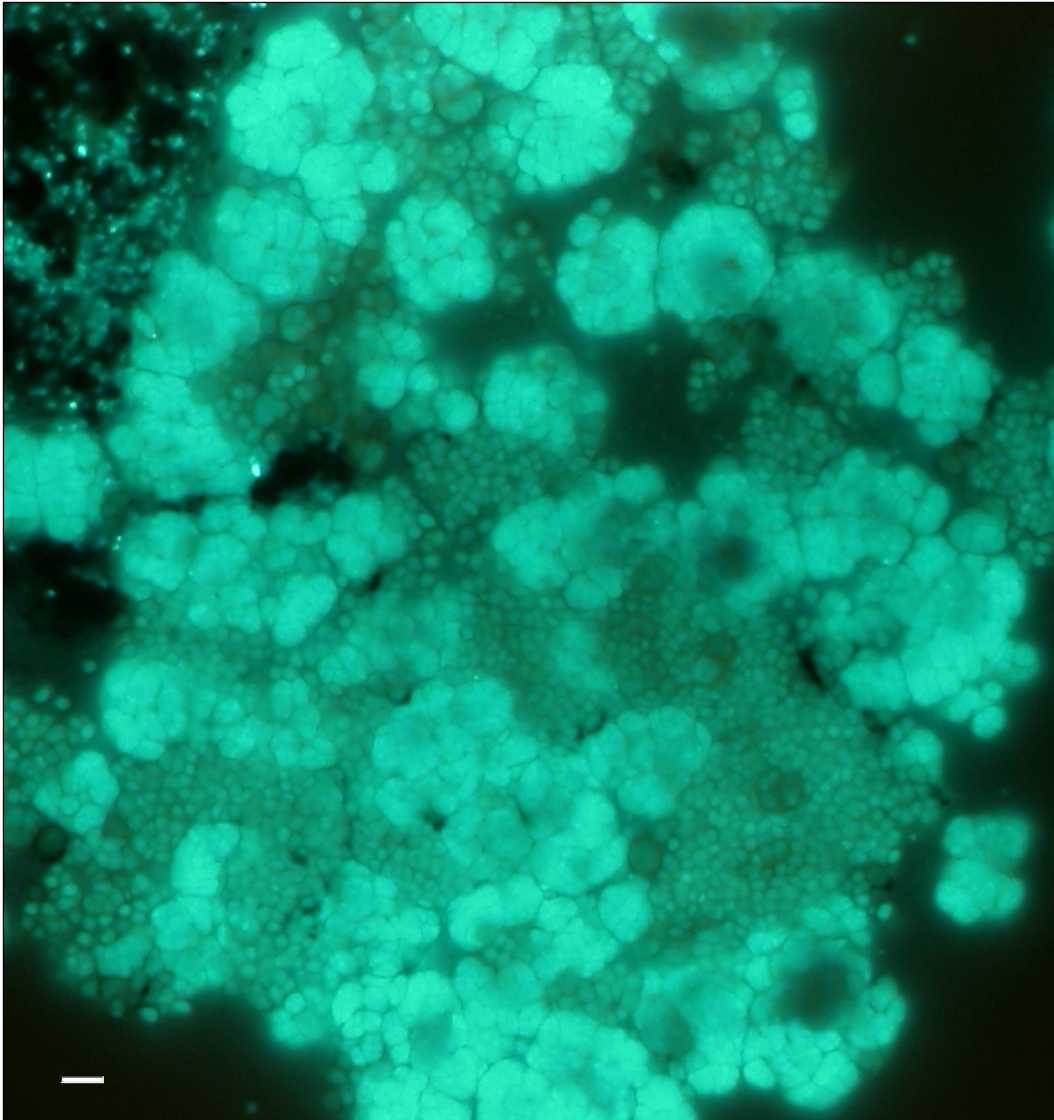


Abbildung 21: **Archaeelle Konglomerat-Anteile (Fluoreszenz).**

Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur Wp2a in PI-Medium. Abgebildet ist ein Konglomerat unter Fluoreszenzlicht (420 nm). Emission grüner Fluoreszenz (520 nm) wies auf das Vorhandensein methanogener Archaea hin. Maßstabsbalken: 5 μm .

4.4 Sukzession der mikrobiellen Diversität der Anreicherungskulturen

4.4.1 Vorgehensweise

Mit dem Ziel die Propionat-verwertenden Schlüsselspezies der untersuchten NawaRo-BGA (siehe Tabelle 13, S. 40) zu identifizieren, wurden Analysen zur Zusammensetzung der etablierten Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen (Tabelle 14, S. 49) geplant. Da in einer vorherigen Arbeit die Vermutung geäußert wurde, es könnte sich um bisher unbekannte oder bisher noch nicht als Propionat-Abbauer identifizierte Bakterien handeln (Seyfarth, 2012), stand die Frage im Raum, wie sich die Propionat-verwertenden Schlüsselspezies würden identifizieren lassen. Da Verdünnungsreihen der Anreicherungskulturen ihre Propionat-verwertende Aktivität teilweise verloren (Abschnitt 4.2.3, S. 56), schied eine Identifizierung der Schlüsselspezies durch Verdünnung aus. In vivo-Identifizierung, beispielsweise mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, erschien unter der Annahme bisher unbeschriebene Spezies zu suchen als ungeeignet. So wurde eine sukzessive Diversitätsanalyse gewählt, um mit der Kenntnis der sich im Verlauf der Propionat-Verwertung verändernden Spezies-Zusammensetzung eine Basis zur Identifizierung des Schlüsselorganismus zu schaffen. Zu drei unterschiedlichen Analysezeitpunkten sollte die sich sukzessiv verändernde bakterielle Diversität untersucht und mit der Propionat-Abbauaktivität korreliert werden. Würden Arten von der Propionat-Verwertung profitieren, so war die Annahme, müsste sich ihr Anteil an der Gesamtheit der Organismen in der Kultur erhöhen. Abbildung 22 zeigt beispielhaft, wie solch ein Zusammenhang aussehen konnte. Während Spezies 1 (blau) zu Beginn der Propionat-Verwertung dominierte, erhöhte sich mit Verringerung der Propionat-Konzentration der Anteil von Spezies 3 (grün), welche damit ein Kandidat für eine der Propionat-verwertenden Schlüsselspezies wäre. Spezies 2 (rot) veränderte hier kaum seine Anteile.

Zur Durchführung der sukzessiven Diversitätsanalyse wurden die Anreicherungskulturen zeitgleich in Propionat-haltiges Medium der gleichen Charge überimpft (Abschnitt 3.5.4, S. 41). Zu drei Zeitpunkten (nach 14, 39 und 56 Tagen) wurden jeweils die Propionat-Werte der Kulturen gemessen und eine Probe zur mikrobiellen Analyse entnommen. Die genomische DNA wurde isoliert, die 16S rDNA amplifiziert und kloniert. Eine folgende Restriktionsanalyse (ARDRA) wurde angeschlossen, um die 16S rDNA-Klone in ARDRA-Gruppen einzuteilen, von denen jeweils ein Vertreter zwecks Identifizierung sequenziert wurde.

Um eine Vergleichbarkeit der Sequenzen aus den verschiedenen Konsortien unterein-

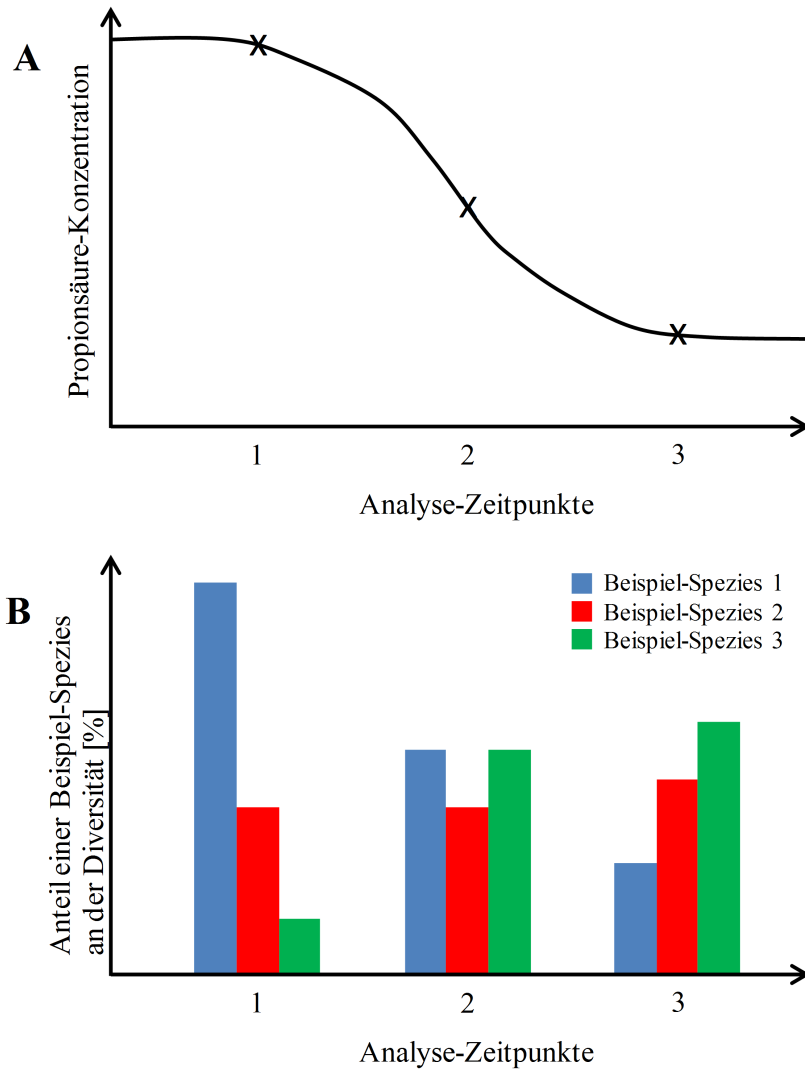


Abbildung 22: **Sukzessive Diversität während der Propionat-Verwertung.**
A: Beispielhafter Verlauf der Propionat-Verwertung einer Propionat-verwertenden Anreicherungs-kultur. **B:** Sukzessive Veränderung der Diversität dreier Beispiel-Spezies während der oben gezeigten Propionat-Verwertung.

ander zu gewährleisten, wurden die Rohdaten gemeinsam, sozusagen als Datenpaket, ausgewertet. Hierfür wurden die Sequenzdaten (Sequenzierungs-Chromatogramme, ABI-Format) zunächst optimiert und in das FASTA-Format übersetzt. Daraufhin wurden diese in zwei Gruppen eingeteilt, Gruppe P (plus) der vorwärts und Gruppe M (minus) der rückwärts amplifizierten Klone (Erklärung ab S. 75). Chimäre Sequenzen wurden identifiziert und entfernt. Die zwei Gruppen (P und M) wurden durch Resequenzierung der Gruppe P-Sequenzen zu einer gemeinsamen Gruppe MP zusammengeführt. Schließlich wurden die nun hinsichtlich ihrer Orientierung genormten Sequenzdaten via hierarchischer Clusteranalyse phylogenetisch gruppiert. Final wurden die bakteriellen Spezies-Zusammensetzungen der untersuchten Proben ermittelt. Da die anaerobe Verwertung von Propionsäure von einem niedrigen Wasserstoff-Partialdruck abhängt und methanogene Archaea mittels hydrogenotropher Methanogenese zu diesem beitragen (siehe Abschnitt 2.5, S. 21), wurde zusätzlich je Propionat-verwertender Anreicherungskultur eine stichprobenartige Klonanalyse archaeeller 16S rDNA Amplifikate angeschlossen. Die soeben dargelegte Vorgehensweise wird in folgender Liste noch einmal zusammengefasst und in dem kommenden Abschnitt 4.4.2 *Generierung und Aufarbeitung der Daten* unter Präsentation der Ergebnisse verdeutlicht.

- Kultivierung und chemische Analytik (HPLC) (S. 70)
- DNA-Isolierung, 16S rDNA PCR und molekulare Klonierung (S. 72)
- Gruppierung der 16S rDNA Klone mittels ARDRA-Analyse (S. 73)
- Sequenzierung der 16S rDNA Klone und Bildung der Sequenz-Gruppen M (minus) und P (plus) (S. 75)
- Entfernung chimärer Sequenzen der Gruppe P (S. 75)
- Vereinigung der Sequenz-Gruppen M und P zur Sequenz-Gruppe MP (S. 78)
- Entfernung chimärer Sequenzen der Gruppe MP (S. 80)
- Bildung von Sequenz-Clustern innerhalb der Gruppe MP (S. 80)
- Ermittlung der Spezies-Zusammensetzungen der untersuchten Proben (S. 80)
- Stichprobenartige Klonanalyse archaeeller 16S rDNA Amplifikate (S. 82)

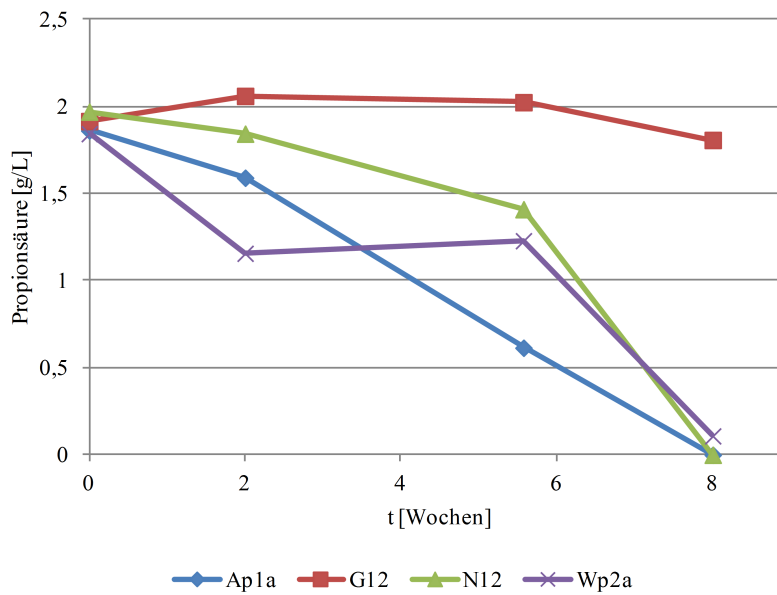


Abbildung 23: **Verläufe der Propionat-Verwertung.**

Die Verläufe wurden während der Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a für die Ermittlung der sukzessiven Diversität während der Propionat-Verwertung aufgenommen. Zu den drei Messpunkten nach 14, 39 und 56 Tagen wurden zudem Proben für die Ermittlung der sukzessiven Diversität entnommen.

4.4.2 Generierung und Aufarbeitung der Daten

Propionat-Verwertung und Proben für die sukzessive Diversitätsanalyse

Zunächst erfolgte die Kultivierung der zu analysierenden Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a. Diese waren aus verschiedenen NawaRo-BGA gewonnen worden (Abschnitt 4.1, S. 48) und wiesen einen reproduzierbaren Abbau von Propionsäure auf. Kultiviert wurde in PI-Medium mit 2 g/L Propionsäure und 10 % Reaktorfiltrat. Das Medium sollte modellhaft die Situation einer Biogasanlage unter prozessbelastend erhöhter Propionat-Konzentration simulieren. Zu drei Zeitpunkten wurden Proben zur Messung des Propionat-Gehaltes via HPLC und für die mikrobielle Analyse entnommen. Die Probenentnahme erfolgte nach 14 (t-1), 39 (t-2) und 56 Tagen (t-3). Wie Abbildung 23 zeigt, konnten auf diese Weise Proben erhalten werden, welche die mikrobielle Flora zu Zeitpunkten unterschiedlicher Propionat-Konzentrationen repräsentierten.

Im Laufe des Messzeitraumes von 8 Wochen verwerteten die Konsortien Ap1a, N12 und Wp2a den Anfangs-Propionat-Gehalt von 2 g/L nahezu komplett. Der Verlauf

Tabelle 15: **Bezeichnung der Proben für die sukzessive Diversitätsanalyse.** Die Proben wurden nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Abbildung 23, S. 70) für die Ermittlung der sukzessiven Diversität entnommen.

Proben-Zeitpunkte	Anreicherungskultur			
	Ap1a	G12	N12	Wp2a
t-1 (14 Tage)	Ap1	G1	N1	Wp1
t-2 (39 Tage)	Ap2	G2	N2	Wp2
t-3 (56 Tage)	Ap3	G3	N3	Wp3

unterschied sich jedoch zwischen den Kulturen. Konsortium Ap1a verringerte die Konzentration am effizientesten und kontinuierlich. Nach etwa 5,5 Wochen lag die Propionat-Konzentration nahezu bei 0,5 g/L. Kultur N12 verwertete die Propionsäure ebenfalls kontinuierlich, erreichte nach 5,5 Wochen jedoch erst 1,4 g/L. Wp2a baute die Propionsäure zu Beginn am effizientesten ab (1,2 g/L nach 2 Wochen), ging dann aber offenbar in eine Phase der Gärstockung über, da sich der Propionat-Gehalt von t-1 bis t-2 kaum veränderte. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die vier Messzeitpunkte lediglich einen punktuellen Einblick in den Verlauf der Propionat-Verwertung ermöglichten. Zum Verlauf der Propionat-Konzentration zwischen den Messzeitpunkten wurden keine Daten erhoben. Auch eine vorübergehende Aktivität Propionat-bildender Organismen konnte folglich nicht ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 6, S. 51). Kultur G12 führte als einzige der vier Anreicherungskulturen kaum zu einer Reduzierung der Propionat-Konzentration und diente daher im weiteren Verlauf der sukzessiven Diversitätsanalyse als Negativ-Kontrolle, in der die Propionat-verwertenden Schlüsselspezies offensichtlich nicht aktiv gewesen waren.

Die zu den in Abbildung 23 dargestellten Zeitpunkten entnommenen mikrobiellen Proben sollten nun hinsichtlich ihrer bakteriellen Diversität analysiert werden. Damit im weiteren Verlauf der Arbeit die Übersichtlichkeit der Kultur-, Proben- und Klon-Bezeichnungen durchgehend gewährleistet ist, werden in Tabelle 15 eindeutige Proben-Bezeichnungen eingeführt. Die zu den drei Zeitpunkten t-1, t-2 und t-3 genommenen Proben der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a erhielten Bezeichnungen nach demselben Muster. Die mikrobiellen Proben zum Zeitpunkt t-2 wurden beispielsweise als Ap2, G2, N2 und Wp2 bezeichnet. Aus diesen Proben gewonnenen 16S rDNA-Klone wurden dann einfach durchnummeriert. Die jeweiligen 16S rDNA-Klone mit der Nummer 24 erhielten also die Bezeichnungen Ap2-24, G2-24, N2-24 und Wp2-24.

Nach der Kultivierung der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen und Entnahme der mikrobiellen Proben (Abbildung 23), erfolgte nun deren DNA-Isolierung (siehe Abschnitt 3.8.1, S. 43). Die Isolierungsmethoden werden gewöhnlich hinsichtlich des Zellaufbaus der Zielzellen ausgewählt. Möchte man beispielsweise die DNA Gram-negativer Bakterien isolieren, so verwendet man eine entsprechende Isolierungsstrategie, welche die Zerstörung der äußeren Membran Gram-negativer Zellen zur Folge hat. Aufgrund der vielfältigen Ausführungen und Modifikationen bakterieller und archaeeller Zellwandstrukturen (Schleifer and Kandler, 1972; Kandler and König, 1998; Albers and Meyer, 2011) kann keine Strategie eine exakt gleichverteilte Lyse der verschiedenen Organismen gewährleisten. Da jedoch die Information aller in den Proben enthaltenen Organismen von Interesse war, sollte hier eine DNA-Isolierungsmethode mit möglichst geringen selektiven Eigenschaften die Auswirkungen dieses Problems minimieren. Nach Salonen et al. (2010) ist zu diesem Zweck eine Methode mit mechanischer Zelllyse besonders geeignet. Folglich wurde eine Methode gewählt, welche eine mechanische Lyse mittels Glaskügelchen durchführt, die den Zellwänden Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien, sowie von Archaea für 10 Minuten durch kräftiges Vortexen gleichermaßen zusetzte (siehe Abschnitt 3.8.1, S. 43).

Mit dem Ziel die Zusammensetzung der mikrobiellen Proben (Tabelle 15) zu analysieren, wurde eine molekulare Klonierung der 16S rDNA durchgeführt. Diese erforderte zunächst die Amplifikation des Gens mittels Touchdown(TD)-PCR (Abschnitt 3.8.2, S. 43). Das TD-Verfahren reduziert die Annealing-Temperatur mit voranschreiten der Amplifikations-Zyklen und wurde gewählt, weil im Vorfeld die Organismen-Zusammensetzung nicht bekannt war. So sollte die Bevorzugung einzelner Spezies aufgrund zufälligerweise optimaler Annealing-Temperatur ausgeschlossen werden. Des Weiteren erleichtert die TD-PCR die Amplifikation von Sequenzen, welche Sekundärstrukturen ausbilden (Korbie and Mattick, 2008). Es sei darauf hingewiesen, dass die PCR hier nicht der Quantifizierung diene. Zu diesem Zweck wurde die qPCR eingesetzt (siehe Abschnitt 4.4.8, S. 106). Die PCR-Produkte wurden daraufhin mittels pCR4-TOPO TA Vector kloniert (Abschnitt 3.8.4, S. 45), um sie sequenzierfähig zu machen. Die Sequenzierung erfolgte aus dem Vektor heraus mit dem Vorwärts-Primer T3. Um auszuschließen, dass Sequenzen aus dem Nährmedium (z. B durch Zugabe des RF) die Analysen hinsichtlich der bakteriellen Diversität verfälschten, wurde die DNA aus unbeimpftem PI-Medium (3 Proben) ebenfalls isoliert und mittels 16S rDNA PCR auf Amplifikate hin getestet. Mittels Gel-Elektrophorese konnte hier keine Amplifikation nachgewiesen werden.

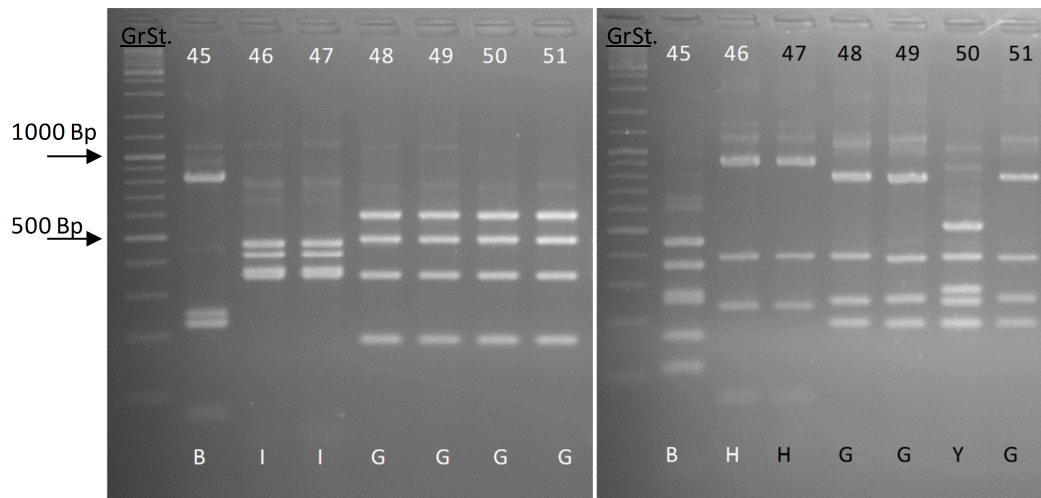


Abbildung 24: **Beispielhafter Restriktionsverdau (Probe Ap1).**

Linkes Gelbild: HhaI-Verdau, **rechtes Gelbild:** HinfI-Verdau, Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung, GrSt.: Molekularer Größenstandard, Bp: Basenpaare.

ARDRA-ermittelte Diversität der 16S rRNA-Gene Aus allen 12 Proben der Tabelle 15 wurde die DNA isoliert und die 16S rDNA-Gene amplifiziert. Insofern standen 12 molekulare Klonierungen an. Da 60 Klone je Klonierung, also 720 Klone analysiert werden sollten, erfolgte vor der Sequenzierung eine ARDRA-Analyse der Klone (Abschnitt 3.8.5, S. 45). Diese ermöglichte das Einsparen von Sequenzierungen durch die Einteilung der Klone in ARDRA-Gruppen, von denen je ein Vertreter sequenziert wurde. Bei den Restriktionsenzymen für die ARDRA-Analyse handelte es sich um HhaI und HinfI (siehe Abschnitt 3.8.5, S. 45). Abbildung 24 zeigt beispielhaft den Restriktionsverdau der Klone Ap1-45 bis Ap1-51 der Probe Ap1. Die Aussagekraft der ARDRA-Analyse wurde durch den Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym entscheidend erhöht. Dies lässt sich hier gut an den Klonen Ap1-48 bis Ap1-51 darstellen. Während der HhaI-Verdau (linke Seite) für die genannten Klone identische Muster erzeugte, lieferte der HinfI-Verdau (rechte Seite) für den Klon Ap1-50 ein anderes Muster als für die drei weiteren Klone. Kombiniert man nun die Restriktionsmuster beider Analysen, so müssen die 4 genannten Klone in zwei verschiedene phylogenetische Gruppen eingeteilt werden, da sie zwei unterschiedliche Kombinations-Muster aufwiesen. Während hier das Enzym HinfI die Sensitivität der Methode steigerte, konnte in anderem Fall das Enzym HhaI die Unterscheidung verbessern. Folglich ergänzten sich die Muster der zwei Restriktionsenzyme. Die spätere DNA-Analyse ergab nun für beide oben genannten

Tabelle 16: Beispielhafte Auswertung der ARDRA-Analyse aus Abbildung 24.

ARDRA-Gruppe	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	Hinfi		
Ap1-GG	G	G	3	Ap1-48, Ap1-49, Ap1-51
Ap1-GY	G	Y	1	Ap1-50
Ap1-IH	I	H	2	Ap1-46, Ap1-47

Gruppen das Ergebnis *Aminobacterium colombiense*, so dass in diesem Fall eine Stammunterscheidung vorgelegen hatte. Die Methode war hier also sensitiver als notwendig gewesen. Dieser Fall war häufig eingetreten. Um die Auswertung der ARDRA-Analysen effizient durchführen zu können, wurde jedem Restriktionsmuster einer Klonierung ein Buchstabe zugeordnet (siehe Abbildung 24). So erhielt jeder Klon, seinem HhaI/Hinfi-Kombinationsmuster entsprechend, einen Code aus zwei Buchstaben, beispielsweise GY (siehe ARDRA-Gruppe Ap1-GY in Tabelle 16). Der erste Buchstabe der Codierung bezog sich auf das Restriktionsmuster des HhaI-Verdaus und der zweite auf jenes des Hinfi-Verdaus. Identischen Restriktionsmustern eines Verdaus wurde immer derselbe Buchstabe zugeordnet. Auf diese Weise erhielten alle Klone mit denselben HhaI/Hinfi-Kombinationsmustern denselben Code, welcher die Zugehörigkeit zu ein und derselben ARDRA-Gruppe anzeigte. Tabelle 16 zeigt beispielhaft die Auswertung der ARDRA-Analyse aus Abbildung 24. Auf diese Weise wurden alle molekularen Klone der 12 Proben aus Tabelle 15 (S. 71) mittels ARDRA-Analyse in ARDRA-Gruppen eingeteilt, von denen jeweils ein Vertreter sequenziert wurde. Die entsprechenden ARDRA-Gelbilder der HhaI- und Hinfi-verdauten 16S rDNA-Klone sind im Anhang abgebildet (Abbildungen 41 bis 64 ab S. 146). Die Auffistung der ARDRA-Gruppen mit den zugehörigen Klonen sind ebenfalls im Anhang zu finden (Tabellen 29 bis 40, ab S. 172). Vereinzelt wurden Klone ohne vorhergehende ARDRA-Analyse direkt sequenziert. Direkt sequenzierte Klone sind in den genannten Tabellen anstelle mit einem Zweibuchstabencode mit dem Zusatz -direkt gesondert gekennzeichnet (z.B. Ap2-direkt, Tabelle 30, Anhang S. 174). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Restriktionsmuster der 12 analysierten Proben (Ap1 bis Ap3, G1 bis G3, N1 bis N3 und Wp1 bis Wp3) unabhängig voneinander ausgewertet wurden. Die ARDRA-Gruppen der Wp1-Klonierung standen folglich in keinem Zusammenhang mit den ARDRA-Gruppen der Wp2- oder der Wp3-Klonierung (Ausnahmen bei den ARDRA-Analysen der Proben Ap3 und N3, siehe Tabellen 31 und 37). Auf diese Weise mussten zwar deutlich mehr Klone

sequenziert werden, jedoch erhöhte sich die Integrität der Ergebnisse entscheidend, da die Restriktionsmuster eine hohe Variabilität aufwiesen.

Sequenz-Gruppe M (minus) und Gruppe P (plus) Wie soeben beschrieben wurde aus jeder ARDRA-Gruppe der 12 Proben aus Tabelle 15 ein Vertreter sequenziert. Dazu kamen 39 direkt sequenzierte Klone ohne vorausgegangene Eingruppierung via Restriktionsanalyse. Nach Aussortieren nicht verwertbarer Sequenzen, stellten 260 verbliebene Sequenzen nun die Rohdaten der Analyse dar.

Die 16S rDNA konnte während der molekularen Klonierung sowohl vorwärts, als auch rückwärts in den Vektor ligiert werden. Daher lieferten die Sequenzierungen, welche jeweils mit dem T3-Primer aus der Vektorsequenz in die Gensequenz erfolgten, teilweise den Anfangsbereich und teilweise den Endbereich des Gens. Dies führte dazu, dass sich die Sequenzen in zwei Gruppen spalteten, eine Gruppe mit solchen Sequenzen, welche den vorderen Teil des 16S rRNA-Gens repräsentierten (Gruppe P, plus) und eine Gruppe mit den Gen-Abschnitten des hinteren Teils (Gruppe M, minus). Abbildung 25 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

Um herauszufinden, welche 16S rDNA Klone in welche Gruppe fielen, wurde aus den 260 Sequenzen mittels ClustalW2 (erreichbar über <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, Stand 28.07.2015) ein phylogenetischer Baum konstruiert, der eine eindeutige Aufteilung der Daten in die zwei genannten Gruppen durchführte. In Abbildung 26 ist beispielhaft ein phylogenetischer Stammbaum dargestellt, der lediglich aus den Sequenzen konstruiert wurde, deren nächster Verwandter *Aminobacterium colombiense* war. Die Sequenzdaten wurden hier um zwei weitere Sequenzen erweitert, welche jeweils als Außengruppe der zwei Gruppen fungieren sollten. Hierbei handelte es sich um die Sequenz von *Methanosarcina mazei* (GenBank: JQ268008.1), einmal original und einmal revers und komplementär übersetzt. Graphisch ist eine eindeutige Aufteilung der Sequenzen in die zwei genannten Gruppen erkennbar. Solche Sequenzen, welche den vorderen Teil des 16S rRNA-Gens abdeckten, clusterten mit der originalen Sequenz von *Methanosarcina mazei* (Gruppe P, 12 Sequenzen). Der Rest gruppierte sich mit der revers und komplementär übersetzten Sequenz von *Ms. mazei* (Gruppe M, 10 Sequenzen). Auf diese Weise konnte die Zugehörigkeit aller 16S rDNA-Klone zu den zwei Gruppen vorgenommen werden. Tabelle 49 (Anhang S. 201) listet die Sequenz-Informationen aller molekularen Klone (ohne chimäre Klone, s. u.) auf, darunter auch die jeweilige Orientierung.

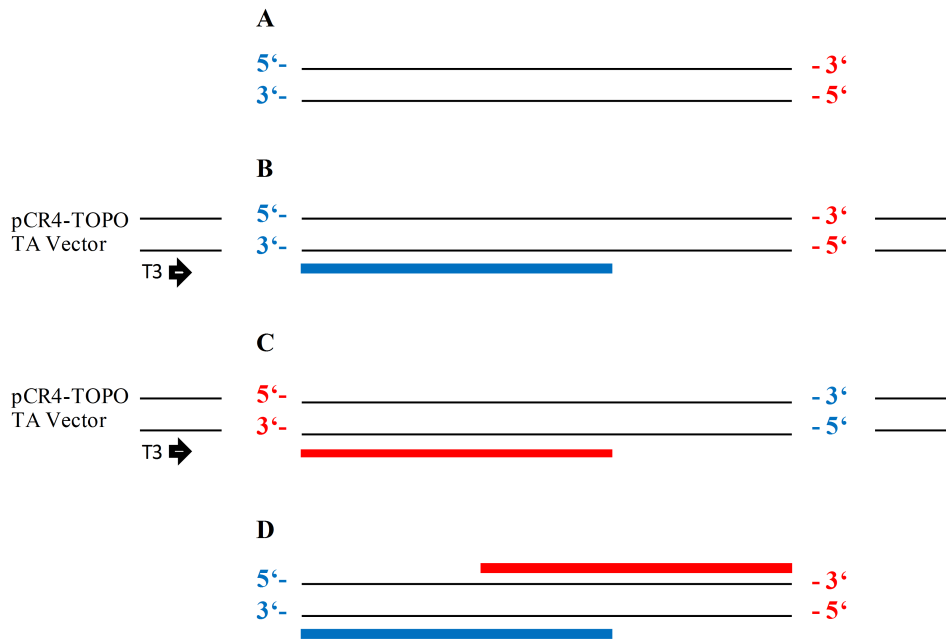


Abbildung 25: **Aufspaltung der Sequenzen in die Gruppen P und M.**

A: 16S rRNA-Gen, **B:** Sequenzierung des vorwärts im Vektor eingebauten 16S rRNA Gens (Gruppe-P-Sequenzen), **C:** Sequenzierung des rückwärts im Vektor eingebauten 16S rRNA Gens (Gruppe-M-Sequenzen), **D:** Die sequenzierten Genfragmente vorwärts und rückwärts klonierter 16S rDNA-Amplifikate decken unterschiedliche Bereiche des 16S-Gens ab. **Blauer Balken:** Sequenzierungsprodukt vorwärts ligierter Amplifikate (Gruppe P), **roter Balken:** Sequenzierungsprodukt rückwärts ligierter Amplifikate (Gruppe M), T3: Primer der Sequenzierung.

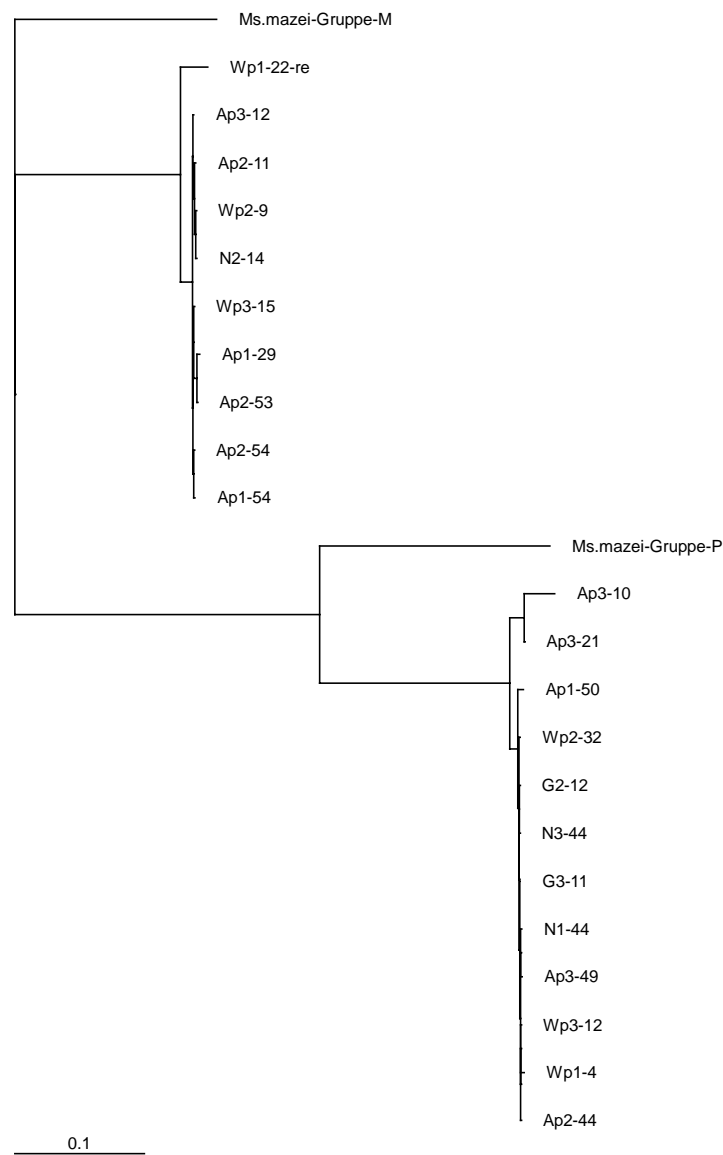


Abbildung 26: **Bildung der Sequenz-Gruppen P und M.**

Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit jenen 16S rDNA-Sequenzen, welche als nächsten Verwandten *Aminobacterium colombiense* aufwiesen (Neighbour Joining ohne Distance Corrections). Es ist erkennbar, dass einige Sequenzen mit der Originalsequenz der 16S rDNA von *Methanosarcina mazei* (Ms.mazei-Gruppe-P, gb|JQ268008.1) clustern und einige mit der revers und komplementär übersetzten Sequenz von *Ms. mazei* (Ms.mazei-Gruppe-M: gb|JQ268008.1).

Chimäre Sequenzen der Sequenz-Gruppe P Chimäre Sequenzen entstehen wenn PCR-Produkte während eines PCR-Zyklus nicht zu Ende sequenziert werden und sich im folgenden Zyklus an einen homologen DNA-Abschnitt anlagern und dort fälschlicherweise als Primer fungieren (Haas et al., 2011). So können phylogenetisch wertlose PCR-Produkte entstehen, welche beispielsweise zu 80 % aus einer Sequenz A und zu 20 % aus einer anderen Sequenz B bestehen.

Zunächst wurden lediglich die chimären Sequenzen innerhalb von Gruppe-P aussortiert. Hierzu wurde der Datensatz mittels *DECIPHER's Find Chimeras analysiert* (siehe Abschnitt 3.9.2, S. 47). Dieses Programm platziert jede Sequenz in seine entsprechende phylogenetische Gruppe und sucht daraufhin nach Sequenzfragmenten innerhalb der Sequenz, welche für diese phylogenetische Gruppe untypisch, für andere phylogenetische Gruppen jedoch bekannt sind. Das Ergebnis der Analyse auf chimäre Sequenzfragmente und deren Identifizierung ist im Anhang unter Tabelle 47 (S. 196) zu finden. Es wurden 12 Chimären der Gruppe P-Sequenzen identifiziert und aus dem Datensatz entfernt (Ap2-23, Ap2-25, G1-40, N1-19, N1-33, N2-19, N2-42, N3-14, N3-18, N3-37, Wp1-48 und Wp2-23).

Sequenz-Gruppe MP Mit dem Ziel den nun von Chimären bereinigten Datensatz der Gruppe P mit jenem der Gruppe M zu vereinigen, wurden die Klone der Gruppe P mit dem T7-Primer resequenziert. Wie Abbildung 27 verdeutlicht, konnte auf diese Weise die Zweiteilung der Sequenzen (vgl. Abbildung 26) aufgehoben und die Vergleichbarkeit der sequenzierten Gen-Fragmente hergestellt werden. Um nun nicht alle verbliebenen 82 Sequenzen (94 Sequenzen weniger 12 aussortierte chimäre Sequenzen) der Gruppe-P resequenzieren zu müssen, wurden diese zunächst mittels *BLASTclust* (siehe Abschnitt 3.9.3, S. 47) gruppiert und folgend aus jedem Cluster nur ein Vertreter mit dem T7-Primer resequenziert. Für die Sequenzidentität wurden 97 % gefordert, was aktuell der Bedingung für die Zugehörigkeit der Sequenzen zur selben Art entspricht (Stackebrandt and Goebel, 1994; Rossello-Mora and Amann, 2001; Doolittle and Papke, 2006). Tabelle 41 (Anhang, S. 185) listet die mittels *BLASTclust* generierten Cluster P1 bis P29 der Gruppe P-Sequenzen auf. Die Auswahl jener Klone, welche zur Repräsentation der Cluster mit dem T7-Primer resequenziert wurden, erfolgte nach dem höchsten MaxScore des jeweiligen NCBI-Datenbankabgleichs (Megablast, 16S ribosomal RNA sequences database). Jene mit dem T7-Primer resequenzierten Klone werden im Folgenden mit dem Anhang -re gekennzeichnet (z.B. Ap1-10-re, siehe Tabelle 49, S. 201). Sie komplettierten den Datensatz der Gruppe M zur Gruppe MP, die nun 194 Sequenzen enthielt (166

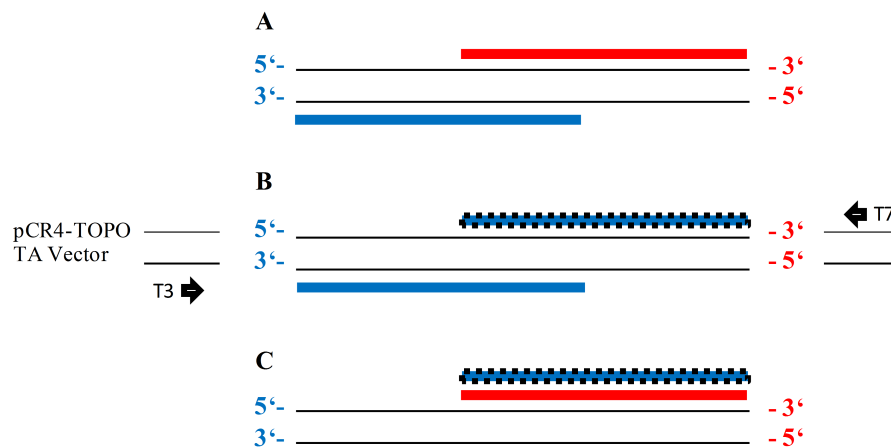


Abbildung 27: **Normung der Sequenzorientierung durch Resequenzierung.**

A: Die sequenzierten Genfragmente vorwärts (blau, Gruppe-P) und rückwärts (rot, Gruppe-M) klonierter 16S rDNA-Amplifikate decken unterschiedliche Bereiche des 16S-Gens ab (vgl. Abbildung 25, S. 76). **B:** Resequenzierung der 16S rDNA-Klone aus Gruppe P mit dem komplementären Primer T7. **C:** Die Resequenzierung führt dazu, dass die Sequenzen der Gruppe-MP alle denselben Bereich des 16S rRNA-Gens abdecken.

Blauer Balken: T3-Primer-Sequenzierungsprodukt vorwärts klonierter Amplifikate (Gruppe P), **blauer Balken-schwarz gepunktet:** T7-Primer-Sequenzierungsprodukt vorwärts klonierter Amplifikate (Gruppe P), **roter Balken:** T3-Primer-Sequenzierungsprodukt rückwärts klonierter Amplifikate (Gruppe M).

Sequenzen der Gruppe M, dazu 28 erfolgreich resequenzierte Gruppe P-Sequenzen). Die Resequenzierungen der Cluster P-15, P-20 und P-22 ergaben keine analysierbaren Sequenzen und blieben damit in der weiteren Analyse unberücksichtigt.

Chimäre Sequenzen der Sequenz-Gruppe MP Wie bereits mit dem Datensatz der Gruppe P durchgeführt, wurde der Datensatz der Gruppe MP (zunächst 194 Sequenzen) auf chimäre Sequenzen hin überprüft. Hierzu wurde wiederum das Online Tool *DECIPHER'S Find Chimera* angewendet. Das Ergebnis der Analyse auf chimäre Sequenzfragment und deren Identifizierung ist im Anhang unter Tabelle 48 (S. 198) zu finden. Es wurden 30 Chmimären detektiert (Ap1-7, Ap2-20, Ap2-31-re, Ap2-36-re, Ap2-8, Ap3-9, G1-42, G1-46, G2-30, G2-35, G2-49, G3-13, G3-17, G3-2, G3-28, G3-44-re, G3-45, G3-8, N1-13, N1-52, N1-60, N2-56, N2-6-re, N3-2, Wp1-27, Wp1-33, Wp1-42-re, Wp1-51, Wp1-55, Wp3-29), welche aus dem Datensatz entfernt wurden. Insofern standen 164 Sequenzen für die folgend erläuterte *BLASTclust*-Analyse der Gruppe MP-Sequenzen zur Verfügung.

Sequenz-Cluster innerhalb der Sequenz-Gruppe MP Die Sequenzen der Gruppe MP sollten nun nach ihrer phylogenetischen Übereinkunft gruppiert werden. Dies wurde wiederum mittels *BLASTclust* durchgeführt (s. o.). Es wurden 48 Cluster gebildet. Tabelle 42 (Anhang, S.186) listet die mittels *BLASTclust* generierten Cluster MP-1 bis MP-48 der Gruppe MP-Sequenzen und die jeweils zugehörigen Klone auf. Die nächsten Verwandten dieser Cluster sind in Tabelle 17 aufgeführt. Diese wurden mittels NCBI-Datenbankabgleich (Megablast, 16S ribosomal RNA sequences database) ermittelt. Bei betrachten dieser Tabelle fiel auf, dass die Mehrzahl der Cluster hinsichtlich der Anzahl sequenzierter Klone unterrepräsentiert war. Während die ersten 13 Cluster 120 sequenzierte Klone der Gruppe MP beinhalteten, entfielen auf die weiteren 35 Cluster gerade einmal 44. Offensichtlich waren die ersten 13 Cluster in der Analyse besonders stark vertreten gewesen.

Einige Cluster wiesen denselben nächsten Verwandten auf. So wurde beispielsweise *Tepidanaerobacter acetatoxydans* neben Cluster MP-3 auch für die Cluster MP-17, MP-21, MP-24 und MP-32 als nächster Verwandter aufgeführt. Auch wenn diese Cluster offensichtlich nahe zueinander verwandt waren, wurden alle diese Cluster gleichwertig behandelt und als eigenständige Arten betrachtet. Ebenso waren beispielsweise *Moorella thermoacetica* oder *Thermacetogenium phaeum* in mehreren Clustern vertreten.

Tabelle 17: Bakterielle Spezies-Cluster MP-1 bis MP-48.

Ident-min/ Ident-max: minimale/ maximale Sequenzidentität zum nächsten Verwandten, MP: Anzahl Sequenzen der Gruppe MP, P: Anzahl der mittels Resequenzierung zugeordneten Sequenzen der Gruppe P.

Cluster	nächster Verwandter (Ident-min/ Ident-max [%])	MP	P
MP-1	<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i> (93/ 94)	2	8
	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (96/ 96)	17	0
	<i>Pelotomaculum schinkii</i> (91/ 94)	3	0
MP-2	<i>Treponema caldaria</i> (87/ 90)	9	4
	<i>Treponema stenostrepta</i> (86/ 90)	8	0
	<i>Treponema zuelzerae</i> (87/ 87)	1	0
MP-3	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> (95/ 100)	18	12
MP-4	<i>Aminobacterium colombiense</i> (97/ 100)	10	12
MP-5	<i>Mesotoga infera</i> (99/ 99)	9	1
MP-6	“ <i>Candidatus</i> Cloacamonas acidaminovorans” (92/ 93)	8	1
MP-7	<i>Defluviitoga tunisiensis</i> (99/ 100)	7	2
MP-8	<i>Syntrophaceticus schinkii</i> (96/ 96)	3	0
	<i>Thermacetogenium phaeum</i> (93/ 94)	3	0
MP-9	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i> (99/ 100)	5	0
MP-10	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> (94/ 95)	5	0
MP-11	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> (98/ 99)	5	8
MP-12	<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i> (94/ 94)	1	0
	<i>Sedimentibacter saalensis</i> (95/ 95)	3	0
MP-13	<i>Caloramator australicus</i> (85/ 86)	0	3
	<i>Moorella thermoacetica</i> (86/ 86)	3	0
MP-14	<i>Saccharofermentans acetigenes</i> (92/ 92)	3	0
MP-15	“ <i>Candidatus</i> Cloacamonas acidaminovorans” (92/ 93)	3	0
MP-16	<i>Ornatilinea apprima</i> (92/ 92)	3	0
MP-17	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> (94/ 94)	2	0
MP-18	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> (86/ 86)	1	0
	<i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i> (86/ 86)	1	0
MP-19	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> (93/ 93)	2	0
MP-20	<i>Christensenella minuta</i> (87/ 87)	1	0
MP-21	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> (94/ 94)	1	0
MP-22	<i>Thermacetogenium phaeum</i> (92/ 92)	1	0
MP-23	<i>Paludibacter propionicigenes</i> (92/ 92)	1	0
MP-24	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> (91/ 91)	1	0
MP-25	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (94/ 94)	1	0
MP-26	<i>Syntrophomonas wolfei</i> (95/ 95)	1	0
MP-27	<i>Ornatilinea apprima</i> (93/ 93)	1	0
MP-28	“ <i>Candidatus</i> Solibacter usitatus” (91/ 91)	1	0
MP-29	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> (89/ 89)	1	0
MP-30	<i>Thermacetogenium phaeum</i> (90/ 90)	1	0
MP-31	<i>Moorella thermoacetica</i> (90/ 90)	1	0
MP-32	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i> (95/ 95)	1	0
MP-33	<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i> (92/ 92)	1	0
MP-34	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> (87/ 87)	1	0
MP-35	<i>Moorella thermoacetica</i> (91/ 91)	1	0
MP-36	<i>Pelotomaculum schinkii</i> (88/ 88)	1	0
MP-37	<i>Sphaerochaeta globosa</i> (99/ 99)	1	0
MP-38	<i>Cloacibacillus porcorum</i> (93/ 93)	1	0
MP-39	<i>Sphaerochaeta pleomorpha</i> (88/ 88)	1	0
MP-40	<i>Anaerobaculum mobile</i> (98/ 98)	1	0
MP-41	<i>Anaerobaculum mobile</i> (91/ 91)	1	0
MP-42	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> (91/ 91)	1	0
MP-43	<i>Anaerolinea thermophila</i> (87/ 87)	1	0
MP-44	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> (88/ 88)	1	0
MP-45	<i>Caldilinea aerophila</i> (85/ 85)	1	0
MP-46	<i>Christensenella minuta</i> (89/ 89)	1	0
MP-47	<i>Desulfovibrio aminophilus</i> (89/ 89)	1	0
MP-48	<i>Sphaerochaeta pleomorpha</i> (85/ 85)	1	0

Spezies-Zusammensetzungen der untersuchten Proben Aus jeder der zwölf zu analysierenden Proben (Tabelle 15, S. 71) war die bakterielle 16S rDNA amplifiziert und kloniert worden. Die Klone waren mittels ARDRA-Analyse in ARDRA-Gruppen eingeteilt worden, aus denen je ein Vertreter sequenziert worden war. Die Sequenzen aller Proben waren einheitlich ausgewertet und in Cluster gruppiert worden, damit die Vergleichbarkeit untereinander gewährleistet war. Um die Auswertung zu komplettieren war es nun notwendig, die in den Proben vorherrschenden Spezies-Zusammensetzungen zu rekonstruieren. Hierzu wurden die jeweiligen ARDRA-Gruppen (siehe Anhang, Tabellen 29-40 ab S. 172) den Sequenz-Clustern aus Tabelle 17 zugeordnet. Dies wurde mit den BLASTclust-Ergebnissen der Gruppe P- und Gruppe MP-Sequenzen (siehe Anhang, Tabellen 41 und 42, ab S. 185) durchgeführt. Die Ergebnisse der Zuordnungen in Tabellenform sind dem Anhang (Tabelle 43, ab S. 188) zu entnehmen. Die graphische Auswertung folgt in den Abschnitten 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5 und 4.4.6 ab S. 85. Dabei konnte es sich nur um eine modellhafte Rekonstruktion der wirklichen Diversität handeln, da sowohl die DNA-Isolierung, wenn auch mit mechanischer Lyse durchgeführt, als auch die 16S rDNA-PCR zu einer Verschiebung der Verhältnisse *in vivo* führen. Insofern war kein quantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Clustern möglich. Die relativen Anteile ein und desselben Clusters zu den verschiedenen Zeitpunkten t-1, t-2 und t-3 konnten jedoch untereinander verglichen, da für diese im Rahmen der DNA-Isolierung, wie auch für die PCR jeweils dieselben Bedingungen vorgelegen hatten. Stieg der relative Anteil eines Clusters mit fortschreitender Kultivierung, so konnte davon ausgegangen werden, dass die Bedeutung der jeweiligen Spezies mit der Zeit zugenommen hatte. Die Ursache hierfür konnte entweder in der Verringerung der absoluten Anteile anderer Arten oder in der Zunahme der absoluten Anteile der betreffenden Art liegen. Darüber hinaus ermöglichten die Ergebnisse einen qualitativen Einblick in die Diversität der Kulturen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Archaeelle Sequenz-Cluster Methanogene Archaea spielen eine wichtige Rolle bei der Propionat-Verwertung. Sie verwenden den anfallenden Wasserstoff im Zuge der Methan-Bildung und halten auf diese Weise den Wasserstoff-Partialdruck ausreichend niedrig, so dass die für sich genommen endergone Oxidation der Propionsäure zu einer energieliefernden exergonen Reaktion wird (Abschnitt 2.5, S. 21). Um festzustellen, welche methanogenen Archaea während der Propionat-Verwertung dominierten, wurde ihre Diversität zum Zeitpunkt t-2 (siehe Abbildung 23, S. 70) untersucht. Da es sich hier um eine indirekte Ermittlung der Diversität mittels molekularer Klonierung

handelte, konnten die hier ermittelten Verhältnisse der Arten von den in vivo vorherrschenden Verhältnissen abweichen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die im Zuge der DNA-Isolierung durchgeführte Zellyse mechanisch unter heftigem vortexen in Gegenwart von Glaskügelchen durchgeführt wurde, deren Wirksamkeit für unterschiedliche methanogene Gruppen bereits erprobt wurde (Stantscheff, 2013). Ebenso wie für die Bakterien beschrieben (siehe oben), wurde aus der isolierten genomischen DNA die 16S rDNA amplifiziert (Primer Met86/ Met1530) und kloniert (siehe Abschnitt 3.8.4, S. 45). Die 16S rDNA Klone wurden mittels ARDRA-Analyse in Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 50, Anhang S. 208), aus denen je ein Vertreter sequenziert wurde. Die Gel-Bilder der BsuRI-/ SmaI+XhoI-verdauten Klone sind im Anhang ab Seite 170 zu finden. Die Bezeichnung der archaeellen Klone war der bakterieller Klone analog, mit dem Unterschied, dass den archaeellen Klonen ein -ar angefügt wurde (z.B. N2-1-ar). Die Sequenzierungs-Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: **Verwandschaft der archaeellen 16S rDNA-Amplifikate.**

Nt: Nukleotide, Coverage: Sequenzabdeckung, Ident: Sequenzidentität.

Klon	nächster Verwandter	Länge [Nt]	Coverage [%]	Ident [%]
N2-1-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	962	99	99
N2-2-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	1041	100	99
N2-3-ar	<i>Methanobacterium petrolearium</i>	953	99	98
N2-4-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	1061	100	93
N2-5-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	1040	100	99
G2-1-ar	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i> ^a	1017	95	86
G2-10-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1022	100	80
G2-11-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1019	99	99
G2-2-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1052	99	97
G2-3-ar	<i>Treponema caldaria</i> ^a	1027	99	88
G2-4-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1024	100	80
G2-5-ar	<i>Treponema caldaria</i> ^a	1091	99	89
G2-6-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1055	99	97
G2-7-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1070	99	99
G2-8-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	947	99	98
Wp2-2-ar	<i>Methanosarcina horonobensis</i>	1070	100	94
Wp2-3-ar	<i>Methanosarcina vacuolata</i>	1049	99	99
Wp2-7-ar	<i>Methanosarcina thermophila</i>	1026	99	99
Ap2-1-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1001	99	96
Ap2-11-ar	<i>Methanosaeta concilii</i>	1051	100	100
Ap2-2-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1053	99	99
Ap2-4-ar	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	1057	100	99
Ap2-5-ar	<i>Treponema caldaria</i> ^a	1086	99	90
Ap2-8-ar	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	1028	99	99

^a bakterieller nächster Verwandter

Das Primerpaar Met86/ Met1530, welches bereits mehrfach erfolgreich zur universellen Amplifikation methanogener 16S rDNA Sequenzen eingesetzt worden war (Stantscheff, 2013), hatte hier offensichtlich vereinzelt auch bakterielle Gene amplifiziert. So fielen vier der 24 sequenzierten Klone in das Reich der Bakteria (G2-1-ar,

G2-3-ar, G2-5-ar, Ap2-5-ar).

4.4.3 Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur Ap1a

Bakterielle Diversität Die Zuordnung der ARDRA-Gruppen, zu den MP-Clustern aus Tabelle 17 ist im Anhang unter Tabelle 43 (S. 188) aufgelistet. Mit Hilfe dieser Tabelle konnten die Spezies-Zusammensetzungen der drei Proben rekonstruiert werden. Wie bereits in Abschnitt 4.4.2 (S. 80) erklärt, lag der Fokus neben der qualitativen Bestimmung der Diversität auf der Veränderung der Anteile isoliert betrachteter Cluster mit der Zeit. Die Frage war, nimmt der Anteil eines Clusters von t-1 (14 Tage) über t-2 (39 Tage) nach t-3 (56 Tage) zu oder ab und korreliert somit negativ oder positiv mit der Propionat-Verwertung.

Tabelle 19 listet alle in der Kultur Ap1a gefundenen Cluster auf. Dabei wurde zwischen Haupt- und Nebenclustern unterschieden. Um als Hauptcluster eingestuft zu werden, sollte ein Cluster in jeder der drei analysierten Proben Ap1, Ap2 und Ap3 vorkommen oder in wenigstens einer der drei analysierten Proben mit einem Anteil von mindestens 8 % (z.B. 4 Klone aus 50, im Folgenden auch als 8 %-Kriterium bezeichnet) vertreten sein. Als Nebencluster wurden jene Cluster eingestuft, welche diese Bedingungen nicht erfüllten.

Die Propionat-verwertende Anreicherungskultur Ap1a wies 6 Hauptcluster auf. Dies waren die Cluster MP-2, MP-3, MP-4, MP-5, MP-6 und MP-9. Wie der Tabelle 17 zu entnehmen ist, handelte es sich somit um die folgenden Arten

- *Treponema* sp. (MP-2, 91-96 % Ident),
- *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (MP-3, 95-100 % Ident),
- *Aminobacterium colombiense* (MP-4, 97-100 % Ident),
- *Mesotoga infera* (MP-5, 99 % Ident),
- “*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*” (MP-6, 92-93 % Ident) und
- *Syntrophobacter sulfatireducens* (MP-9, 99-100 % Ident).

Abbildung 28 gibt einen graphischen Überblick über die sukzessive Diversität der Proben Ap1, Ap2 und Ap3 in Kombination mit der in den Proben vorherrschenden Propionat-Konzentration. Hier wurden nur jene Hauptcluster berücksichtigt, welche das 8 %-Kriterium erfüllten (MP-2, MP-3, MP-4 und MP-9). Das obere Diagramm stellt die Daten in diskreter Form dar. Die Säulen geben den Anteil der Klone eines

Tabelle 19: **Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur Ap1a.**

Fettdruck: Spezies-Clusters, welche in jeder der drei Proben Ap1, Ap2 und Ap3 oder in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von > 8 % vorkamen (= Hauptcluster).

Species-		Anzahl 16S rDNA-Klone		
Cluster ^a	Nächster Verwandter	Ap1 ^b	Ap2 ^b	Ap3 ^b
MP-2	<i>Treponema</i> sp.	11	14	2
MP-3	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	15	7	2
MP-4	<i>Aminobacterium colombiense</i>	24	6	20
MP-5	<i>Mesotoga infera</i>	1	1	3
MP-6	“<i>Candidatus Cloacamonas</i> sp.”	2	3	2
MP-8	<i>Syntrophaceticus</i> sp./ <i>Thermacetogenium</i> sp.	0	1	0
MP-9	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>	0	15	16
MP-10	<i>Proteiniphilum</i> sp.	0	0	2
MP-18	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	0	1	1
MP-21	<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	1	0	0
MP-26	<i>Syntrophomonas</i> sp.	0	1	0
MP-27	<i>Ornatilinea</i> sp.	0	0	1
MP-28	“ <i>Candidatus Solibacter</i> sp.”	0	0	1
MP-32	<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	1	0	0
MP-42	<i>Prolixibacter</i> sp.	0	1	0
MP-44	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	2	0	0
MP-45	<i>Caldilinea</i> sp.	0	0	1
MP-46	<i>Christensenella</i> sp.	0	2	1

^avgl. Abbildung 17, S. 81

^bProben nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Tabelle 15, S. 71)

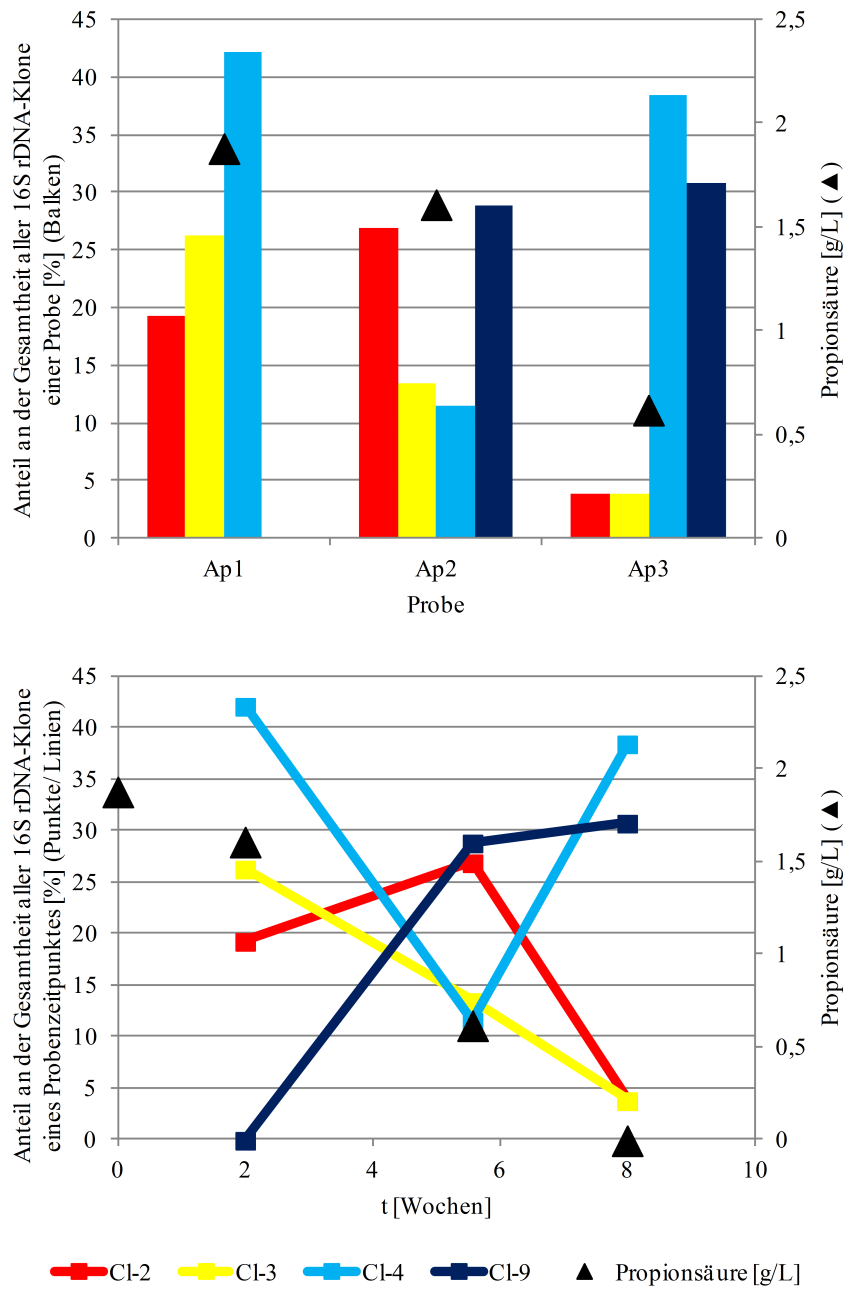


Abbildung 28: **Sukzessive Diversität während der Propionat-Verwertung.** Dargestellt sind jene Spezies-Cluster (Cl-2, Cl-3, Cl-4, Cl-9) der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur Ap1a, welche in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von > 8 % vorkamen (vgl. Tabelle 19, S. 86). **Oben:** diskrete Ergebnis-Darstellung der Proben Ap1, Ap2 und Ap3, **unten:** Darstellung der oben gezeigten Werte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Clusters an der Gesamtheit auswertbarer Klone zu den Zeitpunkten t-1, t-2 und t-3 an. Die Propionat-Konzentration zu den gegebenen Zeitpunkten ist punktförmig eingetragen. Um die tendenzielle Zu- oder Abnahme der Anteile eines Clusters hervorzuheben, wurden dieselben Daten in ein Liniendiagramm überführt (unteres Diagramm).

Die größte prozentuale Zunahme des Anteils an der Gesamtheit der Klone während der Propionat-Verwertung erfuhr Cluster MP-9, *Syntrophobacter sulfatireducens*. Während zum Zeitpunkt t-1 noch kein Klon diesem Cluster zugeordnet werden konnte, betrug der Anteil zum Zeitpunkt t-2 knapp 29 % und erhöhte sich in Richtung t-3 nochmals auf knapp 31 %. Folglich stieg die Bedeutung von MP-9 während der Propionat-Verwertung. Bei der Art *Syntrophobacter sulfatireducens* handelt es sich um einen literaturbekannten Propionat-Verwerter (Chen et al., 2005). Vermutlich wurde hier die Propionat-verwertende Schlüsselspezies der Kultur Ap1a identifiziert, dessen Anteil an der Gesamtheit der Klone erwartungsgemäß mit der Reduzierung der Propionat-Konzentration zunahm. Cluster MP-2 und MP-3 hingegen konnten zum Beginn der Propionat-Verwertung (t-1) deutlich mehr Klone zugeordnet werden als gegen Ende (t-3). So verringerten sich die prozentualen Anteile um 15,5 (MP-2, *Treponema* sp.) und 22,5 % (MP-3, *T. acetoxydans*). Der Anteil von Cluster MP-4 (*A. colombiense*) sank von t-1 auf t-3 nur geringfügig (3,6 %), jedoch wurde zum Zeitpunkt (t-2) eine verhältnismäßig starke Abnahme des Anteils registriert. Vereinzelt tauchten weitere Cluster auf (siehe Tabelle 19). Diese als Nebencluster bezeichneten Cluster wurden weder an allen drei untersuchten Zeitpunkten detektiert, noch erfüllten sie zu einem Zeitpunkt das 8 %-Kriterium. Die mögliche Bedeutung der in Kultur Ap1a gefundenen Cluster für die Propionat-Verwertung wird unter Abschnitt 5 ab Seite 108 diskutiert.

Archaeelle Diversität Die Propionat-verwertende Anreicherungskultur Ap1a wurde neben Bakterien auch auf Archaea hin analysiert, da diese im Rahmen der Propionat-Verwertung die Rolle der Wasserstoff-Entfernung übernehmen (siehe Abschnitt 2.5, S. 21). Es wurde eine Stichprobe zum Zeitpunkt t-2 (39 Tage Kultivierung) untersucht. Dazu wurde die archaeelle 16S rDNA amplifiziert und kloniert (siehe Abschnitt 4.4.2, S. 72). Es wurden 12 Klone gepickt, deren kloniertes Sequenzfragment amplifiziert, ARDRA-analysiert, sequenziert und mit der NCBI Datenbank überprüft. Die Ergebnisse sind der Tabelle 50 (siehe Anhang S. 208) zu entnehmen. Abbildung 29 gibt einen graphischen Überblick über die archaeelle Zusammensetzung der Probe Ap2. 5 Klone wurden der Gattung *Methanoculleus* zugeordnet. Ihr nächster

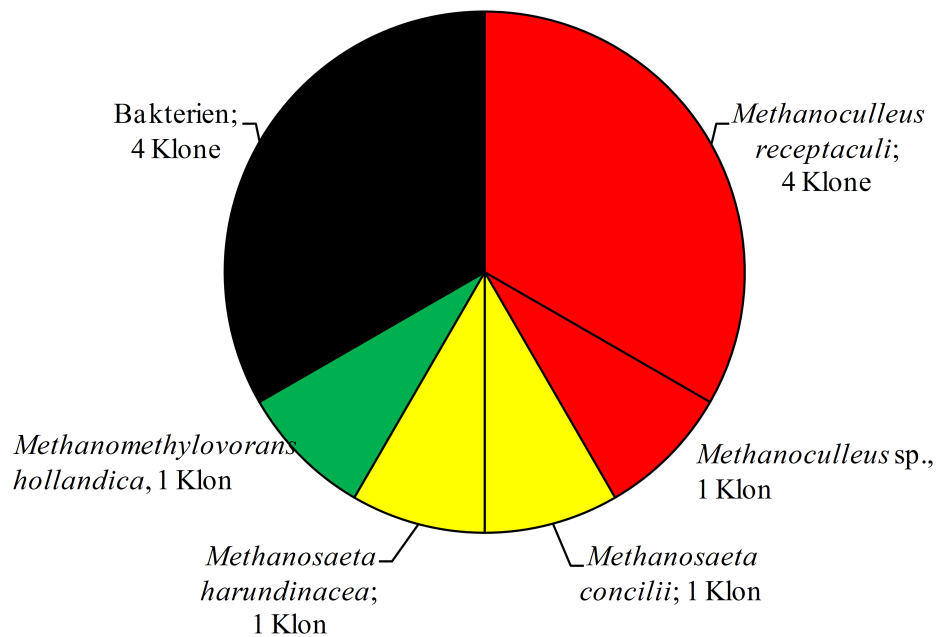


Abbildung 29: **Archaeelle Diversität der Probe Ap2.**

Angegeben sind die nächsten Verwandten und die Anzahl der jeweiligen 16S rDNA-Klone.

Verwandter war *Methanoculleus receptaculi*. Da die Sequenz von Klon Ap2-1-ar nur eine Sequenzidentität von 96 % aufwies und damit unterhalb der Artgrenze von 97 % lag, wurde dieser Klon als *Methanoculleus sp.* aufgeführt. 2 Klone ließen sich den *Methanosaeta* (*M. concilii* und *M. harundinacea*) zuordnen und auf die Art *Methanomethylovorans hollandica* kam ein Klon. Die 8 archaeellen Klone wiesen somit verschiedene Spezies aus drei unterschiedlichen Gattungen auf. Diese gehörten den Ordnungen der Methanomicrobiales und Methanosarcinales an. 4 Klone mussten dem Reich der Bakteria zugeordnet werden, da das Primerpaar Met86/ Met1530 offensichtlich nicht spezifisch genug gewesen war, um nur archaeelle 16S rDNA Sequenzen zu amplifizieren.

4.4.4 Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur G12

Bakterielle Diversität Die ermittelten ARDRA-Gruppen der Proben G1, G2 und G3 (siehe Anhang, Tabellen 32, 33 und 34 ab S. 176) wurden den Clustern aus Tabelle 17 (S. 81) zugeordnet. Die Zuordnung ist unter Tabelle 44 zu finden. Mit dieser konnten die Anteile der Cluster in den verschiedenen Proben der Kultur G12 ermittelt werden.

Tabelle 20: **Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur G12.**

Fettdruck: Spezies-Clusters, welche in jeder der drei Proben G1, G2 und G3 oder in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von > 8 % vorkamen (= Hauptcluster).

Spezies-Cluster ^a	Nächster Verwandter	Anzahl 16S rDNA-Klone		
		G1 ^b	G2 ^b	G3 ^b
MP-1	<i>Cryptanaerobacter</i> sp./ <i>Pelotomaculum</i> sp.	0	0	1
MP-2	<i>Treponema</i> sp.	14	15	6
MP-3	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	32	19	5
MP-4	<i>Aminobacterium colombiense</i>	0	1	2
MP-5	<i>Mesotoga infera</i>	1	2	2
MP-7	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	0	3	2
MP-10	<i>Proteiniphilum</i> sp.	0	2	0
MP-11	<i>Desulfovibrio aminophilus</i>	4	8	24
MP-13	<i>Caloramator</i> sp./ <i>Moorella</i> sp.	0	1	1
MP-14	<i>Saccharofermentans</i> sp.	0	1	1
MP-15	“ <i>Candidatus</i> Cloacamonas sp.”	1	0	0
MP-23	<i>Paludibacter</i> sp.	1	0	0
MP-24	<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	0	1	0
MP-29	<i>Paenibacillus</i> sp.	0	1	0
MP-31	<i>Moorella</i> sp.	0	1	0
MP-34	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	0	0	1
MP-43	<i>Anaerolinea</i> sp.	0	0	1

^avgl. Abbildung 17, S. 81

^bProben nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Tabelle 15, S. 71)

Tabelle 20 listet alle in der Kultur G12 gefundenen Cluster auf. Es wurde wieder zwischen Haupt- und Nebenclustern unterschieden. Um als Hauptcluster eingestuft zu werden, sollte ein Cluster in jeder der drei analysierten Proben G1, G2 und G3 vorkommen oder in wenigstens einer der drei analysierten Proben mit einem Anteil von mindestens 8 % (z.B. 4 Klone aus 50) vertreten sein. Als Nebencluster wurden jene Cluster eingestuft, welche diese Bedingungen nicht erfüllten. Kultur G12 wies 4 Hauptcluster auf. Dazu zählten die Cluster MP-2, MP-3, MP5 und MP-11. Es handelte sich somit um die folgenden Arten

- *Treponema* sp. (MP-2, 91-96 % Ident),
- *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (MP-3, 95-100 % Ident),
- *Mesotoga infera* (MP-5, 99 % Ident) und

- *Desulfovibrio aminophilus* (MP-11, 98-99 % Ident).

Abbildung 30 gibt einen Überblick über die Diversität der Proben G1, G2 und G3 in Kombination mit der in den Proben vorherrschenden Propionat-Konzentration. Es wurden hier wieder nur jene Hauptcluster berücksichtigt, die in wenigstens einer der drei Proben mit mindestens 8 % der analysierten Klone vertreten waren. Das obere Diagramm stellt die Daten in diskreter Form dar. Die Säulen geben den Anteil der Klone eines Clusters an der Gesamtheit auswertbarer Klone zu den Zeitpunkten t-1, t-2 und t-3 an. Die Propionat-Konzentration zu den gegebenen Zeitpunkten ist punktförmig eingetragen. Um die tendenzielle Zu- oder Abnahme der Bedeutung eines Cluster hervorzuheben wurden dieselben Daten in ein Liniendiagramm überführt (unteres Diagramm). Während die Anteile der Cluster MP-2 und MP-3 im Verlauf des Untersuchungszeitraumes abnahmen, legte der Anteil von Cluster MP-11 (*Desulfovibrio aminophilus*) zu. Da sich der Propionat-Gehalt der Proben G1, G2 und G3 kaum unterschied, war diese Zunahme nicht auf die Verwertung von Propionat zurückzuführen. Da das Nährmedium modellhaft die Situation einer Biogasanlage unter prozessbelastend erhöhter Propionat-Konzentration simulieren sollte, waren dem Medium 10 % Reaktorfiltrat zugesetzt worden, in dem alternative Substrate unbekannter Zusammensetzung vorgelegen hatten. Offensichtlich gelang es *D.aminophilus* sich auf Basis anderer Medieninhaltsstoffe zu vermehren.

Cluster MP-2 (*Treponema* sp.) und MP-3 (*Tepidanaerobacter acetatoxydans*) waren bereits in Kultur Ap1a detektiert worden (Abbildung 28, S. 87) und hatten dort denselben Trend der Abnahme des Anteils der Klone gezeigt. Alle drei genannten Cluster waren in jeder der drei Proben G1, G2 und G3 detektiert worden. Dies traf ansonsten nur auf Cluster MP-5 zu, welches der Spezies *Mesotoga infera* (99 % Ident) entsprach. *M. infera* war auch in Kultur Ap1a mit geringem Anteil in jeder Probe detektiert worden. Cluster MP-6 ("*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*", 92-93 % Ident), das in Kultur Ap1a ebenfalls zu jedem Zeitpunkt detektiert wurde fehlte in den Analysen zur Kultur G12 komplett. Vereinzelt tauchten weitere Nebenclustern auf (Tabelle 20). Diese wurden jedoch nur durch ein bis drei Klone repräsentiert und maximal an zwei der drei untersuchten Zeitpunkte detektiert. Interessanterweise tauchte in Probe t-3 (nach 56 Tagen) ein Klon des Clusters MP-1 auf, das mit *Pelotomaculum schinkii* einen literaturbekannten Propionat-Verwerter (de Bok et al., 2005) als nächsten Verwandten einschloss. Möglicherweise setzte die Propionat-Verwertung der Kultur G12 erst zwischen Zeitpunkt t-2 (2,0 g/L Pr) und t-3 (1,8 g/L Pr) ein und fand überwiegend nach dem 8 wöchigen Untersuchungszeitraum statt.

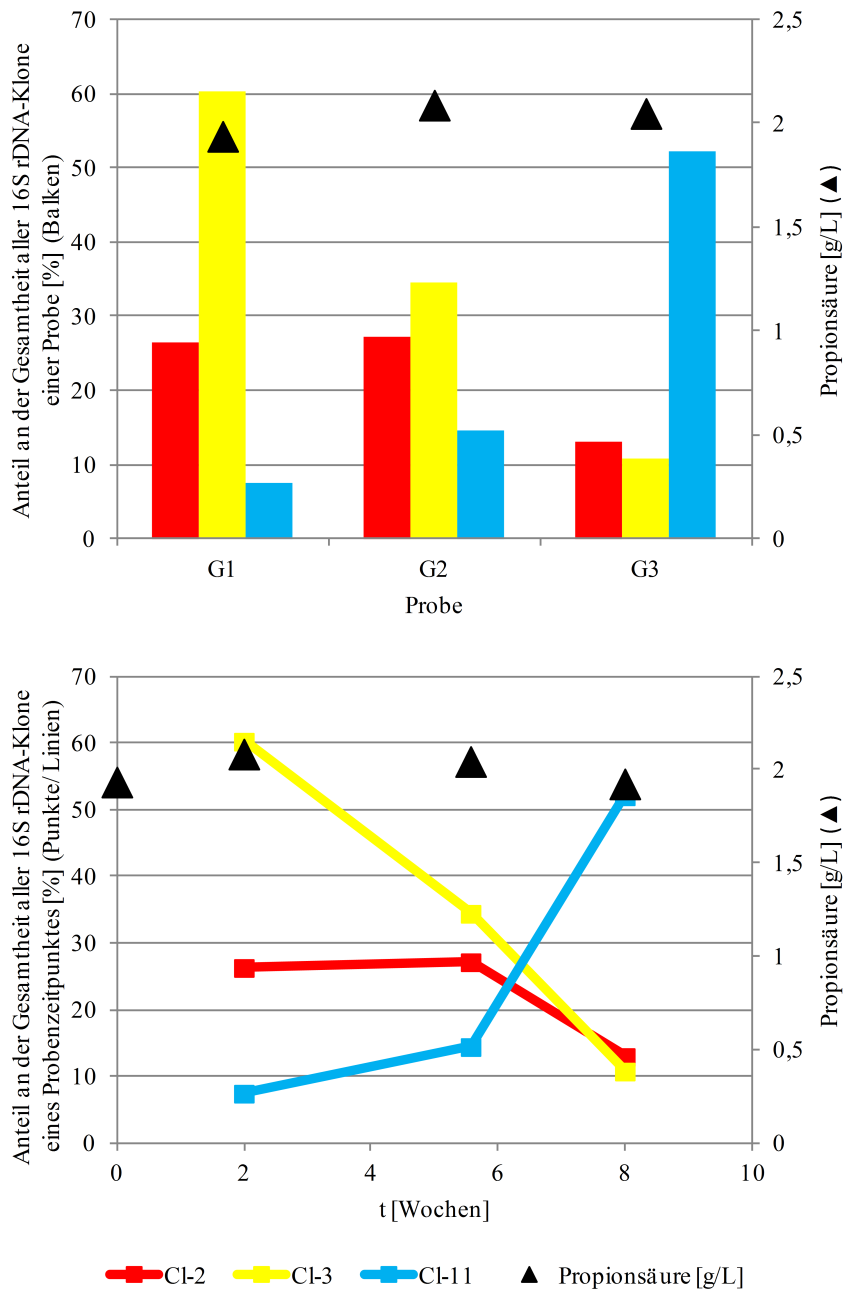


Abbildung 30: **Sukzessive Diversität während der Propionat-Verwertung.** Dargestellt sind jene Spezies-Cluster (Cl-2, Cl-3, Cl-11) der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur G12, welche in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von > 8 % vorkamen (vgl. Tabelle 20, S. 90). **Oben:** diskrete Ergebnis-Darstellung der Proben G1, G2 und G3, **unten:** Darstellung der oben gezeigten Werte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

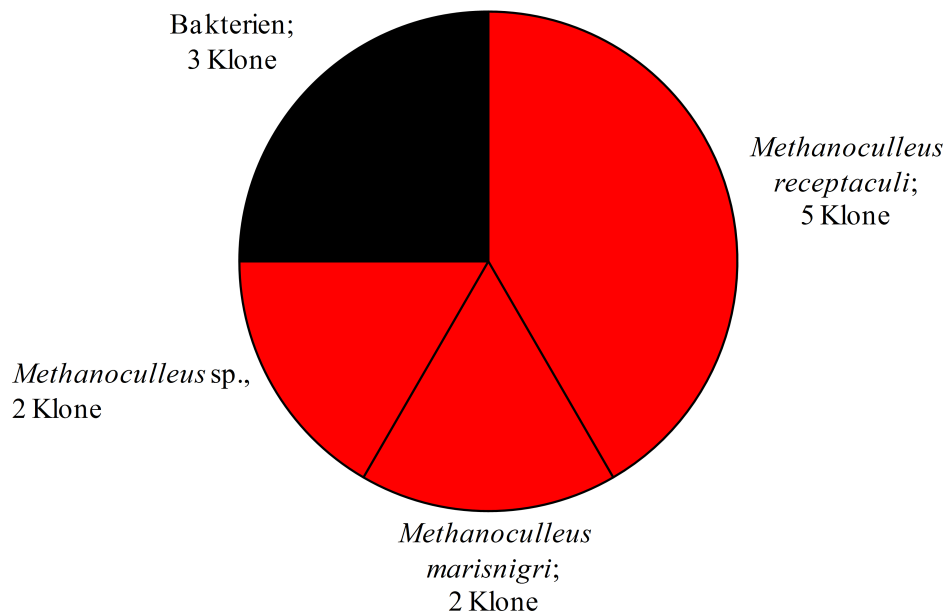


Abbildung 31: **Archaeelle Diversität der Probe G2.**

Angegeben sind die nächsten Verwandten und die Anzahl der jeweiligen 16S rDNA-Klone.

Diese Vermutung lässt sich jedoch nicht überprüfen und bleibt somit spekulativ. Die mögliche Bedeutung der in Kultur G12 gefundenen Cluster für die Propionat-Verwertung, insbesondere unter Berücksichtigung der fehlgeschlagenen Propionat-Verwertung der Kultur, wird unter Abschnitt 5 diskutiert.

Archaeelle Diversität Die Propionat-verwertende Anreicherungskultur G12 wurde neben Bakterien auch auf Archaea hin analysiert. Es wurde hier wiederum (vgl. Abschnitt 4.4.3, S. 85) eine Stichprobe zum Zeitpunkt t-2 (39 Tage Kultivierung) untersucht. Das Ergebnis des NCBI-Datenbankabgleichs der archaeellen Klone aus Probe G2 ist Tabelle 50 (siehe Anhang, S. 208) zu entnehmen. Abbildung 31 gibt einen graphischen Überblick über ihre Zusammensetzung. Da das Primerpaar Met86/Met1530 zu einem geringen Anteil auch bakterielle DNA-Fragmente amplifiziert hatte, mussten drei der 12 Klone dem Reich der Bakterien zugeordnet werden. Die verbliebenen neun Klone gehörten alle der Gattung *Methanoculleus* an. *M. receptaculi* war durch 5 Klone und *M. marisnigri* durch zwei Klone repräsentiert. 2 weitere Klone wiesen als nächsten Verwandten ebenfalls *M. marisnigri* auf, da deren Sequenzidentität jedoch deutlich unter der Artgrenze von 97 % lag, wurden diese als *Methanoculleus sp.* eingestuft. Im Unterschied zu den Propionat-verwertenden An-

reicherungskulturen, welche die Propionsäure im Versuchszeitraum auch tatsächlich abgebaut hatten (Ap1a, N12 und Wp2a, vgl. Abbildung 23, S. 70), gehörten die archaeellen Klone der Kultur G12 ausnahmslos der Gattung *Methanoculleus* an. Inwiefern diese Beobachtung ein Grund dafür sein konnte, dass die Kultur G12 die Propionsäure im Untersuchungszeitraum nicht abgebaut hatte, wird unter Abschnitt 5 diskutiert.

4.4.5 Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur N12

Bakterielle Diversität Die aus der ARDRA-Analyse hervorgegangenen ARDRA-Gruppen der Klone aus den Proben N1, N2 und N3 wurden wie zuvor den Clustern aus Tabelle 17 zugeordnet. Diese Zuordnung ist im Anhang der Tabelle 45 (S. 191) zu entnehmen. Auf diese Weise wurden die Anteile der Cluster in den verschiedenen Proben der Kultur N12 ermittelt.

Tabelle 21 listet alle Cluster und deren zugehörigen Arten auf, die in den Kulturen N1, N2 und N3 gefunden wurden. Im Vergleich mit den anderen drei Analysen war hier die Anzahl der Hauptcluster (MP-1, MP-2, MP-3, MP-8, MP-11 und MP-12) am höchsten. Es handelte sich hierbei um die entsprechenden Arten

- *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. (MP-1, 93-94/ 91-96 % Ident),
- *Treponema* sp. (MP-2, 91-96 % Ident),
- *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (MP-3, 95-100 % Ident),
- *Aminobacterium colombiense* (MP-4, 97-100 % Ident),
- *Deftuviitoga tunisiensis* (MP-7, 99-100 % Ident),
- *Syntrophaceticus* sp./ *Thermacetogenium* sp. (MP-8, 96/ 93-94 % Ident),
- *Desulfovibrio aminophilus* (MP-11, 98-99 % Ident),
- *Sedimentibacter* sp. (MP-12, 94-95 % Ident) und
- *Caloramator* sp./ *Moorella* sp. (MP-13, 85-86/ 86 % Ident).

Abbildung 32 gibt einen Überblick über die Diversität und die jeweiligen Propionat-Konzentrationen hinsichtlich jener Hauptcluster, welche das 8 %-Kriterium erfüllten. MP-1 war das einzige Cluster, dessen Anteil kontinuierlich zunahm. Unter der Annahme, dass sich der Anteil der Propionat-verwertenden Schlüsselspezies mit

Tabelle 21: Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur N12.

Fettdruck: Spezies-Clusters, welche in jeder der drei Proben N1, N2 und N3 oder in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von > 8 % vorkamen (= Hauptcluster).

Spezies-Cluster ^a	Nächster Verwandter	Anzahl 16S rDNA-Klone		
		N1 ^b	N2 ^b	N3 ^b
MP-1	<i>Cryptanaerobacter</i> sp./ <i>Pelotomaculum</i> sp.	0	14	26
MP-2	<i>Treponema</i> sp.	13	6	3
MP-3	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	12	4	2
MP-4	<i>Aminobacterium colombiense</i>	1	2	1
MP-5	<i>Mesotoga infera</i>	1	0	0
MP-7	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	2	1	1
MP-8	<i>Syntrophaceticus</i> sp./ <i>Thermacetogenium</i> sp.	0	13	2
MP-10	<i>Proteiniphilum</i> sp.	2	0	0
MP-11	<i>Desulfovibrio aminophilus</i>	7	3	1
MP-12	<i>Sedimentibacter</i> sp.	6	0	1
MP-13	<i>Caloramator</i> sp./ <i>Moorella</i> sp.	1	1	2
MP-14	<i>Saccharofermentans</i> sp.	0	1	0
MP-15	“ <i>Candidatus</i> Cloacamonas sp.”	0	1	2
MP-17	<i>Tepidanaerobacter</i> sp.	2	0	0
MP-22	<i>Thermacetogenium</i> sp.	0	1	0
MP-25	<i>Pelotomaculum</i> sp.	0	1	0
MP-30	<i>Thermacetogenium</i> sp.	0	1	0
MP-33	<i>Cryptanaerobacter</i> sp.	0	0	1
MP-35	<i>Moorella</i> sp.	0	0	1
MP-37	<i>Sphaerochaeta globosa</i>	0	2	0
MP-39	<i>Sphaerochaeta</i> sp.	0	0	1
MP-41	<i>Anaerobaculum</i> sp.	0	0	1
MP-47	<i>Desulfovibrio</i> sp.	0	0	1
MP-48	<i>Sphaerochaeta</i> sp.	0	1	0

^avgl. Abbildung 17, S. 81^bProben nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Tabelle 15, S. 71)

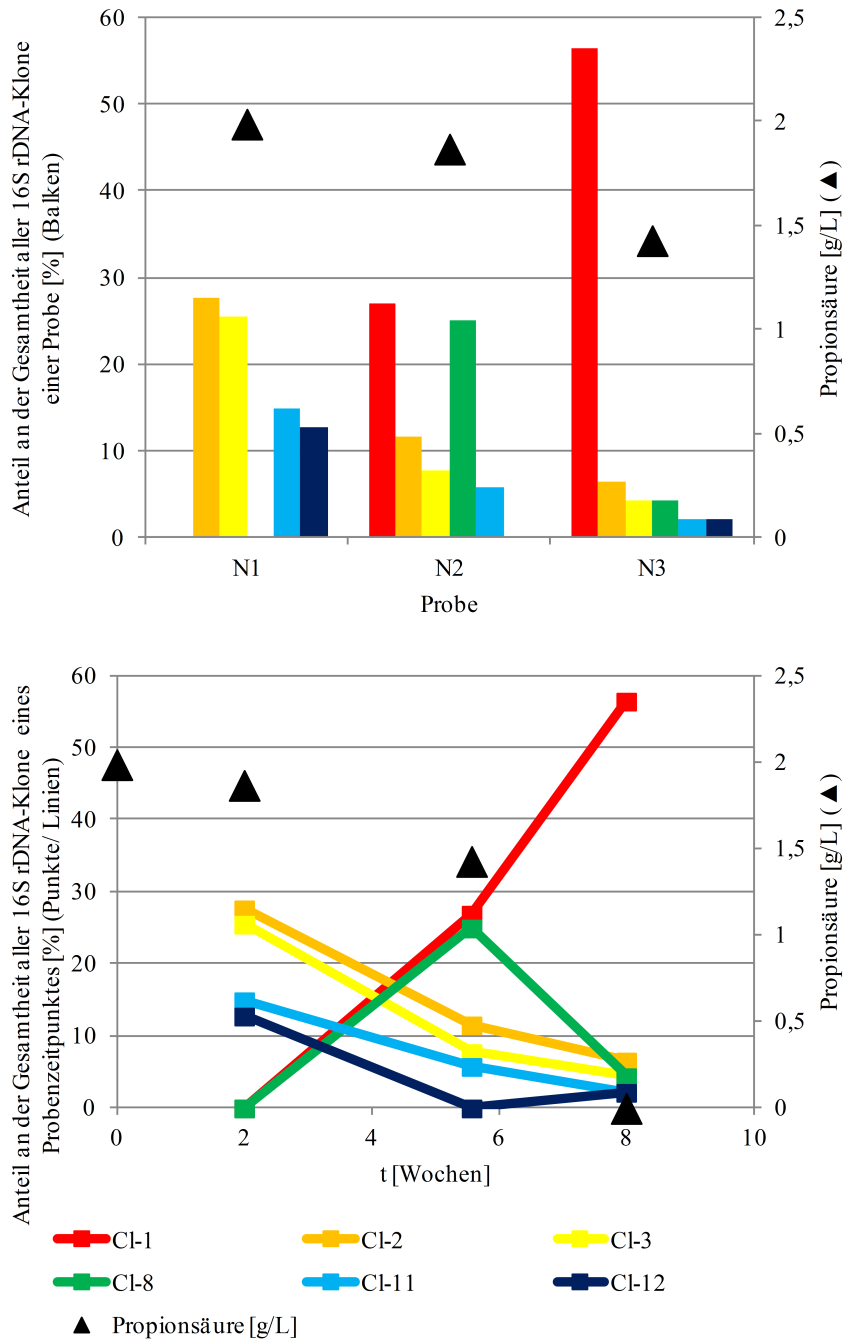


Abbildung 32: **Sukzessive Diversität während der Propionat-Verwertung.** Dargestellt sind jene Spezies-Cluster (CI-1, CI-2, CI-3, CI-8, CI-11, CI-12) der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur N12, welche in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von $> 8\%$ vorkamen (vgl. Tabelle 21, S. 95). **Oben:** diskrete Ergebnis-Darstellung der Proben N1, N2 und N3, **unten:** Darstellung der oben gezeigten Werte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

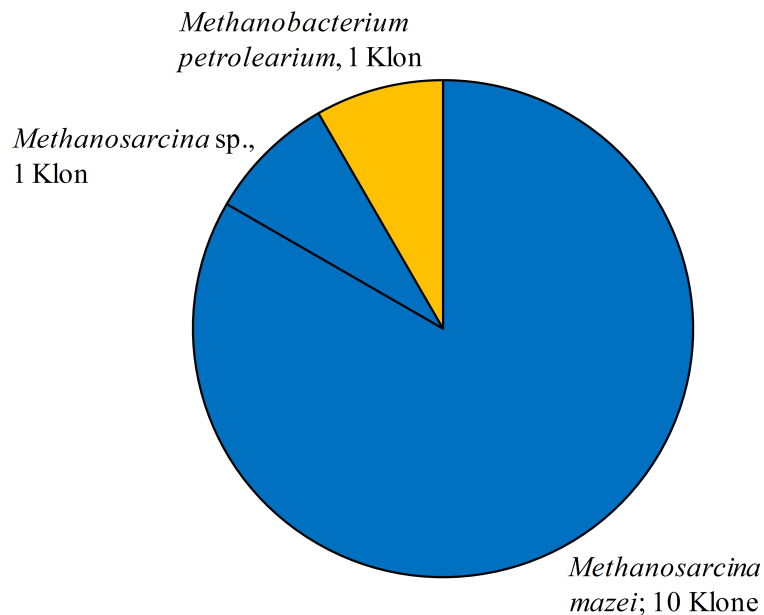


Abbildung 33: **Archaeelle Diversität der Probe N2.**

Angegeben sind die nächsten Verwandten und die Anzahl der jeweiligen 16S rDNA-Klone.

Reduzierung der Propionat-Konzentration erhöhen würde, wäre mit MP-1 diese Spezies für die Kultur N12 identifiziert. Die Tatsache, dass MP-1 mit *Pelotomaculum schinkii* eine Propionat-verwertende Spezies als nächsten Verwandten einschloss, stützte diese Vermutung. Der Anteil von MP-8 nahm lediglich von t-1 nach t-2 zu, danach jedoch wieder ab. Die weiteren vier Cluster MP-2, MP-3, MP-11 und MP-12 nahmen von t-1 nach t-3 ab. MP-2 (*Treponema* sp.) und MP-3 (*T. acetatoxydans*) waren die einzigen Cluster, die bereits in den Analysen der Kulturen Ap1a und G12 das 8 % Kriterium erfüllten (s. o.). Cluster MP-11 (*D. aminophilus*) gehörte lediglich zu den Hauptclustern der Kultur G12. Die Bedeutung der in Kultur N12 gefundenen Cluster im Rahmen der Propionat-Verwertung wird unter Abschnitt 5 diskutiert.

Archaeelle Diversität Die Propionat-verwertende Anreicherungskultur N12 wurden neben Bakterien auch auf Archaea hin analysiert. Hierzu wurde wieder eine Stichprobe zum Zeitpunkt t-2 (39 Tage Kultivierung) mittels molekularer Klonierung untersucht. Die Ergebnisse sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 50, S. 208). Abbildung 33 gibt einen graphischen Überblick über die Zusammensetzung. 12 archaeelle Klone wurden analysiert. 11 Klone wiesen als nächsten Verwandten *Methanosarcina*

mazei auf. Davon erreichten 10 Klone eine Identität von 99 % Ident. Der 11. Klon lag mit 93 % Ident unterhalb der Artgrenze (97 %) und wurde dementsprechend als *Methanosarcina* sp. eingestuft. Ein Klon wurde als *Methanobacterium petrolearium* (98 % Ident) identifiziert. Diese Ergebnisse zur archaeellen Diversität der Propionat-verwertende Anreicherungskultur N12 unterschieden sich klar von den bisher vorgestellten Ergebnissen der Kulturen Ap1a und G12 (Abbildungen 29 und 31). Für Kultur Ap1a waren Vertreter der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosaeta* und *Methanomethylovorans* detektiert worden und die Analyse der Kultur G12 ergab lediglich Vertreter der Gattung *Methanoculleus*. Hier tauchten folglich zum ersten Mal die Gattungen *Methanobacterium* und *Methanosarcina* auf. Inwiefern diese Unterschiede innerhalb der archaeellen Diversität eine Rolle für die Propionat-Verwertung spielten, wird unter Abschnitt 5 diskutiert.

4.4.6 Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur Wp2a

Bakterielle Diversität Die Auswertung der ARDRA-Gruppen (Tabellen 38, 39 und 40 ab S. 182) hinsichtlich der zugehörigen Cluster und Spezies ist im Anhang in Tabelle 46 (S. 193) durchgeführt. Mit diesen Ergebnissen konnten die Anteile der Haupt- und Nebencluster (Tabelle 22) in den verschiedenen Proben der Kultur Wp2a ermittelt werden. Die Hauptcluster der Kultur Wp2a waren die folgenden

- *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. (MP-1, 93-94/ 91-96 % Ident),
- *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (MP-3, 95-100 % Ident),
- *Aminobacterium colombiense* (MP-4, 97-100 % Ident),
- *Mesotoga infera* (MP-5, 99 % Ident),
- “*Candidatus* Cloacamonas sp.” (MP-6, 92-93 % Ident),
- *Defluviitoga tunisiensis* (MP-7, 99-100 % Ident) und
- *Ornatilinea* sp. (MP-16, 92 % Ident).

Abbildung 34 gibt einen Überblick über die Spezies-Zusammensetzung jener Hauptcluster der Proben Wp1, Wp2 und Wp3, welche das 8 %-Kriterium erfüllten (s. o.). MP-3 (*T. acetatoxydans*) war das einzige Cluster, dessen Anteil von t-1 über t-2 bis t-3 kontinuierlich abnahm. Der Verlauf der weiteren Cluster war weniger eindeutig. Das potentiell Propionat-verwertende (vgl. Abschnitt 4.4.5, S. 94) Cluster MP-1

Tabelle 22: **Mikrobielle Diversität der Anreicherungskultur Wp2a.**

Fettdruck: Spezies-Clusters, welche in jeder der drei Proben Wp1, Wp2 und Wp3 oder in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von $> 8\%$ vorkamen (= Hauptcluster).

Spezies-Cluster ^a	Nächster Verwandter	Anzahl 16S rDNA-Klone		
		Wp1 ^b	Wp2 ^b	Wp3 ^b
MP-1	<i>Cryptanaerobacter</i> sp./ <i>Pelotomaculum</i> sp.	16	33	27
MP-3	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	18	4	3
MP-4	<i>Aminobacterium colombiense</i>	4	7	2
MP-5	<i>Mesotoga infera</i>	1	2	1
MP-6	“<i>Candidatus Cloacamonas</i> sp.”	0	1	9
MP-7	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	2	2	1
MP-10	<i>Proteiniphilum</i> sp.	1	0	0
MP-16	<i>Ornatilinea</i> sp.	1	1	1
MP-19	<i>Proteiniphilum</i> sp.	2	0	0
MP-20	<i>Christensenella</i> sp.	1	0	0
MP-36	<i>Pelotomaculum</i> sp.	0	1	0
MP-38	<i>Cloacibacillus</i> sp.	1	0	0
MP-40	<i>Anaerobaculum mobile</i>	0	0	1

^avgl. Abbildung 17, S. 81

^bProben nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Tabelle 15, S. 71)

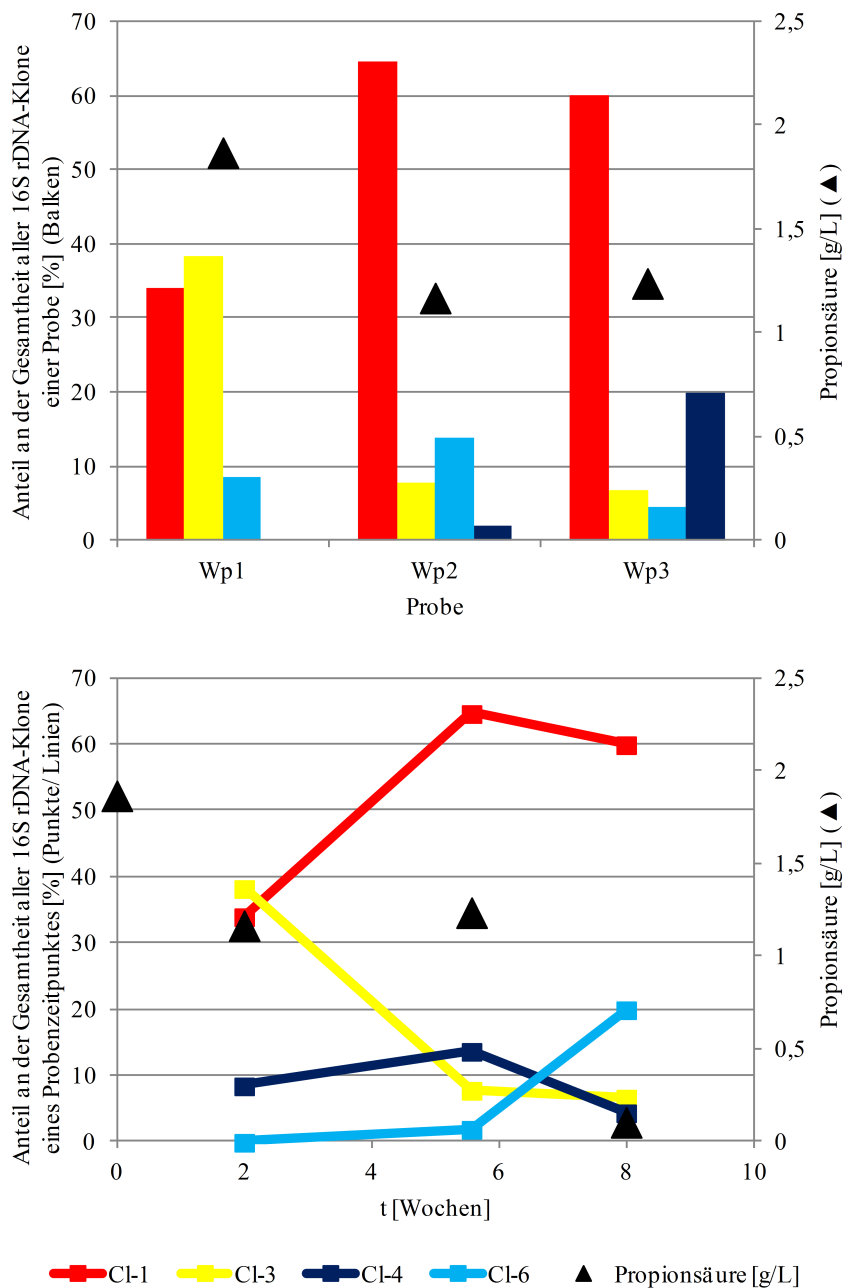


Abbildung 34: **Sukzessive Diversität während der Propionat-Verwertung.** Dargestellt sind jene Spezies-Cluster (CI-1, CI-3, CI-4, CI-6) der Propionat-verwertenden Anreicherungskultur Wp2a, welche in wenigstens einer Probe mit einem Anteil von > 8 % vorkamen (vgl. Tabelle 22, S. 99). **Oben:** diskrete Ergebnis-Darstellung der Proben Wp1, Wp2 und Wp3, **unten:** Darstellung der oben gezeigten Werte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

(*Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp.) nahm von t-1 nach t-2 stark zu, verringerte sich dann aber wieder um knapp 5 %. Im Unterschied zur Kultur N12, wo das Cluster MP-1 ebenfalls hervorstach, war der Anteil von MP-1 zum Zeitpunkt t-1 hier bereits recht hoch (34 % in Wp1 zu 0 % in N1). Allerdings hatte hier bis zu diesem Zeitpunkt auch eine deutlich stärkere Propionat-Verwertung stattgefunden. MP-4 (*A. colombiense*) hatte bereits in Kultur Ap1a das 8 %-Kriterium erfüllt (Abbildung 28) und war in den Kulturen G12 und N12 als Nebencluster detektiert worden. In Kultur Wp2a stieg der Anteil dieses Clusters von t-1 auf t-2, um dann aber wieder abzunehmen. MP-6 (*Candidatus Cloacamonas* sp.) war das einzige Cluster, dessen Anteil kontinuierlich zunahm. Diese Zunahme bewegte sich zu Beginn jedoch auf sehr geringem Niveau (0 bzw. 1 Klon zu den Zeitpunkten t-1 und t-2). Zum Zeitpunkt t-3 betrug der Anteil jedoch 20 %. Die Bedeutung der in Kultur Wp2a gefundenen Cluster im Rahmen der Propionat-Verwertung wird unter Abschnitt 5 diskutiert.

Archaeelle Diversität Die Propionat-verwertende Anreicherungskulturen wurden neben Bakterien auch auf Archaea hin analysiert. Es wurde hier erneut nur eine Stichprobe zum Zeitpunkt t-2 (39 Tage Kultivierung) untersucht. 12 Klone wurden gepickt, deren kloniertes Sequenzfragment amplifiziert, sequenziert und mit der NCBI Datenbank überprüft. Das Ergebnis des NCBI-Datenbankabgleichs der untersuchten Klone aus Probe Wp2 ist in Tabelle 50 (siehe Anhang, S. 208) zu finden. Abbildung 35 gibt einen graphischen Überblick über die archaeelle Zusammensetzung der Probe Wp2. Alle 12 Klone gehörten der Gattung *Methanosarcina* an. In Kultur N12 hatte ebenfalls die Gattung *Methanosarcina* dominiert, jedoch war dort auch ein Klon als *Methanobacterium petrolearium* (98 % Ident) identifiziert worden (siehe Abbildung 33). Die bestimmende *Methanosarcina*-Art in N12 war *Methanosarcina mazei* (99 % Ident), während hier *M. vacuolata* den Großteil der Klone ausgemacht hatte. Für Kultur Ap1a wurden Vertreter der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosaeta* und *Methanomethylovorans* detektiert worden und die Analyse der Kultur G12 ergab lediglich Vertreter der Gattung *Methanoculleus*. Die Diskussion zur archaeellen Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen ist unter Abschnitt 5 zu finden.

4.4.7 Potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies

Im Rahmen der Ergebnisdarstellung wurde bereits darauf hingewiesen, dass zwei der Cluster aus Tabelle 17 (S. 81) nächste Verwandte beinhalteten, welche bekanntermaßen Propionat verwerten. Hierzu gehörten das Cluster MP-1, welches in den Kulturen

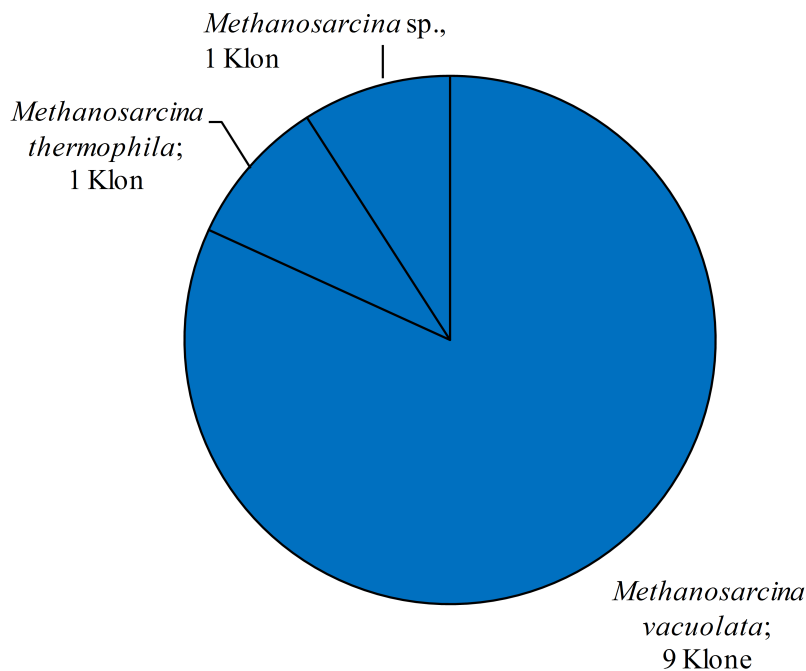


Abbildung 35: **Archaeelle Diversität der Probe Wp2.**

Angegeben sind die nächsten Verwandten und die Anzahl der jeweiligen 16S rDNA-Klone.

N12 und Wp2a als Hauptcluster detektiert wurde und Cluster MP-9, welches einzig bei der Analyse der Kultur Ap1a auftauchte. Cluster MP-9 vereinte Sequenzen, die auf *Syntrophobacter sulfatireducens* hinwiesen. Bei dieser Spezies handelt es sich um einen Literatur-bekanntem Propionat-Verwerter (Chen et al., 2005).

Zu MP-1 gehörten Sequenzen, für die mittels NCBI-Datenbankabgleich *Cryptanaerobacter phenolicus*, *Pelotomaculum isophthalicum* und *Pelotomaculum schinkii* als nächste Verwandte indentifiziert wurden (siehe Tabelle 17, S. 81). Letztere wurde als obligat syntroph Propionat-oxidierende Spezies beschrieben (de Bok et al., 2005). Jene Sequenzen dieses Clusters, deren nächster Verwandter *Pelotomaculum isophthalicum* war (siehe Liste aller Sequenzen, Tabelle 49, Anhang S. 201), wiesen eine nahezu ebenso große Übereinstimmung mit *Pelotomaculum schinkii* auf (maximal 1 % abweichende Sequenzidentität). *Cryptanaerobacter phenolicus* ist ebenfalls eine sehr nahe verwandte Art (de Bok et al., 2005; Juteau et al., 2005). Zudem wurde die charakteristische Zellform von *P. schinkii* beobachtet (vgl. Abbildung 18₉ und 18₁₁, S. 63 mit de Bok et al. (2005)). Neben diesen phylogenetischen Zusammenhängen sprachen die ermittelten Sukzessionen der Cluster MP-1 und MP-9 ebenfalls dafür, dass hier Propionat-verwertende Schlüsselspezies der Kulturen Ap1a, N12 und Wp2a

identifiziert worden waren. So verdeutlicht Tabelle 23 den zunehmenden oder abnehmenden Charakter der einzelnen Cluster. Hierzu wurde für die Cluster MP-1 bis MP-16 ein Plus eingetragen, sofern sich der relative Anteil des jeweiligen Clusters zum vorigen Zeitpunkt erhöhte, ein Minus, wenn er sich verringerte. Tauchte ein Cluster zum Zeitpunkt t-1 auf, so wurde ebenfalls ein Plus vergeben. Cluster, welche ein oder zwei Erhöhungen der relativen Anteile aufwiesen (++ oder +++), wurden wie folgt markiert. Betrafen die Erhöhungen ++ oder +++ die als Negativprobe definierte Kultur G12 (vgl. Abbildung 23, S. 70), so wurden sie grau eingefärbt, andernfalls wurden sie gelb dargestellt. Da nun davon ausgegangen wurde, dass sich der Anteil der Propionat-verwertenden Schlüsselspezies mit voranschreitender Propionat-Verwertung erhöhen würde, wurden diese gelb eingefärbten Cluster als potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies eingestuft. Die Cluster MP-17 bis MP-48 wurden der Übersicht wegen nicht dargestellt. Diese waren allesamt lediglich in einer der vier Kulturen detektiert worden und keines dieser Cluster zeigte eine Steigerung seines relativen Anteils.

Bei den potentiell Propionat-verwertenden Schlüsselspezies handelte es sich folglich um

- *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. (MP-1),
- “*Candidatus* Cloacamonas sp.” (MP-6),
- *Syntrophobacter sulfatireducens* (MP-9) und
- “*Candidatus* Cloacamonas sp.” (MP-15).

Die Cluster MP-1 (*Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp.) sowie MP-9 (*Syntrophobacter sulfatireducens*) beinhalteten, wie soeben besprochen, jeweils literaturbekannte Propionat-Verwerter als nächste Verwandte. Neben diesen 2 Clustern zeigten auch die Cluster MP-6 und MP-15 in den Kulturen Ap1a, N12 und Wp2a eine Steigerung ihrer relativen Anteile und wurden daher gelb eingefärbt. Interessanterweise ergab der NCBI-Datenbankabgleich für beide Cluster “*Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans” (92-93 % Ident). Der Vergleich der Sequenzen beider Cluster untereinander (blastn suite-2sequences) ergab eine Übereinstimmung von 96,8 % (1029 von 1063 Nt). Aufgrund der restriktiven Parametergrenze von 97 % Sequenzidentität bei der Clusteranalyse (siehe Abschnitt 3.9.3, S. 47) waren die Sequenzen der zwei Cluster konsequenterweise getrennt worden. Da das Artkonzept der 97 %-Grenze der 16S rDNA in manchen Spezies der Ähnlichkeit cistroner 16S rRNA-Gene jedoch

Tabelle 23: **Identifizierung potentiell Propionat-verwertender Spezies.**
 Betrachtung der Sukzession der Spezies-Cluster MP-1 bis MP-16 während der Propionat-Verwertung.

Spezies-Cluster ^a	Ap1a ^b			G12 ^b			N12 ^b			Wp2a ^b		
	Ap1	Ap2	Ap3	G1	G2	G3	N1	N2	N3	Wp1	Wp2	Wp3
MP-1						+		+	+	+	+	-
MP-2	+	+	-	+	+	-	+	-	-			
MP-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
MP-4	+	-	+		+	+	+	+	-	+	+	-
MP-5	+	+	+	+	+	+	+			+	+	-
MP-6	+	+	-								+	+
MP-7					+	-	+	-	+	+	-	-
MP-8		+						+	-			
MP-9		+	+									
MP-10			+		+		+			+		
MP-11				+	+	+	+	-	-			
MP-12							+		+			
MP-13					+	+	+	-	+			
MP-14					+	+		+				
MP-15				+				+	+			
MP-16										+	-	+

^avgl. Abbildung 17, S. 81

^bPropionat-verwertende Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a, sowie deren Proben nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Tabelle 15, S. 71)

+: Ein Spezies-Cluster tauchte zum ersten Mal in einer Kultur auf oder erhöhte seinen relativen Anteil zur vorhergehenden Probe.

-: Der relative Anteil eines Spezies-Clusters verringerte sich zur vorhergehenden Probe.

gelb unterlegt: Cluster, deren relativen Anteile sich nur in jenen Kulturen erhöhten, die Propionsäure tatsächlich abgebaut hatten (= potentielle Propionat-Verwerter).

grau unterlegt: Cluster, deren relativen Anteile sich auch in der als Negativprobe definierten Kultur G12 erhöhten.

Tabelle 24: **Propionat-verwertende Schlüsselspezies und Methanbakterien.** Zuordnung der jeweils nach 39 Tagen gefundenen archaeellen Gattungen zu den als potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies eingestuften Spezies-Clustern der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a.

Kultur	potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies	Methanogene Diversität (Anteile in %)
Ap1a	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i> (MP-9), “ <i>Candidatus Cloacamonas</i> sp.” (MP-6)	<i>Methanoculleus</i> (62,5) <i>Methanosaeta</i> (25) <i>Methanomethylovorans</i> (12,5)
G12	keine	<i>Methanoculleus</i> (100)
N12	<i>Cryptanaerobacter</i> sp./ <i>Pelotomaculum</i> sp. (MP-1), “ <i>Candidatus Cloacamonas</i> sp.” (MP-15)	<i>Methanosarcina</i> (92) <i>Methanobacterium</i> (8)
Wp2a	<i>Cryptanaerobacter</i> sp./ <i>Pelotomaculum</i> sp. (MP-1), “ <i>Candidatus Cloacamonas</i> sp.” (MP-6)	<i>Methanosarcina</i> (100)

nicht gerecht wird (Tourova, 2003), ist es möglich, dass es sich hier um dieselbe Art, oder zumindest zwei sehr nahe verwandte Arten gehandelt hatte.

Berücksichtigt man zusätzlich zu den potentiell Propionat-verwertenden Schlüsselspezies die Ergebnisse zur archaeellen Diversität, so lassen sich die in Tabelle 24 aufgeführten Zuordnungen treffen. Es fiel auf, dass das potentiell Propionat-verwertende Cluster MP-1 (*Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp.) sowohl in Kultur N12, als auch in Kultur Wp2a mit einem hohen Anteil der archaeellen Gattung *Methanosarcina* zusammenging. *Syntrophobacter sulfatireducens* kam in Kultur Ap1a in Gegenwart der archaeellen Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosaeta* und *Methanomethylovorans* vor. *Methanoculleus* dominierte in der Kultur G12 (Negativ-Probe), welche zum Analyse-Zeitpunkt t-2 keine Propionat-Verwertung gezeigt hatte.

Bei den grau eingefärbten Clustern lagen nach Tabelle 17 folgende Arten vor,

- *Treponema* sp. (MP-2, 86-90 % Ident),
- *Aminobacterium colombiense* (MP-4, 97-100% Ident),
- *Mesotoga infera* (MP-5, 99 % Ident),
- *Desulfovibrio aminophilus* (MP-11, 98-99 % Ident),
- *Caloramator* sp./ *Moorella* sp. (MP-13, 85-86 % Ident) und

- *Saccharofermentans* sp. (MP-14, 92 % Ident).

Diese hatten alle eine Erhöhung ihrer relativen Anteile in der als Negativ-Probe definierten Kultur G12 gezeigt. MP-11 (*D. aminophilus*) trat als solches Cluster hervor, das in der Negativprobe G12 besonders aktiv war, in den drei positiven Proben jedoch kaum eine Rolle spielte.

Es bleibt somit festzuhalten, dass sich jene drei Kulturen (Ap1a, N12 und Wp2a), welche während der 8 Wochen andauernden Versuchsphase Propionat nahezu vollständig oder vollständig verwertet hatten (siehe Abbildung 23, S. 70), von der Negativ-Probe (Anreicherungskultur G12) insbesondere in den Arten bzw. Clustern

- *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. (MP-1, 93-94/ 91-96 % Ident),
- “*Candidatus* Cloacamonas sp.” (MP-6, 92-93 % Ident),
- *Syntrophobacter sulfatireducens* (MP-9, 99-100 % Ident),
- *Desulfovibrio aminophilus* (MP-11, 98-99 % Ident) und
- “*Candidatus* Cloacamonas sp.” (MP-15, 92-93 % Ident)

voneinander unterschieden.

Gemeinsamkeiten waren in den Clustern MP-3 (*Tepidanaerobacter acetatoxydans*), MP-4 (*A. colombiense*), MP-5 (*M. infera*) und MP-10 (*Proteiniphilum acetatigenes*) zu finden. Diese zeichneten sich zudem dadurch aus, dass sie die einzigen Cluster waren, welche jeweils in allen vier Anreicherungskulturen auftauchten. Dabei war MP-3 (*T. acetatoxydans*) das einzige Cluster, welches sogar in jeder der drei Proben (t-1, t-2 und t-3) aller vier Kulturen detektiert worden war. Es hatte darüber hinaus in allen Kulturen denselben Trend gezeigt (+ – –, siehe Tabelle 23).

4.4.8 Bakterielle und archaeelle Zellzahlen

Um einen Eindruck über die bakteriellen und archaeellen Zellzahlen der untersuchten Proben (siehe Tabelle 15, S. 71) zu erhalten, wurde eine quantitative qPCR nach May et al. (2015) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.8.7, S. 46). Tabelle 25 listet die ermittelten Titer auf. Die bakteriellen Titer lagen zwischen 1,5E8 und 8,7E8 Zellen/mL und die der Archaea zwischen 1,2E6 und 3,0E8 Zellen/mL. Der archaeelle Titer von Kultur G12 lag zu den Zeitpunkten t-1 und t-2 jeweils ein bis zwei Größenordnungen unter den Vergleichswerten der weiteren Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, N12 und Wp2a. Der bakterielle Titer der Kultur G12

Tabelle 25: **Bakterielle und archaeele Zellzahlen.**

Die Werte repräsentieren die Titer der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, G12, N12 und Wp2a nach 14, 39 und 56 Tagen Inkubation (vgl. Abbildung 23, S. 70).

Kultur	Gruppe	Zell-Titer [10^7 Zellen/mL]		
		nach 14 d	nach 39 d	nach 56 d
Ap1a	Bakterien	55	39	50
	Archaea	12	11	15
G12	Bakterien	15	17	18
	Archaea	0,12	4,6	5,3
N12	Bakterien	25	51	69
	Archaea	2,0	16	30
Wp2a	Bakterien	15	87	55
	Archaea	2,7	11	3,8

markierte ebenfalls zu den genannten Messzeitpunkten den geringsten Wert, dieser unterschied sich jedoch nicht so stark von den Vergleichswerten wie bei den archaellen Werten.

5 Diskussion

Die Oxidation von Propionat zu Acetat ist unter Standardbedingungen (ΔG°) betrachtet eine energetisch ungünstige endergone Reaktion (Thauer et al., 1977). Erst die laufende Verwertung ihrer Produkte Acetat, H_2 und CO_2 mittels syntropher Mikroorganismen, externer Elektronenakzeptoren, Amperometrie oder sonstiger Mechanismen (z. B. Austreiben von H_2) treibt die Reaktion in den exergonen Bereich, so dass sie von Propionat-oxidierenden Mikroorganismen durchgeführt werden kann (Emde and Schink, 1990; Stams et al., 1993; Dong et al., 1994; de Bok et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit stand die Frage im Vordergrund, welche Spezies an der syntrophen Propionat-Oxidation in NawaRo-Biogasanlagen beteiligt sind. Aus fünf verschiedenen Fermentern konnten reproduzierbar Propionat-verwertende Anreicherungskulturen mittels anaerober Kultivierungstechniken etabliert (siehe Abschnitt 4.1, S. 48) und molekularbiologisch analysiert (Abschnitt 4.4, S. 67) werden. So wurde die sich sukzessive verändernde bakterielle Diversität im Zuge der Propionat-Verwertung untersucht und ein punktueller Einblick in die archaeelle Diversität gegeben.

Neben Propionsäure verwertenden Spezies und Methanbakterien (siehe Tabelle 24, Ergebnisteil S. 105) wurden im Rahmen der hier durchgeführten Analysen ebenso eine Reihe weiterer Bakterien identifiziert. Tabelle 26 listet die ersten 16 Spezies-Cluster der vier analysierten Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen auf. Die Cluster MP-17 bis 48 wurden hier weggelassen, da diese Cluster alle lediglich in einer Kultur auftauchten und keine Hauptcluster aufwiesen. Die dominierenden Spezies der Anreicherungskulturen werden im Rahmen dieses Abschnitts diskutiert.

5.1 Propionsäure-Abbau in NawaRo-Biogasanlagen

Propionsäure kommt in NawaRo-Biogasanlagen als Fermentations-Produkt während des anaeroben Abbaus von Biomasse zu Methan vor. Unter stabilen Bedingungen wird sie laufend umgesetzt, so dass es nicht zu einer Akkumulation kommt (Noll et al., 2010). Hemmstoffe oder überhöhte Raumbelastung können jedoch zu einer erhöhten Konzentration führen, welche den Prozess der Biogas-Produktion nachhaltig stören kann (FNR, 2013b). Insofern sind Propionat-oxidierende Bakterien für den stabilen Betrieb einer Biogasanlage von entscheidender Bedeutung. Ihre Aktivität ist jedoch von weiteren Mikroorganismen abhängig. Diese entsorgen die Produkte der Propionat-Oxidation und beeinflussen den Wasserstoffpartialdruck. Darüber hinaus werden weitere Assoziationen wie der Austausch von Aminosäuren vermutet (Sieber et al., 2012). Im folgenden werden die gefundenen Spezies hinsichtlich ihrer potentiellen

Tabelle 26: **Dominierende Spezies der Anreicherungskulturen.**★: Hauptcluster^a, ✓: Nebencluster^b.

Spezies-		Anreicherungskultur			
Cluster	Nächster Verwandter	Ap1a	G12	N12	Wp2a
MP-1	<i>Cryptanaerobacter. sp./ Pelotomaculum sp.</i>		✓	★	★
MP-2	<i>Treponema sp.</i>	★	★	★	
MP-3	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	★	★	★	★
MP-4	<i>Aminobacterium colombiense</i>	★	✓	★	★
MP-5	<i>Mesotoga infera</i>	★	★	✓	★
MP-6	“ <i>Candidatus Cloacamonas sp.</i> ”	★			★
MP-7	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>		✓	★	★
MP-8	<i>Syntropha. sp./ Thermacetogenium sp.</i>	✓		★	
MP-9	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>	★			
MP-10	<i>Proteiniphilum sp.</i>	✓	✓	✓	✓
MP-11	<i>Desulfovibrio aminophilus</i>		★	★	
MP-12	<i>Sedimentibacter sp.</i>			★	
MP-13	<i>Caloramator sp./ Moorella sp.</i>		✓	★	
MP-14	<i>Saccharofermentans sp.</i>		✓	✓	
MP-15	“ <i>Candidatus Cloacamonas sp.</i> ”		✓	✓	
MP-16	<i>Ornatilinea sp.</i>				★

^aCluster, die an jedem der drei Analysezeitpunkte detektiert wurden oder zu einem Zeitpunkt mit wenigstens 8 % der ermittelten Diversität vertreten waren (vgl. Abschnitt 4.4.3, S. 85).

^bCluster, welche die Bedingungen als Hauptcluster nicht erfüllten.

Rolle im Rahmen einer netzwerkartigen Propionat-Verwertung besprochen.

5.1.1 Propionsäure verwertende Schlüssel-Organismen

Wie in der Einleitung aufgeführt (Tabelle 2, S. 25), wurden bis heute zehn syntroph Propionat-verwertende Spezies identifiziert und isoliert. Davon sind fünf dem Phylum der Gram-negativen Proteobacteria (Klasse δ -Proteobacteria) und wiederum fünf dem Phylum der Gram-positiven Firmicutes (Klasse Clostridia) zugeordnet (Li et al., 2012).

Die sich sukzessive verändernde Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen (Abschnitt 4.4.3 bis 4.4.6 ab S. 85) wurde systematisch auf Spezies hin untersucht, die an der Propionat-Verwertung potentiell beteiligt waren. Hierzu wurde in Abschnitt 4.4.7 (S. 101) nach Clustern gesucht, deren relativen Anteile an der Diversität sich während der Abnahme der Propionat-Konzentration erhöhten, die also potentiell von der Propionat-Verwertung profitierten. Tabelle 23 (S. 104) präsentierte das Ergebnis dieser Auswertung. Auf diese Weise wurden von 48 Clustern vier Cluster identifiziert, welche anhand ihrer sukzessiv zunehmenden relativen Anteile während der Propionat-Verwertung offenbar profitierten. Dabei handelte es sich um die Cluster MP-1, MP-6, MP-9 und MP-15. MP-1 beinhaltete Sequenzen der Gattungen *Cryptanaerobacter* und *Pelotomaculum*. Diese Sequenzen waren nahe verwandt mit der Propionat-verwertenden Art *Pelotomaculum schinkii* (de Bok et al., 2005). Insofern wurde hier vermutlich die Propionat-verwertende Schlüsselspezies der Anreicherungskulturen N12 und Wp2a identifiziert. Da sich die 16S rRNA-Gensequenzen um mehr als 3 % von *P. schinkii* unterschieden (nach Stackebrandt and Goebel (1994) liegt die Artgrenze bei 97 % Sequenzidentität), ist davon auszugehen, dass es sich hier um eine nahe verwandte, neue Spezies gehandelt hatte. Cluster MP-9 entsprach der syntroph Propionat-oxidierenden Art *Syntrophobacter sulfatireducens* (Chen et al., 2005). Während diese zwei Cluster direkt mit beschriebenen Propionat-verwertenden Arten in Zusammenhang gebracht werden konnten, war dies bei den Clustern MP-6 und MP-15 nicht der Fall. Deren nächster Verwandter war jeweils "*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*". Diese beiden Cluster wiesen untereinander eine Übereinstimmung von 96,8 % auf und könnten somit möglicherweise auch zu ein und derselben Art gehört haben, da die 97 %-Artgrenze in manchen Spezies der Ähnlichkeit cistroner 16S rRNA-Gene nicht gerecht wird (Tourova, 2003). Obwohl bisher unkultivierbar, wurde das Genom von "*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*" im Jahre 2008 publiziert (Pelletier

et al., 2008). Dabei konnten alle Gene des Methylmalonyl-CoA-Weges und damit der syntrophen Propionat-Oxidation identifiziert werden. Dieses Erkenntnis bekräftigt die Annahme, dass auch die Cluster MP-6 und MP-15 in die Propionat-Verwertung involviert waren.

5.1.2 Methanbakterien

Das Modell der vollständigen Propionat-Oxidation in Syntrophie wurde in der Einleitung vorgestellt (Abbildung 4, S. 24). Es beinhaltet neben einem Propionat-oxidierenden Bakterium die syntrophe Aktivität zweier Archaeobakterien, welche die entstehenden Produkte (Acetat, H₂ und CO₂) zu Methan verwerten (Stams et al., 2006).

Die archaeele Diversität der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen während der Propionat-Verwertung wurde stichprobenartig nach 39 Tagen (t-2) bestimmt und bestand aus Vertretern der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanomethylovorans*, *Methanosaeta* und *Methanosarcina*. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 29 (Ap1a, S. 89), 31 (G12, S. 93), 33 (N12, S. 97) und 35 (Wp2a, S. 102) dargestellt. Die Paarungen aus den potentiell Propionat-verwertenden Schlüsselspezies und den gefundenen Methanbakterien der vier analysierten Anreicherungskulturen wurden in Tabelle 24 (S. 105) präsentiert. Die Anreicherungskultur Ap1a mit den potentiellen Propionat-Verwertern *Syntrophobacter sulfatireducens* (MP-9) und "*Candidatus Cloacamonas* sp." (MP-6) wies methanogene Arten der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanosaeta* und *Methanomethylovorans* auf. Da mit *Methanoculleus* eine hydrogenotrophe Gattung und mit *Methanosaeta* eine acetiklastische Gattung detektiert wurde (Kim and Gadd, 2008), ist das genannte Modell der vollständigen Propionat-Oxidation in Syntrophie für die Anreicherungskultur Ap1a vollständig abgedeckt. In den Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen N12 und Wp2a gesellten sich zu den potentiellen Propionat-Verwertern *Cryptanaerobacter* sp./ *Pelotomaculum* sp. (MP-1) und "*Candidatus Cloacamonas* sp." (MP-15 und MP-6) überwiegend die Arten *Methanosarcina mazei* (N12) und *Methanosarcina vacuolata* (Wp2a). Da beide Arten in der Lage sind, sowohl hydrogenotroph, als auch acetiklastisch Methan zu bilden (Maestrojuán and Boone, 1991), ist das genannte Modell der Dreifach-Syntrophie auch für diese Anreicherungskulturen vollständig erklärt. In der Negativkultur G12, welche im Rahmen der achtwöchigen Kultivierung die Propionsäure-Konzentration kaum verringert hatte (siehe Abbildung 23, S. 70), wurden lediglich Sequenzen hydrogenotropher *Methanoculleus*-Arten detektiert, ace-

Tabelle 27: Wachstumsraten Propionsäure-verwertender Bakterien in Co-Kultur.

Co-Kultur	Wachstumsrate μ [d ⁻¹] (Propionat-oxidierende Spezies)
<i>Pelotomaculum propionicicum</i> + <i>Methanospirillum hungatei</i>	0,2 ¹
<i>Pelotomaculum schinkii</i> + <i>Methanospirillum hungatei</i>	0,1-0,2 ²
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> + <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	0,19 ³
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> + <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> + <i>Methanosaeta thermophila</i>	0,19 ⁴

¹Imachi et al. (2007), ²de Bok et al. (2005), ³Imachi et al. (2002), ⁴Imachi et al. (2000, 2002)

tiklastische Vertreter fehlten.

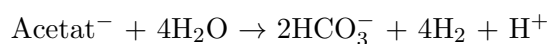
Co-Kulturen werden häufig in Kombination mit einem hydrogenotrophen Methanbakterium wie *Methanospirillum hungatei* angelegt (z. B. käuflich zu erwerbende Stämme der DSMZ). Die Wachstumsraten bewegen sich zwischen 0,1 und 0,2 d⁻¹ (Tabelle 27), was einer Verdopplungszeit von 3,5 bis 7 Tagen entspricht ($\mu = \frac{\ln(2)}{t_d}$). Obwohl der Entsorgung von Acetat im Zuge der syntrophen Verwertung von Fettsäuren eine energetisch wichtige Rolle zugesprochen wird (Schink and Stams, 2013), wirkte sich die Verwendung einer Dreifachkultur im Fall von *Pelotomaculum thermopropionicum* jedoch nicht positiv auf die Wachstumsrate aus (Imachi et al., 2002, siehe Tabelle 27). Dies mag an der Wahl der Partner-Organismen gelegen haben (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanosaeta thermophila*). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sollte die Gattung *Pelotomaculum* mit den *Methanosarcina*-Arten *Methanosarcina mazei* (N12) oder *Methanosarcina vacuolata* (Wp2a) gepaart werden. Die Gattung *Methanosaeta* konnte nur in Kombination mit *Syntrophobacter sulfatireducens* detektiert werden. Gründe hierfür lassen sich aus den Ergebnissen nicht direkt ableiten. Bisher ist unklar, aufgrund welcher Bedingungen sich die eine oder die andere acetiklastische Gattung durchsetzt. In Gegenwart hoher Acetat-Werte konnte sich im Rahmen einer Studie von Conklin et al. (2006) *Methanosarcina* behaupten. Chen and He (2015) beobachteten jedoch das Gegenteil, die Dominanz von *Methanosaeta* über *Methanosarcina* bei hohen Acetat-Konzentrationen. Die in Tabelle 24 (S. 105) dargestellten Paarungen der hier analysierten Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen lassen die Vermutung zu, dass möglicherweise der Titer rein hydrogenotropher Methanbakterien eine Rolle spielte. Während *Methanosaeta* in der

Kultur Ap1a mit einem großen Anteil der hydrogenotrophen Gattung *Methanoculleus* einherging, dominierte die Gattung *Methanosarcina* die Kulturen N12 und Wp2a nahezu vollständig und ließ nur einen geringen Anteil (N12, *Methanobacterium*) bzw. keinen Anteil (Wp2a) rein hydrogenotropher Methanbakterien erkennen. Zudem können die hier detektierten *Methanosarcina*-Arten im Gegensatz zu Vertretern der Gattung *Methanosaeta* hydrogenotroph aktiv sein. Ursache für einen geringen Titer rein hydrogenotropher Arten kann der Wasserstoff-Partialdruck ($p[\text{H}_2]$) sein. Unterhalb von $6,4\text{E}^{-5}$ atm $p[\text{H}_2]$ findet unter Laborbedingungen keine hydrogenotrophe Methanogenese statt (Lovley, 1985).

5.1.3 Syntroph Acetat-oxidierende Bakterien

Das Cluster MP-3 war das einzige Cluster, welches nicht nur in jeder der vier Anreicherungskulturen vorkam, sondern darüber hinaus in jeder Probe (t-1, t-2 und t-3) der vier Kulturen vertreten war. Wie der Tabelle 17 (S. 81) zu entnehmen ist, handelte es sich dabei um *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Phylum Firmicutes, Klasse Clostridia). Der Organismus wurde 2011 als anaerobes syntroph Acetat oxidierendes Bakterium beschrieben (Westerholm et al., 2011), das Genom ist sequenziert (Manzoor et al., 2013; Müller et al., 2015). Sein Stoffwechsel zeichnet sich durch die Verwertung diverser Zucker, Malat und Citrat, sowie stammspezifisch einiger Aminosäuren aus. In Co-Kultur mit hydrogenotrophen Methanbakterien wurde Acetat bei niedrigem Wasserstoff-Partialdruck zu CO_2 und CH_4 verwertet (Westerholm et al., 2011). Die Fähigkeit dieser syntrophen Acetat-Oxidation ist neben *T. acetatoxydans* nur für *Clostridium ultunense*, *Thermacetogenium phaeum*, *Thermotoga lettingae* und *Syntrophaceticus schinkii* beschrieben (Schnürer et al., 1996; Hattori et al., 2000; Balk et al., 2002; Westerholm et al., 2011).

Reaktion der syntrophen Acetat-Oxidation



$$\Delta G^{\circ'} = +104,6 \text{ kJ/Rkt}$$

Der Stoffwechselweg ist Gegenstand aktueller Forschung, da er hydrogenotrophen Methanbakterien die Methanbildung aus Acetat ermöglicht und so mit der acetiklastischen Methanogenese konkurriert (Hao et al., 2013; Mulat et al., 2014; Hao et al., 2015).

Den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen kann nicht entnommen

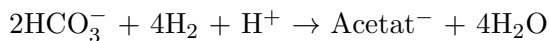
werden, von welchen Substanzen *T. acetatoxydans* profitierte. Es ist jedoch ersichtlich, dass sich sein relativer Anteil in allen Kulturen während der Verwertung von Propionat verringerte, der Organismus also insbesondere zu Beginn der Kultivierung profitierte. Da das frische Medium ohne Zugabe von H₂ hergestellt wurde, die Gärprozesse jedoch H₂ freisetzen, profitierte er offenbar während H₂-armen Bedingungen (der p[H₂] wurde nicht gemessen).

Bei Cluster MP-5 handelte es sich um *Mesotoga infera*, eine Spezies der Thermotogae. Dieser Organismus verwertet diverse Zucker in Gegenwart von elementarem Schwefel als Elektronenakzeptor. Endprodukte der Fruktose-Oxidation sind Acetat, CO₂ und Sulfid (Hania et al., 2013). Syntrophe Interaktionen sind bisher nicht bekannt. Allerdings wurden Vertreter der Gattung *Mesotoga* wiederholt in komplexen Systemen nachgewiesen, beispielsweise während des Abbaus von Hexadekan oder Terephthalsäure (Cheng et al., 2013; Nobu et al., 2014). Nobu et al. (2014) folgerten aus Genom- und Transkriptom-Untersuchungen eines Terephthalsäure abbauenden Bioreaktors, dass auch Vertreter von *Mesotoga* möglicherweise Acetat syntroph oxidierten und so eine wichtige Rolle bei der Verwertung des durch den Terephthalsäure-Abbau gebildeten Acetats spielen könnten. Mit *Thermotoga lettingae* ist bereits eine syntroph Acetat verwertende Thermotogae-Spezies bekannt (Balk et al., 2002).

5.1.4 Potentiell autotroph homoacetogene Bakterien

Mit *Tepidanaerobacter acetatoxydans* und *Mesotoga infera* wurde sowohl eine bekannte, als auch eine potentielle syntroph Acetat oxidierende Spezies identifiziert (Abschnitt 5.1.3). Autotroph homoacetogene Mikroorganismen führen die umgekehrte Reaktion durch, die Bildung von Acetat aus H₂ und CO₂ (Saady, 2013).

Reaktion der autotrophen Homoacetogenese



$$\Delta G^{\circ'} = -104,6 \text{ kJ/Rkt}$$

Es handelt sich also um die gegenseitige Konversion der Edukte der hydrogenotrophen und acetiklastischen Methanogenese (Abbildung 36). Die hydrogenotrophe Methanogenese aus syntroph oxidiertem Acetat wurde mehrfach beobachtet (Hao et al., 2013; Mulat et al., 2014). Umgekehrt kann die über autotroph homoacetogene Bakterien geleitete acetiklastische Methanogenese aus H₂/ CO₂ hydrogenotrophe

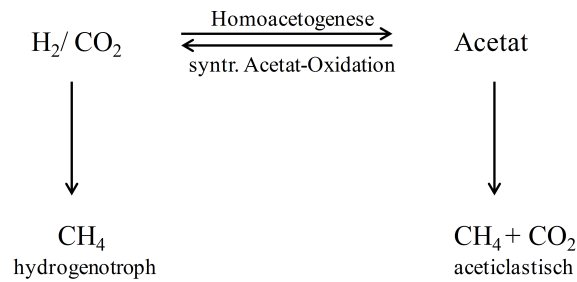


Abbildung 36: **Wechselseitige Konversion von Acetat und H₂/CO₂.**

Die Konversion der Edukte der hydrogenotrophen und acetiklastischen Methanogenese wird durch autotroph homoacetogene und syntroph Acetat-oxidierende Bakterien durchgeführt.

Methanbakterien scheinbar nicht vollständig ersetzen (Ye et al., 2014). Dennoch werden autotroph Homoacetogene wiederholt als wichtige H₂-Verwerter Methan bildender Biotope gesehen (Ni et al., 2011; Limam et al., 2014; Ye et al., 2014).

Innerhalb der Cluster MP-8, MP-13, MP-22, MP-30, MP-31 und MP35 (siehe Tabelle 17, S. 81) wurden 16S rDNA-Sequenzen identifiziert, deren nächste Verwandte mit *Thermacetogenium phaeum* und *Moorella thermoacetica* (ehem. *Clostridium thermoaceticum*) jeweils autotroph homoacetogene Spezies waren (Hattori et al., 2000; Drake and Daniel, 2004; Hattori et al., 2005). Die Ähnlichkeit lag jedoch jeweils deutlich unter der Artgrenze von 97 % Sequenzidentität (Stackebrandt and Goebel, 1994), so dass dies lediglich als Indiz auf autotroph homoacetogene Spezies gesehen werden kann. Bei Cluster MP-18 handelte es sich um die Gattung *Thermoanaerobacter* sp., die mit *T. kivui* (ehemals *Acetogenium kivui*) ebenfalls eine autotroph homoacetogene Spezies beinhaltet (Leigh et al., 1981).

Nobu et al. (2014) identifizierten in ihrem Terephthalsäure-verwertenden Bioreaktor einen unkultivierten Vertreter aus dem Phylum Chloroflexi. Dessen Genom kodierte den gesamten Wood-Ljungdahl-Weg der autotrophen Homoacetogenese, weshalb die Autoren vermuteten, dass es sich bei diesem Chloroflexi-Vertreter um eine neue autotroph homoacetogene Spezies handelte. Als nächste Verwandte wurden *Anaerolinea thermophila* und *Caldilinea aerophila* genannt, welche auch im Rahmen dieser Arbeit die nächsten Verwandten der Cluster MP-43 und MP-45 darstellten. Darüber hinaus handelte es sich bei den Clustern MP-16 und MP-27 (jeweils *Ornatilinea* sp.) um weitere Chloroflexi-Verwandte. Tabelle 28 fasst die potentiell homoacetogenen Organismen der Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen zusammen.

Tabelle 28: **Potentiell homoacetogene Spezies der Anreicherungskulturen.**

✓: Cluster wurde in der jeweiligen Anreicherungskultur nachgewiesen.

Cluster	Nächster Verwandter	Anreicherungskultur			
		Ap1a	G12	N12	Wp2a
MP-8	<i>Syntrophaceticus</i> sp./ <i>Thermacetogenium</i> sp.	✓		✓	
MP-13	<i>Caloramator</i> sp./ <i>Moorella</i> sp.		✓	✓	
MP-18	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	✓			
MP-22	<i>Thermacetogenium</i> sp.			✓	
MP-30	<i>Thermacetogenium</i> sp.			✓	
MP-31	<i>Moorella</i> sp.		✓		
MP-35	<i>Moorella</i> sp.			✓	
MP-43	<i>Anaerolinea</i> sp.		✓		
MP-45	<i>Caldilinea</i> sp.	✓			

5.1.5 Propionat-Verwertung und Transfer von Wachstumsfaktoren

Das Cluster MP-4 (*Aminobacterium colombiense*, Phylum Synergistetes) zeigte sich in den Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen, welche Propionat während der achtwöchigen Kultivierung tatsächlich abgebaut hatten (Abbildung 23, S. 70), jeweils als Hauptcluster. In der Negativ-Kultur G12 war es nur als Nebencluster vertreten gewesen (siehe Tabelle 26). Insofern wies es unter Propionat-verwertenden Bedingungen erhöhte Anteile auf.

A. colombiense fermentiert einige Aminosäuren und Pyruvat in Reinkultur, eine Reihe weiterer Aminosäuren werden syntroph unter Methanbildung mit *Methanobacterium formicicum* verwertet (Baena et al., 1998b). Das Genom ist sequenziert (Chertkov et al., 2010). Da dem PI-Medium (Tabelle 9, S. 37) ein Reaktorfiltrat unbekannter Zusammensetzung zugesetzt wurde, ist es denkbar, dass *A. colombiense* bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen Aminosäuren als Substrat vorliegen hatte. Bei der syntrophen Oxidation von Glutamat oder α -Ketoglutarat entsteht zudem Propionat (Baena et al., 1998b), was eine Ursache dafür sein könnte, dass *A. colombiense* von Propionat-verwertenden Bedingungen profitierte.

Kato et al. (2009) beobachteten die Up-Regulation von Genen des Aminosäure-Transport und -Metabolismus (z. B. GltB, Glutamate synthase domain 2) von *Pelotomaculum thermopropionicum*, wenn dieser und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* syntroph mit Propionat kultiviert wurden. Sieber et al. (2012) schloss daraus, dass syntrophe Partner sich gegenseitig Aminosäuren übertragen. Insofern könnte auch *A. colombiense* als Propionsäure-Produzent und Aminosäure-Verwerter

mit Propionat-oxidierenden Bakterien metabolisch in Zusammenhang stehen. Cluster MP-6 war in allen vier Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen als Nebencluster vertreten (siehe Tabelle 26), was die Aufmerksamkeit auf dieses Cluster lenkte. Nach Tabelle 17 (S. 81) ist der nächste Verwandte *Proteiniphilum acetatigenes* (94 bis 95 % Ähnlichkeit). *P. acetatigenes* wurde aus einem Reaktor mit Brauerei-Abwasser isoliert und von Chen and Dong (2005) beschrieben. Hefeextrakt, Pepton, Pyruvat, Glycin und L-Arginin wurden als Kohlenstoff- und Energiequellen ausgemacht. Fermentations-Produkte waren überwiegend Acetat, aber auch Propionat, auf dessen Verwertung *P. acetatigenes* ebenfalls Einfluss nimmt. So beschleunigte sich die Propionat-Verwertung der Propionat-verwertenden Co-Kultur *Syntrophobacter sulfatireducens* / *Methanobacterium formicicum* von 0,75 mM auf 1,25 mM pro Tag, wenn *P. acetatigenes* hinzugefügt wurde. Als Ursache vermuteten die Autoren den Austausch unbekannter Wachstumsfaktoren oder die Beseitigung von Pyruvat (Chen et al., 2005; Chen and Dong, 2005).

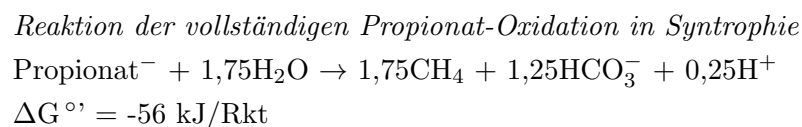
5.2 Modellierung der syntrophen Propionat-Oxidation

Die syntrophe anaerobe Propionat-Oxidation bedingt die Aktivität H₂-verwertender Mikroorganismen. In der Regel werden Co-Kulturen mit hydrogenotrophen Methanbakterien konstruiert (siehe Tabelle 2, S. 25). Bei Erweiterung durch acetiklastische Methanbakterien zur Dreifachkultur kann sich der Abbau von Propionat durch die Verwertung des entstehenden Acetats beschleunigen (Dong et al., 1994). Insofern beschreibt dieses Modell die vollständige Oxidation von Propionat zu CH₄ und CO₂ (siehe Abbildung 4, S. 24). Wie unter Abschnitt 5.1.2 erklärt, ist dieses Modell für die drei Propionat-verwertenden Anreicherungskulturen Ap1a, N12 und Wp2a durch entsprechende 16S rDNA-Klone vollständig abgedeckt.

Im Folgenden werden die unter Abschnitt 5.1 besprochenen Erkenntnisse in das Dreifachkultur-Modell der vollständigen Propionat-Oxidation integriert.

5.2.1 Propionat-Oxidation und Wasserstoff-Partialdruck

Wie in der Einleitung (Abschnitt 2.5.1) beschrieben, entstehen bei der vollständigen Propionat-Oxidation in Dreifachkultur CH₄ und CO₂ nach folgender Stöchiometrie.



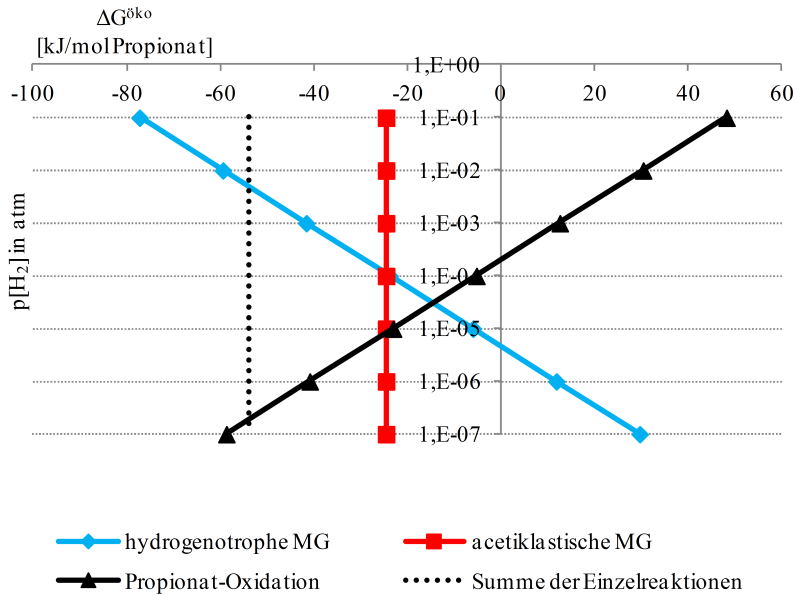


Abbildung 37: **Energetik der vollständigen Propionat-Oxidation.**

Freie Energie ($\Delta G^{\delta ko}$) pro Mol Propionat der vollständigen Propionat-Oxidation in Dreifachkultur ($\text{Propionat}^- + 1,75 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 1,75 \text{ CH}_4 + 1,25 \text{ HCO}_3^- + 0,25 \text{ H}^+$) mit **hydrogenotropher Methanogenese** und **acetiklastischer Methanogenese**. Werte berechnet nach (Zinder, 1984, $\Delta G' = \Delta G^{0'} + 5,94 \log \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$) mit 1 mmol/L Propionat und Acetat, 20 mmol/L HCO_3^- , 0,6 atm CH_4 und variablem $p[\text{H}_2]$ in atm.

Der Propionat-oxidierenden Spezies und den Methanbakterien steht dabei unterschiedlich viel Freie Energie zur Verfügung. Nach Zinder (1984) ergeben sich in Abhängigkeit des Wasserstoffpartialdruckes die in Abbildung 37 dargestellten Energie-Kurven. Es ist zu erkennen, dass die H_2 -abhängigen Reaktionen entgegengesetzt verlaufen. Bei einem $p[\text{H}_2]$ von $3,0\text{E}^{-5}$ schneiden sich diese Kurven. Hier steht den Propionat- und H_2 -verwertenden Organismen mit -15 kJ/mol gleich viel Freie Energie zur Verfügung. Folglich sollte hier der H_2 Umsatz optimal sein. Die Freie Energie der Methanogenese aus Acetat liegt mit $\Delta G^{\delta ko} = -25 \text{ kJ/mol}$ Propionat leicht darüber. Scholten and Conrad (2000) folgerten aus der energetischen Betrachtung syntroph Propionat-oxidierender Batch-Kultivierungen, dass Propionat-Oxidierer mit Freien Energien überleben können, die deutlich unter den theoretisch vorhergesagten Werten liegen. Für die ATP-Synthese werden etwa $+60 \text{ kJ/mol}$ benötigt. Unter der Annahme, dass drei über die Membran translozierte Protonen diese Energie aufbringen, beträgt die

minimal konservierbare Energie -20 kJ/mol. Jüngere Struktur-Funktions-Analysen von ATPasen geben Hinweise darauf, dass minimale Energieeinheiten von -15 bis -12 kJ/mol für die ATP-Synthese konserviert werden können (Schink and Stams, 2013). Insofern liegen die hier theoretisch ermittelten Werte in diesem Bereich bzw. leicht darüber.

Stöchiometrisch betrachtet kann jeweils eine methanogene Spezies durch einen syntrophen Acetat-Oxidierer oder einen autotroph Homoacetogenen ersetzt werden. Abbildung 38 visualisiert diese Situationen. Addiert man daraus die Modelle B und C, so ergibt sich ein Zusammenwirken von fünf Organismen (Abbildung 39). Folgende Konsequenzen resultieren:

- 1) Während im Dreifach-Modell die acetiklastische Methanogenese überwiegt (57 %), wird im Fünfach-Modell Methan zu gleichen Teilen hydrogenotroph und acetiklastische gebildet (siehe Abbildung 38).
- 2) Bei $p[\text{H}_2] = 5\text{E}^{-5}$ atm steht den Methanbakterien gleich viel Freie Energie zur Verfügung. Der syntrophen Acetatoxidation und der Homoacetogenese bleibt hier jeweils eine Freie Energie von $\Delta G^{\text{öko}} = 0$ kJ/mol Propionat (siehe Abbildung 39 unten).
- 3) In Abhängigkeit von $p[\text{H}_2]$ ist entweder die syntrophe Acetatoxidation oder die Homoacetogenese exergon, niemals beide zusammen (siehe Abbildung 39 unten).
- 4) Bei extremen $p[\text{H}_2]$ steigt die Bedeutung der syntrophen Acetatoxidation bzw. der Homoacetogenese (siehe Abbildung 39 unten).
- 5) Unterhalb von $4,6\text{E}^{-6}$ ist die Propionat-Verwertung durch die Kombination der Propionat-Oxidation, der Acetat-Oxidation und der acetiklastischen Methanogenese zu erwarten (siehe Abbildung 38 B und 39 B). Diese Bedingungen sind jedoch nicht stabil, da H_2 akkumuliert, sich der $p[\text{H}_2]$ dementsprechend erhöht und die hydrogenotrophe Methanogenese ermöglicht.

Aus Konsequenz 2) ergibt sich der optimale $p[\text{H}_2]_{\text{opt}}$ von 5E^{-5} atm. Hier teilen sich lediglich der Propionat-Oxidierer, sowie die Methanbakterien die Freie Energie von 53,7 kJ/mol. Für die syntrophe Acetat-Oxidation und die Homoacetogenese bleiben jeweils $\Delta G^{\text{öko}} = 0$ kJ/mol Propionat. Folglich liegt an diesem Punkt die Situation der Propionat-Oxidation in Dreifachkultur aus Abbildung 37 vor, in der den beteiligten Organismen bei $p[\text{H}_2]_{\text{opt}}$ 10,6 (Propionat-Oxidation), 24,6 und 18,5 kJ/mol Propionat (acetiklastische und hydrogenotrophe Methanogenese) zur Verfügung stehen.

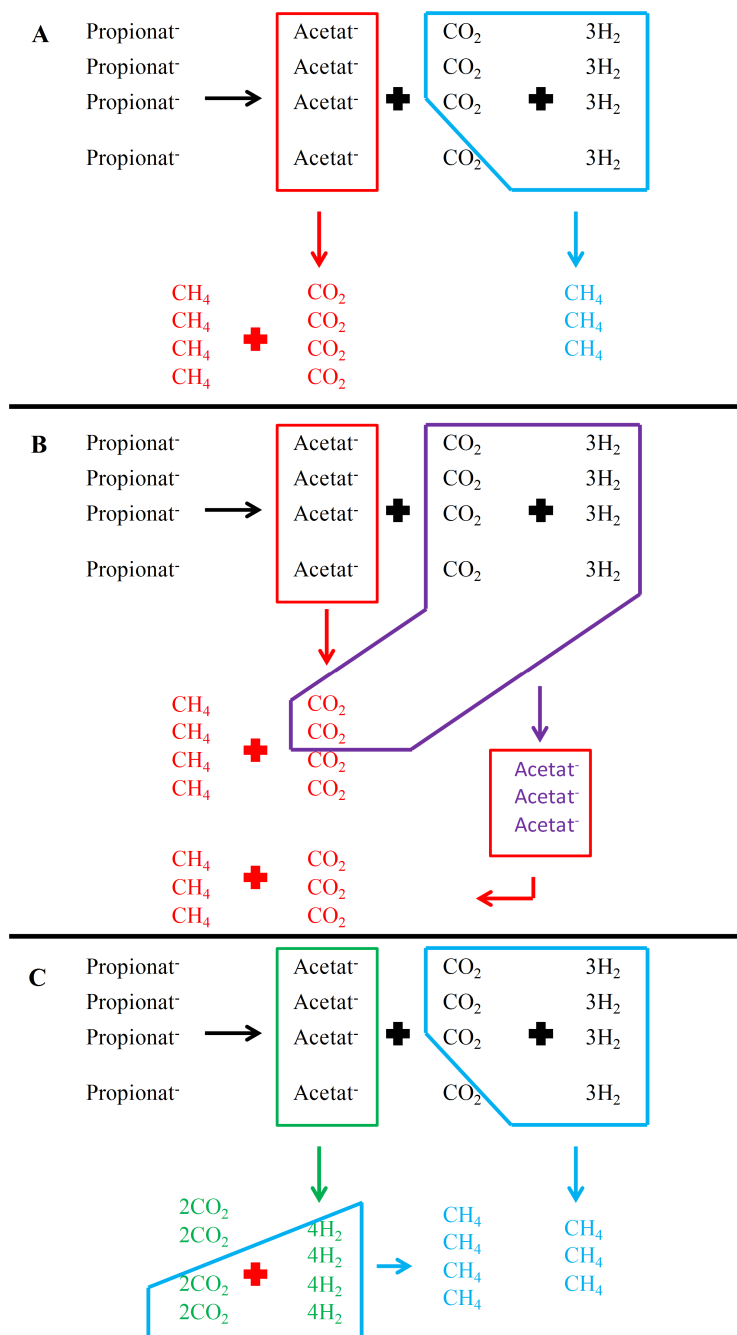


Abbildung 38: Modellierung der vollständige Propionat-Oxidation.

$4\text{Propionat}^- + 4\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{CO}_2$ (Schink, 1997). **A**: Propionat-Oxidation mit **hydrogenotropher Methanogenese** und **acetiklastischer Methanogenese**, **B**: Propionat-Oxidation mit **acetiklastischer Methanogenese** und **autotropher Homoacetogenese**, **C**: Propionat-Oxidation mit **syntropher Acetat-Oxidation** und **hydrogenotropher Methanogenese**.

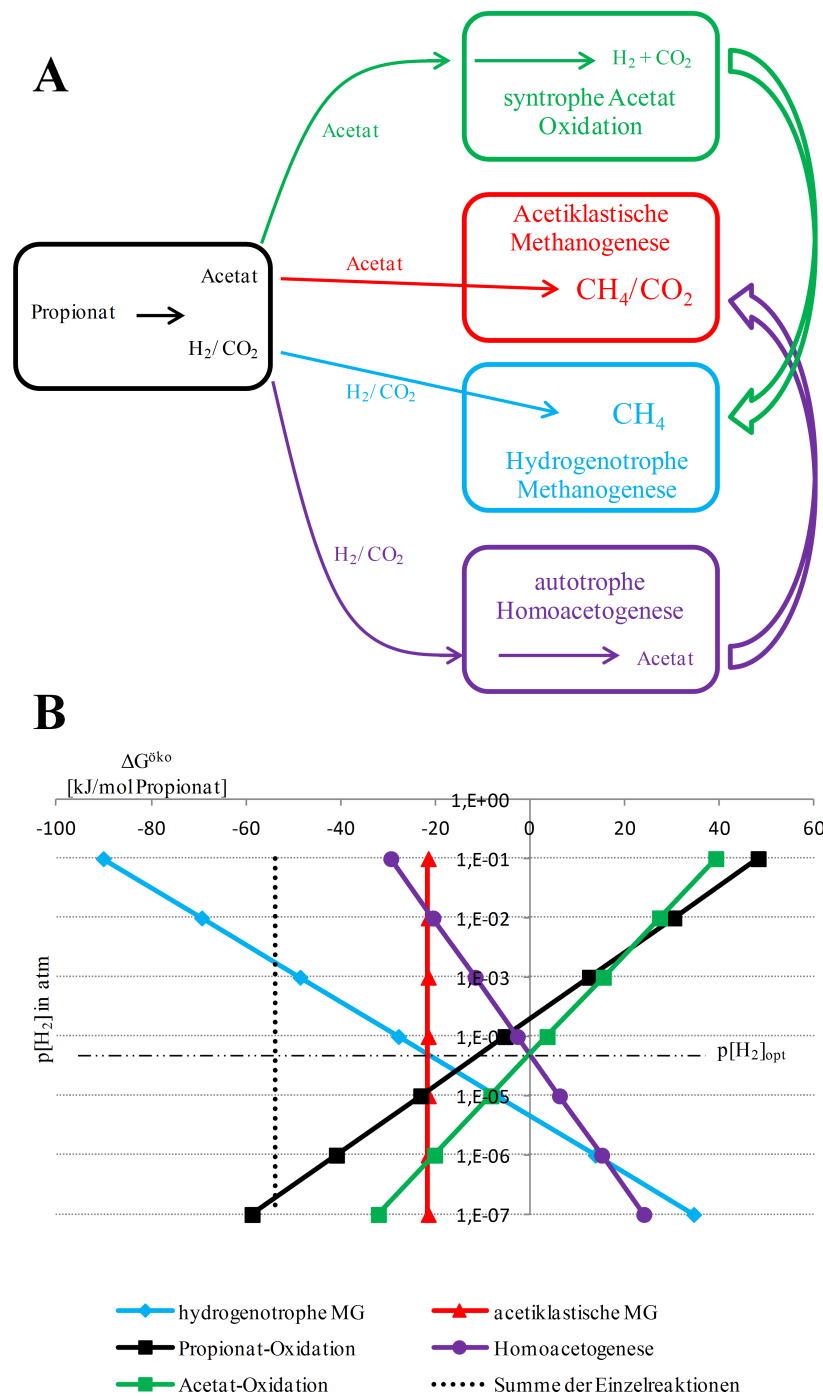
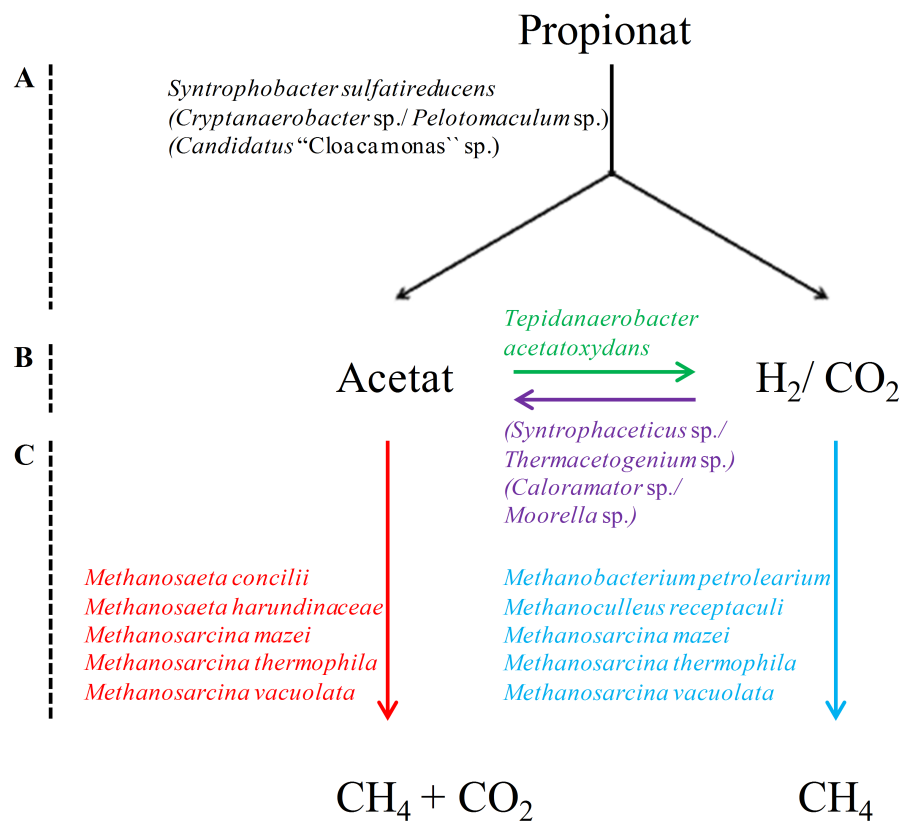


Abbildung 39: **Erweitertes Modell der vollständigen Propionat-Oxidation.** **A:** Modell der vollständigen Propionat-Oxidation unter Zusammenwirken Propionat-oxidierender, **syntroph Acetat-oxidierender** und **autotroph homoacetogener** Bakterien, sowie **hydrogenotropher Methanbakterien** und **acetiklastischer Methanbakterien**. **B:** Freie Energie nach Zinder (1984) der vollständigen Propionat-Oxidation in Fünffachkultur. $p[\text{H}_2]_{\text{opt}}$: optimaler Wasserstoffpartialdruck. Berechnung der Graphen im Anhang auf Seite 208.

Homoacetat-Konversion und $p[\text{H}_2]$ -Stabilisierung Abbildung 39 B ist zu entnehmen, dass sowohl die syntrophe Acetat-Oxidation, als auch die Homoacetogenese den für die Propionat-Oxidation möglicherweise optimalen $p[\text{H}_2]_{opt}$ (siehe Abschnitt 5.2.1) exakt flankieren. Schlägt der $p[\text{H}_2]$ nach oben aus, addiert sich zur hydrogenotrophen Methanogenese die H_2 -verwertende Homoacetogenese. Umgekehrt, bei zu niedrigem $p[\text{H}_2]$ wird die syntrophe Acetat-Oxidation als H_2 -produzierende Reaktion exergon. Dementsprechend könnten sich diese Reaktionen stabilisierend auf den $p[\text{H}_2]_{opt}$ und folglich stabilisierend auf die Propionat-Verwertung auswirken. Mit *Tepidanaerobacter acetatoxydans* wurde in allen vier analysierten Anreicherungskulturen eine syntroph Acetat-oxidierende Spezies detektiert (vgl. Tabelle 26, S. 109). Ebenso wurden eine Reihe potentiell autotroph homoacetogener Arten gefunden (Tabelle 28, S. 28).

5.3 Vollständige Propionat-Oxidation im Netzwerk

Emde and Schink (1990) zeigten, dass Propionat in einem amperometrischen Kultursystem durch eine Monokultur (*Propionibacterium freudenreichii*) verwertet werden kann. In konventioneller Kultivierung ist zumindest die Co-Kultivierung einer H_2 -verwertenden Spezies notwendig (siehe Abschnitt 2.5.1, S. 22). Unter Zugabe acetiklastischer Methanbakterien oder von *Proteiniphilum acetatigenes* zu Co-Kulturen wurde eine beschleunigte Propionat-Verwertung beobachtet (Dong et al., 1994; Chen and Dong, 2005). Wie soeben besprochen, könnten auch syntrophe Acetat-Oxidierer und homoacetogene Bakterien an der Verwertung von Propionat beteiligt sein, indem sie die Produkte der Propionat-Oxidation (Acetat, H_2 , CO_2) im Falle eines ungünstigen $p[\text{H}_2]$ konvertieren. Untersuchungen von Kato et al. (2009) deuten zudem nach Sieber et al. (2012) darauf hin, dass es im Zuge der syntrophen Propionat-Verwertung zum Austausch von weiteren Metaboliten wie Aminosäuren kommt. In Abschnitt 5.1.5 wurde darauf eingegangen, dass hier *Aminobacterium colombiense* und *Proteiniphilum* sp. beteiligt gewesen sein könnten. Insofern wird deutlich, dass die Verwertung von Propionat in anaeroben Ökosystemen durch ein Netzwerk funktional unterschiedlicher Spezies durchgeführt wird. Die mikroskopischen Aufnahmen mikrobieller Konglomerate (Abschnitt 4.3 ab S. 58) unterstreichen diese Annahme. Mehrere Publikationen haben bereits darauf hingewiesen (Lueders et al., 2004; Ariesyady et al., 2007; Gan et al., 2012). Dass eine noch höhere Komplexität erwartet werden kann, wird aus einer Analyse von Ban et al. (2015) deutlich. Sie beobachteten während der stufenweisen Verringerung der Fermenter-Verweilzeit eine Verlagerung der Anteile

Abbildung 40: **Propionat-Verwertung im Netzwerk.**

Die angegebenen Spezies wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert (siehe Abschnitt 5.1). Spezies in Klammern sind aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft potentielle Kandidaten für die angegebenen Stoffwechselreaktionen. **A:** Propionat-Oxidation (siehe Abschnitt 5.1.1), **B:** p[H₂]-abhängige Acetat, H₂/CO₂-Konversion (siehe Abschnitt 5.2.1), **C:** Methanogenese (siehe Abschnitt 5.1.2).

unterschiedlicher Propionat-oxidierender Spezies. So dominierten unterschiedliche Propionat-verwertende Spezies bei unterschiedlichen Verweilzeiten.

5.4 Übergeordnete Bedeutung der Homoacetat-Konversion

In Abschnitt 5.2.1 wurde unter den Bedingungen nach Zinder (1984) für die Propionat-Verwertung ein theoretisch optimaler $p[\text{H}_2]_{opt}$ von 5E^{-5} atm ermittelt. Ebenfalls wurde vorgeschlagen, dass die Homoacetogenese und die syntrophe Acetat-Oxidation im Rahmen der Propionat-Oxidation daran beteiligt sind, den für die Reaktion optimalen Wasserstoff-Partialdruck anzustreben oder zu stabilisieren. Insofern würden diese Reaktionen die Propionat-Verwertung stabilisieren, da diese direkt vom $p[\text{H}_2]$ abhängt. Diese Funktion muss jedoch nicht auf die Propionat-Verwertung beschränkt sein. In Abhängigkeit von der Substrat-Zusammensetzung werden Acetat und H_2 in verschiedenen Verhältnissen gebildet. Unter kontinuierlicher Fütterung kommt es darüber hinaus immer wieder zu Eingriffen in das Fermentergleichgewicht. Insofern könnte die Acetat- H_2 / CO_2 -Konversion übergeordnet dafür sorgen, dass der optimale Wasserstoffpartialdruck immer angestrebt oder stabilisiert wird.

5.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte drei potentiell Propionat-verwertende Schlüsselspezies aus NawaRo-Biogasanlagen identifizieren. Diese Organismen wuchsen in Gemeinschaft mit Bakterien und Archaea, welche bekanntermaßen (z. B. hydrogenotrophe Archaea) oder potentiell (z. B. *Tepidanaerobacter acetatoxydans*) indirekt an der Propionat-Oxidation beteiligt sind (siehe Abbildung 40). Um dieses Netzwerk der Propionat-Verwertung metabolisch im Einzelnen aufklären zu können, werden Reinkulturen der entsprechenden Spezies benötigt, welche hinsichtlich ihrer metabolischen Funktion untersucht werden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beteiligten Arten in Anreicherungskulturen über Jahre hinweg erfolgreich kultiviert werden können. Die Reinkultivierung einiger dieser Spezies ist jedoch ein schwieriges oder sogar bisher erfolgloses Unterfangen (bspw. "*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*"). Abhilfe könnte ein Kultivierungssystem schaffen, in dem einzelne Spezies in Gegenwart der gesamten aktiven Anreicherungskultur durch Verdünnung reinkultiviert werden. Dieses System müsste aus mehreren Kompartimenten bestehen, welche den Austausch von Metaboliten uneingeschränkt zulassen, eine Vermischung vereinzelter Zellen mit jenen der Anreicherungskultur jedoch ausschließen. Auf diese Weise stünden die vereinzelter Zellen metabolisch in nahezu

uneingeschränktem Kontakt mit der Anreicherungskultur, aus der sie stammen. Verglichen mit der Kultivierung innerhalb einer Anreicherungskulture wären lediglich direkte Zell-Zell-Interaktionen (Nanowires, Pili, Zell-Konglomerate) nicht möglich. Solche co-reinkultivierten Arten könnten dann in gewünschter Weise kombiniert und analysiert werden, um die genauen Funktionen der assoziierten Spezies im Rahmen der Propionat-Verwertung untersuchen und belegen zu können. Definierte Wachstumsversuche ließen sich in diesem Zusammenhang ideal mit Genom- und Proteom-Analysen kombinieren. Letztendlich ist das übergeordnete Ziel die Propionat-Verwertung in NawaRo-Biogasanlagen vollständig zu verstehen und somit die Akkumulation der Säure zwecks Prozessoptimierung verhindern zu können.

6 Literatur

Literatur

- Achtnich, C., Bak, F., and Conrad, R. (1995). Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 19(1):65–72.
- Ahammad, S. Z., Gomes, J., and Sreekrishnan, T. (2008). Wastewater treatment for production of H₂S-free biogas. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(8):1163–1169.
- Ahring, B., Schmidt, J., Winther-Nielsen, M., Macario, A., and de Macario, E. (1993). Effect of medium composition and sludge removal on the production, composition, and architecture of thermophilic (55 °C) acetate-utilizing granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8):2538–2545.
- Albers, S.-V. and Meyer, B. H. (2011). The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6):414–426.
- Ariesyady, H. D., Ito, T., Yoshiguchi, K., and Okabe, S. (2007). Phylogenetic and functional diversity of propionate-oxidizing bacteria in an anaerobic digester sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(3):673–683.
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., and Weightman, A. J. (2006). New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9):5734–5741.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J.-L., and Patel, B. (1998a). *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., a novel amino acid degrading and sulfate reducing bacterium from an anaerobic dairy wastewater lagoon. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(4):498–504.
- Baena, S., Fardeau, M.-L., Labat, M., Ollivier, B., Thomas, P., Garcia, J.-L., and Patel, B. (1998b). *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe*, 4(5):241–250.

- Baena, S., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Labat, M., Thomas, P., Garcia, J. L., and Patel, B. K. C. (1999). *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3):975–982.
- Balk, M., Weijma, J., and 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):1361–1368.
- Ban, Q., Zhang, L., and Li, J. (2015). Shift of propionate-oxidizing bacteria with HRT decrease in an UASB reactor containing propionate as a sole carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1):274–286.
- Ban, Q., Zhang, L., and Zhang, Y. (2013). Syntrophic propionate degradation response to temperature decrease and microbial community shift in an UASB reactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3):382–389.
- Benomar, S., Ranava, D., Cárdenas, M. L., Trably, E., Rafrafi, Y., Ducret, A., Hamelin, J., Lojou, E., Steyer, J.-P., and Giudici-Ortoni, M.-T. (2015). Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. *Nature communications*, 6.
- Benz, M., Schink, B., and Brune, A. (1998). Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11):4507–4512.
- BGR (2014). Energiestudie 2014 - Reserven, Ressourcen und Verfügbarkeit von Energierohstoffen. http://www.bgr.bund.de/DE/Themen/Energie/Downloads/Energiestudie_2014.pdf?__blob=publicationFile&v=7 (Stand 04.06.2015).
- BMWi (2013). Energie in Deutschland. Trends und Hintergründe zur Energieversorgung. <http://www.bmwi.de/Dateien/Energieportal/PDF/energie-in-deutschland> (Stand 15.06.2015).
- BMWi (2014). Ein gutes Stück Arbeit. Die Energie der Zukunft. Erster Fortschrittsbericht zur Energiewende. <http://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/Publikationen/fortschrittsbericht,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf> (Stand 15.06.2015).

- BMWi (2015a). Energie der Zukunft. Eine Gesamtstrategie für die Energiewende. <http://www.bmwi.de/DE/Themen/Energie/Energiewende/gesamtstrategie.html> (Stand 08.07.2015).
- BMWi (2015b). Energiedaten: Gesamtausgabe Stand: April 2015. <http://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/E/energiestatistiken-grafiken,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf> (Stand 15.06.2015).
- Boone, D. R. and Bryant, M. P. (1980). Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3):626–632.
- Boone, D. R., Johnson, R. L., and Liu, Y. (1989). Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7):1735–1741.
- BP (2014). Statistical review of world energy 2014. <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/Energy-economics/statistical-review-2014/BP-statistical-review-of-world-energy-2014-full-report.pdf> (Stand 04.06.2015).
- Brown, M. E. and Chang, M. C. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19:1–7.
- Bryant, M., Campbell, L., Reddy, C., and Crabill, M. (1977). Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5):1162–1169.
- Buckel, W. and Thauer, R. K. (2013). Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(2):94–113.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., and Singh, R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current opinion in biotechnology*, 22(3):394–400.
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., and Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a

- changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58:216–234.
- Chen, S. and Dong, X. (2005). *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6):2257–2261.
- Chen, S. and He, Q. (2015). Persistence of *Methanosaeta* populations in anaerobic digestion during process instability. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, pages 1–9.
- Chen, S., Liu, X., and Dong, X. (2005). *Syntrophobacter sulfatireducens* sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3):1319–1324.
- Chen, Y., Rößler, B., Zielonka, S., Wonneberger, A.-M., and Lemmer, A. (2014). Effects of organic loading rate on the performance of a pressurized anaerobic filter in two-phase anaerobic digestion. *Energies*, 7(2):736–750.
- Cheng, L., Ding, C., Li, Q., He, Q., Dai, L., and Zhang, H. (2013). DNA-SIP reveals that *Syntrophaceae* play an important role in methanogenic hexadecane degradation. *PloS ONE*, 8(7):e66784.
- Chertkov, O., Sikorski, J., Brambilla, E., Lapidus, A., Copeland, A., Del Rio, T. G., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J.-F., et al. (2010). Complete genome sequence of *Aminobacterium colombiense* type strain (ALA-1^T). *Standards in Genomic Sciences*, 2(3):280.
- Coates, J. D., Bhupathiraju, V. K., Achenbach, L. A., McInerney, M., and Lovley, D. R. (2001). *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2):581–588.
- Coetsier, S. and Cloete, T. E. (2005). Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(4):213–232.
- Conklin, A., Stensel, H. D., and Ferguson, J. (2006). Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research*, pages 486–496.

- Cypionka, H. (2010). *Grundlagen der Mikrobiologie*. Springer-Verlag.
- de Bok, F. A. M., Harmsen, H. J. M., Plugge, C. M., de Vries, M. C., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M., and Stams, A. J. M. (2005). The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4):1697–1703.
- de Bok, F. A. M., Plugge, C. M., and Stams, A. J. M. (2004). Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research*, 38(6):1368–1375.
- de Bok, F. A. M., Stams, A. J. M., Dijkema, C., and Boone, D. R. (2001). Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4):1800–1804.
- Demirel, B. and 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):173–190.
- Deublin, D. and Steinhauser, A. (2008). *Biogas From Waste And Renewable Resource*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Díaz, E. E., Stams, A. J., Amils, R., and Sanz, J. L. (2006). Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7):4942–4949.
- DIW (2007). Klimawandel kostet die deutsche Volkswirtschaft Milliarden. *Wochenbericht*, 74(11):165–170. http://www.diw.de/documents/publikationen/73/diw_01.c.55814.de/07-11-1.pdf (Stand 04.06.2015).
- Dong, X., Plugge, C. M., and Stams, A. J. (1994). Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8):2834–2838.
- Dong, X. and Stams, A. J. (1995). Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation. *Anaerobe*, 1(1):35–39.

- Doolittle, W. F. and Papke, R. T. (2006). Genomics and the bacterial species problem. *Genome biology*, 7(9):116.
- Doong, R.-a. and Schink, B. (2002). Cysteine-mediated reductive dissolution of poorly crystalline Iron(III) oxides by *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Science & Technology*, 36(13):2939–2945.
- Drake, H. L. and Daniel, S. L. (2004). Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Research in Microbiology*, 155(10):869–883.
- Dröge, S., Limper, U., Emtiazi, F., Schönig, I., Pavlus, N., Drzyzga, O., Fischer, U., and König, H. (2005). In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chaffer *Pachnoda marginata*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(2):57–64.
- Dumont, M. G. and Murrell, J. C. (2005). Stable isotope probing—linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6):499–504.
- Dunn, B., Kamath, H., and Tarascon, J.-M. (2011). Electrical energy storage for the grid: a battery of choices. *Science*, 334(6058):928–935.
- Einen, J., Thorseth, I. H., and Øvreås, L. (2008). Enumeration of archaea and bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2):182–187.
- Eirich, L. D., Vogels, G. D., and Wolfe, R. S. (1978). Proposed structure for coenzyme F₄₂₀ from *Methanobacterium*. *Biochemistry*, 17(22):4583–4593.
- Emde, R. and Schink, B. (1990). Oxidation of glycerol, lactate, and propionate by *Propionibacterium freudenreichii* in a poised-potential amperometric culture system. *Archives of Microbiology*, 153(5):506–512.
- European Commission (2014). Member state’s energy dependence: An indicator-based assessment. http://ec.europa.eu/economy_finance/publications/occasional_paper/2014/pdf/ocp196_en.pdf (Stand 04.06.2015).
- Felchner-Zwirello, M., Winter, J., and Gallert, C. (2013). Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20):9193–9205.

- FNR (2012). Sorghumhirsen: Ein Beitrag zur Diversifizierung des Energiepflanzenpektrums. <http://mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/b/r/brosch.hirse-web.pdf> (Stand 16.06.2015).
- FNR (2013a). Biogas. http://mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/b/r/brosch-biogas-2013-web-pdf_1.pdf (Stand 16.06.2015).
- FNR (2013b). Leitfaden Biogas. http://mediathek.fnr.de/media/downloadable/files/samples/l/e/leitfadenbiogas2014_web.pdf (Stand 16.06.2015).
- Fontes, C. M. and Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes: Highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1):655–681.
- Friedrich, M. W. (2006). Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1):59–66.
- G7 (2015). Abschlusserklärung G7-Gipfel 7.-8. Juni 2015. https://www.g7germany.de/Content/DE/_Anlagen/G8_G20/2015-06-08-g7-abschluss-deu.pdf?__blob=publicationFile&v=4 (Stand 16.06.2015).
- Gan, Y., Qiu, Q., Liu, P., Rui, J., and Lu, Y. (2012). Syntrophic oxidation of propionate in rice field soil at 15 and 30 °C under methanogenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14):4923–4932.
- González-García, S., Bacenetti, J., Negri, M., Fiala, M., and Arroja, L. (2013). Comparative environmental performance of three different annual energy crops for biogas production in northern Italy. *Journal of Cleaner Production*, 43:71–83.
- Gonzalez-Gil, G., Lens, P., Van Aelst, A., Van As, H., Versprille, A., and Lettinga, G. (2001). Cluster structure of anaerobic aggregates of an expanded granular sludge bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8):3683–3692.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., et al. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research*, 21(3):494–504.

- Hahn, H., Krautkremer, B., Hartmann, K., and Wachendorf, M. (2014). Review of concepts for a demand-driven biogas supply for flexible power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29:383–393.
- Hania, W. B., Postec, A., Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Erauso, G., Brochier-Armanet, C., Hamdi, M., Ollivier, B., Saint-Laurent, S., Magot, M., et al. (2013). *Mesotoga infera* sp. nov., a mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 8):3003–3008.
- Hao, L., Lü, F., Li, L., Wu, Q., Shao, L., and He, P. (2013). Self-adaption of methane-producing communities to pH disturbance at different acetate concentrations by shifting pathways and population interaction. *Bioresource Technology*, 140:319–327.
- Hao, L., Lü, F., Mazéas, L., Desmond-Le Quéméner, E., Madigou, C., Guenne, A., Shao, L., Bouchez, T., and He, P. (2015). Stable isotope probing of acetate fed anaerobic batch incubations shows a partial resistance of acetoclastic methanogenesis catalyzed by *Methanosarcina* to sudden increase of ammonia level. *Water Research*, 69:90–99.
- Harmsen, H. J., Van Kuijk, B. L., Plugge, C. M., Akkermans, A. D., De Vos, W. M., and Stams, A. J. (1998). *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4):1383–1387.
- Hattori, S., Galushko, A. S., Kamagata, Y., and Schink, B. (2005). Operation of the CO dehydrogenase/acetyl coenzyme A pathway in both acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*. *Journal of Bacteriology*, 187(10):3471–3476.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., and 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):1601–1609.
- Heimann, A., Jakobsen, R., and Blodau, C. (2010). Energetic constraints on H₂-dependent terminal electron accepting processes in anoxic environments: a review of observations and model approaches. *Environmental Science & Technology*, 44(1):24–33.

- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., and Martens, C. S. (2001). Apparent minimum free energy requirements for methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in an anoxic marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 38(1):33–41.
- Huang, W. E., Stoecker, K., Griffiths, R., Newbold, L., Daims, H., Whiteley, A. S., and Wagner, M. (2007). Raman-FISH: combining stable-isotope raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environmental Microbiology*, 9(8):1878–1889.
- IEA (2013). World energy outlook 2013. <http://www.worldenergyoutlook.org/publications/weo-2013/> (Stand 15.06.2015).
- Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., and Sekiguchi, Y. (2007). *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7):1487–1492.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., and Harada, H. (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5):1729–1735.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y.-L., Hugenholtz, P., Kimura, N., Wagner, M., Ohashi, A., and Harada, H. (2006). Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with *Desulfotomaculum* cluster I are widely distributed in methanogenic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3):2080–2091.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Ohashi, A., and 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):3608–3615.
- Ishii, S., Kosaka, T., Hori, K., Hotta, Y., and Watanabe, K. (2005). Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12):7838–7845.

- Jackson, B. E. and McInerney, M. J. (2002). Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Nature*, 415(6870):454–456.
- Juteau, P., Côté, V., Duckett, M.-F., Beaudet, R., Lépine, F., Villemur, R., and Bisailon, J.-G. (2005). *Cryptanaerobacter phenolicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydroxybenzoate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1):245–250.
- Kaden, J., Galushko, A. S., and Schink, B. (2002). Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Archives of Microbiology*, 178(1):53–58.
- Kandler, O. and König, H. (1998). Cell wall polymers in archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(4):305–308.
- Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L. A., van de Vossenberg, J., Schmid, M. C., Webb, R. I., Schouten, S., Fuerst, J. A., Damsté, J. S., Jetten, M. S., et al. (2007). *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(1):39–49.
- Kato, S., Kosaka, T., and Watanabe, K. (2009). Substrate-dependent transcriptomic shifts in *Pelotomaculum thermopropionicum* grown in syntrophic co-culture with *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Microbial biotechnology*, 2(5):575–584.
- Kato, S. and Watanabe, K. (2010). Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia. *Microbes and Environments*, 25(3):145–151.
- Kim, B. H. and Gadd, G. M. (2008). *Bacterial Physiology and Metabolism*. Cambridge University Press.
- Klüber, H. D. and Conrad, R. (1998). Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 25(3):301–318.
- Korbie, D. J. and Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9):1452–1456.
- Kotloski, N. J. and Gralnick, J. A. (2013). Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio*, 4(1):e00553–12.

- Kotsyurbenko, O. R., Glagolev, M. V., Nozhevnikova, A. N., and Conrad, R. (2001). Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*, 38(2-3):153–159.
- Kouzuma, A., Kato, S., and Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in Microbiology*, 6(477):1–8.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3):1289–1297.
- Leigh, J., Mayer, F., and Wolfe, R. (1981). *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacterium. *Archives of Microbiology*, 129(4):275–280.
- Li, J., Ban, Q., Zhang, L., and Jha, A. K. (2012). Syntrophic propionate degradation in anaerobic digestion: a review. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(5):843–850.
- Liamleam, W. and Annachhatre, A. P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, 25(5):452–463.
- Lide, D. R. (2004). *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC Press.
- Liesack, W. and Finster, K. (1994). Phylogenetic analysis of five strains of gram-negative, obligately anaerobic, sulfur-reducing bacteria and description of *Desulfuromusa* gen. nov., including *Desulfuromusa kysingii* sp. nov., *Desulfuromusa bakii* sp. nov., and *Desulfuromusa succinoxidans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4):753–758.
- Limam, R. D., Chouari, R., Mazeas, L., Wu, T.-D., Li, T., Grossin-Debattista, J., Guerquin-Kern, J.-L., Saidi, M., Landoulsi, A., Sghir, A., et al. (2014). Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *Microbiology Open*, 3(2):157–167.
- Liu, Y., Balkwill, D. L., Aldrich, H. C., Drake, G. R., and Boone, D. R. (1999). Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2):545–556.

- Lovley, D. R. (1985). Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6):1530–1531.
- Lovley, D. R. (2012). Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology*, 66:391–409.
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J., and Woodward, J. C. (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382(6590):445–448.
- Lueders, T., Pommerenke, B., and Friedrich, M. W. (2004). Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10):5778–5786.
- Luu, Y.-S. and Ramsay, J. A. (2003). Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2):215–225.
- Lykidis, A., Chen, C.-L., Tringe, S. G., McHardy, A. C., Copeland, A., Kyrpides, N. C., Hugenholtz, P., Macarie, H., Olmos, A., Monroy, O., and Liu, W.-T. (2011). Multiple syntrophic interactions in a terephthalate-degrading methanogenic consortium. *The ISME Journal*, 5(11):122–130.
- Maestrojuán, G. M. and Boone, D. R. (1991). Characterization of *Methanosarcina barkeri* MS^T and 227, *Methanosarcina mazei* S-6^T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761^T. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2):267–274.
- Mahlia, T., Saktisahdan, T., Jannifar, A., Hasan, M., and Matseelar, H. (2014). A review of available methods and development on energy storage; technology update. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33:532–545.
- Manzoor, S., Bongcam-Rudloff, E., Schnürer, A., and Müller, B. (2013). First genome sequence of a syntrophic acetate-oxidizing bacterium, *Tepidanaerobacter acetatoxydans* strain Re1. *Genome Announcements*, 1(1):e00213–12.
- May, T., Koch-Singenstreu, M., Ebling, J., Stantscheff, R., Müller, L., Jacobi, F., Polag, D., Keppler, F., and 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*. DOI 10.1007/s00253-015-6721-z.

- McInerney, M. J. and Bryant, M. P. (1981). Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(2):346–354.
- McInerney, M. J., Bryant, M. P., Hespell, R. B., and Costerton, J. W. (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4):1029–1039.
- McInerney, M. J., Sieber, J. R., and Gunsalus, R. P. (2009). Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6):623–632.
- McInerney, M. J., Struchtemeyer, C. G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A. J., Schink, B., Rohlin, L., and Gunsalus, R. P. (2008). Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1):58–72.
- Morris, B. E., Henneberger, R., Huber, H., and Moissl-Eichinger, C. (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3):384–406.
- Mulat, D. G., Ward, A. J., Adamsen, A. P. S., Voigt, N. V., Nielsen, J. L., and Feilberg, A. (2014). Quantifying contribution of syntrophic acetate oxidation to methane production in thermophilic anaerobic reactors by membrane inlet mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 48(4):2505–2511.
- Müller, B., Manzoor, S., Niazi, A., Bongcam-Rudloff, E., and Schnürer, A. (2015). Genome-guided analysis of physiological capacities of *Tepidanaerobacter acetatolydans* provides insights into environmental adaptations and syntrophic acetate oxidation. *PloS ONE*, 10(3):1–21.
- Müller, B., Sun, L., and Schnürer, A. (2013). First insights into the syntrophic acetate-oxidizing bacteria – a genetic study. *Microbiology Open*, 2(1):35–53.
- Müller, N., Griffin, B. M., Stingl, U., and Schink, B. (2008). Dominant sugar utilizers in sediment of lake constance depend on syntrophic cooperation with methanogenic partner organisms. *Environmental Microbiology*, 10(6):1501–1511.
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J. M., and Plugge, C. M. (2010). Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2(4):489–499.

- Musat, N., Halm, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F., Horreard, F., Amann, R., Jørgensen, B. B., and Kuypers, M. M. (2008). A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46):17861–17866.
- Ni, B.-J., Liu, H., Nie, Y.-Q., Zeng, R. J., Du, G.-C., Chen, J., and Yu, H.-Q. (2011). Coupling glucose fermentation and homoacetogenesis for elevated acetate production: experimental and mathematical approaches. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(2):345–353.
- Nilsen, R. K., Torsvik, T., and Lien, T. (1996). *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot north sea oil reservoir. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(2):397–402.
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S. G., Woyke, T., and Liu, W.-T. (2014). Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *The ISME Journal*.
- Noll, M., Klose, M., and Conrad, R. (2010). Effect of temperature change on the composition of the bacterial and archaeal community potentially involved in the turnover of acetate and propionate in methanogenic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2):215–225.
- Nüsslein, B., Chin, K.-J., Eckert, W., and Conrad, R. (2001). Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical lake kinneret (Israel). *Environmental Microbiology*, 3(7):460–470.
- Oude Elferink, S. J. W. H., Visser, A., Hulshoff Pol, L. W., and Stams, A. J. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2-3):119–136.
- Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Rivière, D., Ganesan, A., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G. N., Médigue, C., Weissenbach, J., and Le Paslier, D. (2008). " *Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans": Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *Journal of Bacteriology*, 190(7):2572–2579.
- Plugge, C. M., Balk, M., and Stams, A. J. (2002). *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. *thermosyntrophicum* subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionate-

- oxidizing, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2):391–399.
- Plugge, C. M., Scholten, J. C., Culley, D. E., Nie, L., Brockman, F. J., and Zhang, W. (2010). Global transcriptomics analysis of the *Desulfovibrio vulgaris* change from syntrophic growth with *Methanosarcina barkeri* to sulfidogenic metabolism. *Microbiology*, 156(9):2746–2756.
- Radajewski, S., McDonald, I. R., and Murrell, J. C. (2003). Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3):296–302.
- Rossello-Mora, R. and Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1):39–67.
- Rotaru, A.-E., Shrestha, P. M., Liu, F., Shrestha, M., Shrestha, D., Embree, M., Zengler, K., Wardman, C., Nevin, K. P., and Lovley, D. R. (2014). A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy & Environmental Science*, 7(1):408–415.
- Roy, R. and Conrad, R. (1999). Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(1):49–61.
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30):13172–13191.
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R. A., Palva, A., and de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of microbiological methods*, 81(2):127–134.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2):262–280.
- Schink, B. (2002). Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4):257–261.

- Schink, B. and Stams, A. (2013). Syntrophism among prokaryotes. In Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., editors, *The Prokaryotes*, pages 471–493. Springer Berlin Heidelberg.
- Schirawski, J. and Uden, G. (1998). Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *European Journal of Biochemistry*, 257(1):210–215.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, 36(4):407.
- Schmidt, J. E. and Ahring, B. K. (1993). Effects of hydrogen and formate on the degradation of propionate and butyrate in thermophilic granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8):2546–2551.
- Schnürer, A. and Nordberg, A. (2008). Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Science and Technology*, 57(5):735–740.
- Schnürer, A., Schink, B., and 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):1145–1152.
- Schoepp-Cothenet, B., van Lis, R., Atteia, A., Baymann, F., Capowiez, L., Ducluzeau, A.-L., Duval, S., ten Brink, F., Russell, M. J., and Nitschke, W. (2013). On the universal core of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(2):79–93.
- Scholten, J. C. and Conrad, R. (2000). Energetics of syntrophic propionate oxidation in defined batch and chemostat cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7):2934–2942.
- Seyfarth, K. (2012). Mikrobiologie der Fermentation in NawaRo-Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung des Abbaus von Propionsäure. *Dissertation*. Mainz.
- Shimoyama, T., Kato, S., Ishii, S., and Watanabe, K. (2009). Flagellum mediates symbiosis. *Science*, 323(5921):1574–1574.

- Sieber, J. R., McInerney, M. J., and Gunsalus, R. P. (2012). Genomic insights into syntrophy: The paradigm for anaerobic metabolic cooperation. *Annual Review of Microbiology*, 66(1):429–452. PMID: 22803797.
- Siriwongrungson, V., Zeng, R. J., and Angelidaki, I. (2007). Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Research*, 41(18):4204–4210.
- Solomon, S., Plattner, G.-K., Knutti, R., and Friedlingstein, P. (2009). Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6):1704–1709.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4):846–849.
- Stams, A. J. M. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3):271–294.
- Stams, A. J. M., De Bok, F. A. M., Plugge, C. M., Eekert, V., Miriam, H. A., Dolfing, J., and Schraa, G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 8(3):371–382.
- Stams, A. J. M., Grolle, K. C. F., Frijters, C. T. M., and Van Lier, J. B. (1992). Enrichment of thermophilic propionate-oxidizing bacteria in syntrophy with *Methanobacterium thermoautotrophicum* or *Methanobacterium thermoformicicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1):346–352.
- Stams, A. J. M. and Plugge, C. M. (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, pages 568–577.
- Stams, A. J. M., Van Dijk, J. B., Dijkema, C., and Plugge, C. M. (1993). Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4):1114–1119.
- Stantscheff, R. (2013). Isolierung, Charakterisierung und Nachweis methanogener Archaea aus laufenden Praxis-NawaRo-Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Methanobacterium*. *Dissertation*.
- Tanaka, K., Stackebrandt, E., Tohyama, S., and Eguchi, T. (2000). *Desulfovirga adipica* gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, gram-negative, sulfate-reducing

- bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2):639–644.
- Tang, C.-J., Zheng, P., Zhang, L., Chen, J.-W., Mahmood, Q., Chen, X.-G., Hu, B.-L., Wang, C.-H., and Yu, Y. (2010). Enrichment features of anammox consortia from methanogenic granules loaded with high organic and methanol contents. *Chemosphere*, 79(6):613–619.
- Tasaki, M., Kamagata, Y., Nakamura, K., and Mikami, E. (1991). Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 155(4):348–352.
- Thauer, R., Jungermann, K., and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1):100–180.
- Tourova, T. (2003). Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses. *Microbiology*, 72(4):389–402.
- Tugtas, A. and Pavlostathis, S. (2008). Inhibitory effects of nitrate reduction on methanogenesis in the presence of different electron donors. *Water Science and Technology*, 57(5):693–698.
- Van Kuijk, B. L., Schlösser, E., and Stams, A. J. (1998). Investigation of the fumarate metabolism of the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *Archives of Microbiology*, 169(4):346–352.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Ho, D. P., Batstone, D. J., and Tyson, G. W. (2014). Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, 27:55–64.
- von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W., and Göbel, U. B. (1999). Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1):283–286.
- Wagner, M., Nielsen, P. H., Loy, A., Nielsen, J. L., and Daims, H. (2006). Linking microbial community structure with function: fluorescence *in situ* hybridization-microautoradiography and isotope arrays. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1):83–91.

- Wallrabenstein, C., Hauschild, E., and Schink, B. (1995). *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. *Archives of Microbiology*, 164(5):346–352.
- Wang, G. C. and Wang, Y. (1996). The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology*, 142(5):1107–1114.
- Warikoo, V., McInerney, M. J., Robinson, J. A., and Suffita, J. M. (1996). Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation by syntrophic consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1):26–32.
- Warthmann, R., Cypionka, H., and Pfennig, N. (1992). Photoproduction of H₂ from acetate by syntrophic cocultures of green sulfur bacteria and sulfur-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, 157(4):343–348.
- Westerholm, M., Levén, L., and Schnürer, A. (2012). Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21):7619–7625.
- Westerholm, M., Roos, S., and 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):100–104.
- Westerholm, M., Roos, S., and 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):260–266.
- Widdel, F. and Pfennig, N. (1982). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology*, 131(4):360–365.
- Wright, A.-D. G. and Pimm, C. (2003). Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16s riboprinting. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2):337–349.
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., and Noguera, D. R. (2012). DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3):717–725.

- Ye, R., Jin, Q., Bohannan, B., Keller, J. K., and Bridgham, S. D. (2014). Homoacetogenesis: A potentially underappreciated carbon pathway in peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 68:385–391.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and 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):670–679.
- Zegada-Lizarazu, W. and Monti, A. (2011). Energy crops in rotation. A review. *Biomass and Bioenergy*, 35(1):12–25.
- Zindel, U., Freudenberg, W., Rieth, M., Andreesen, J., Schnell, J., and Widdel, F. (1988). *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. *Archives of Microbiology*, 150(3):254–266.
- Zinder, S. (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *American Society for Microbiology News*, 50(7):294–298.

7 Anhang

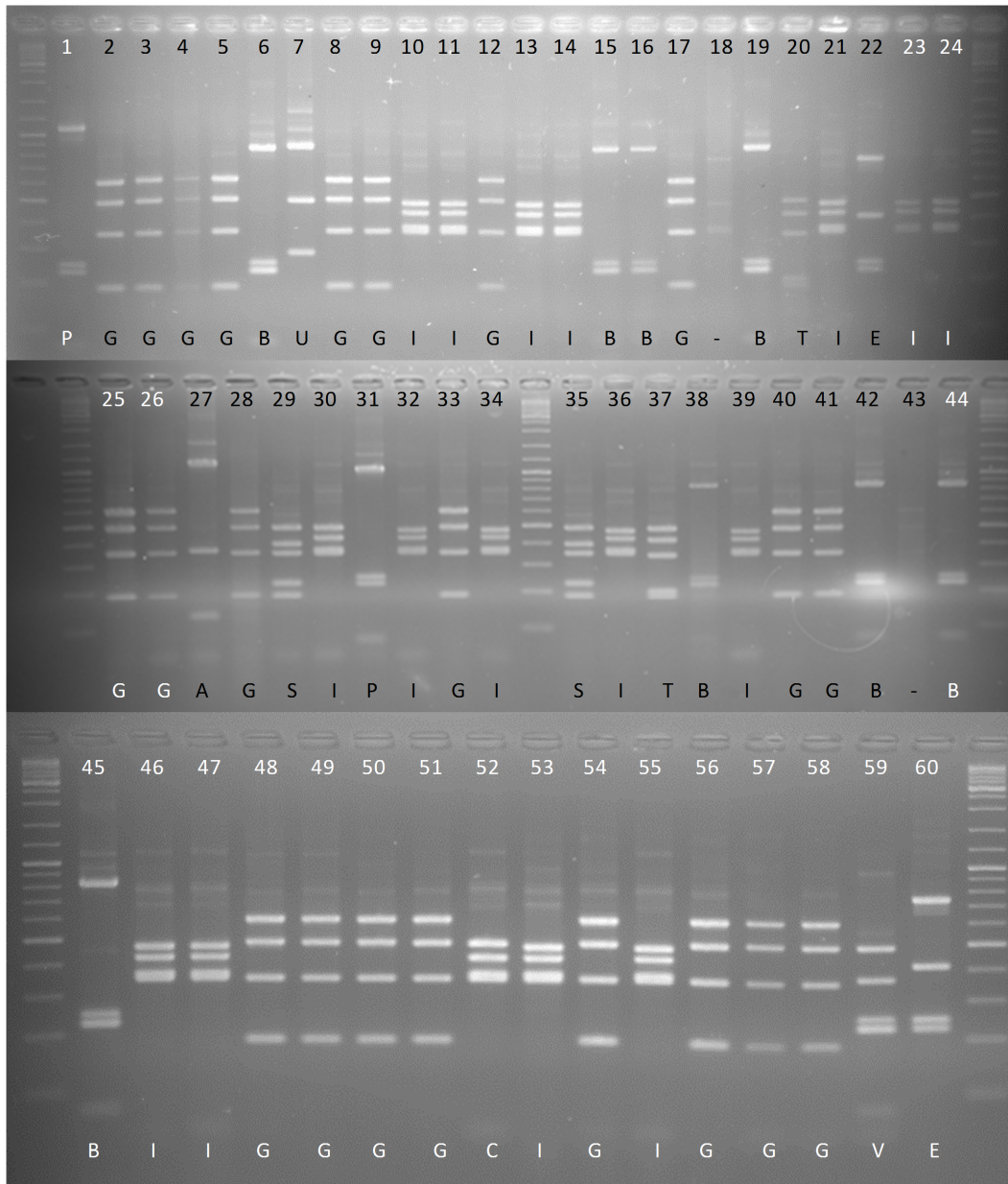


Abbildung 41: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Ap1).**
 Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

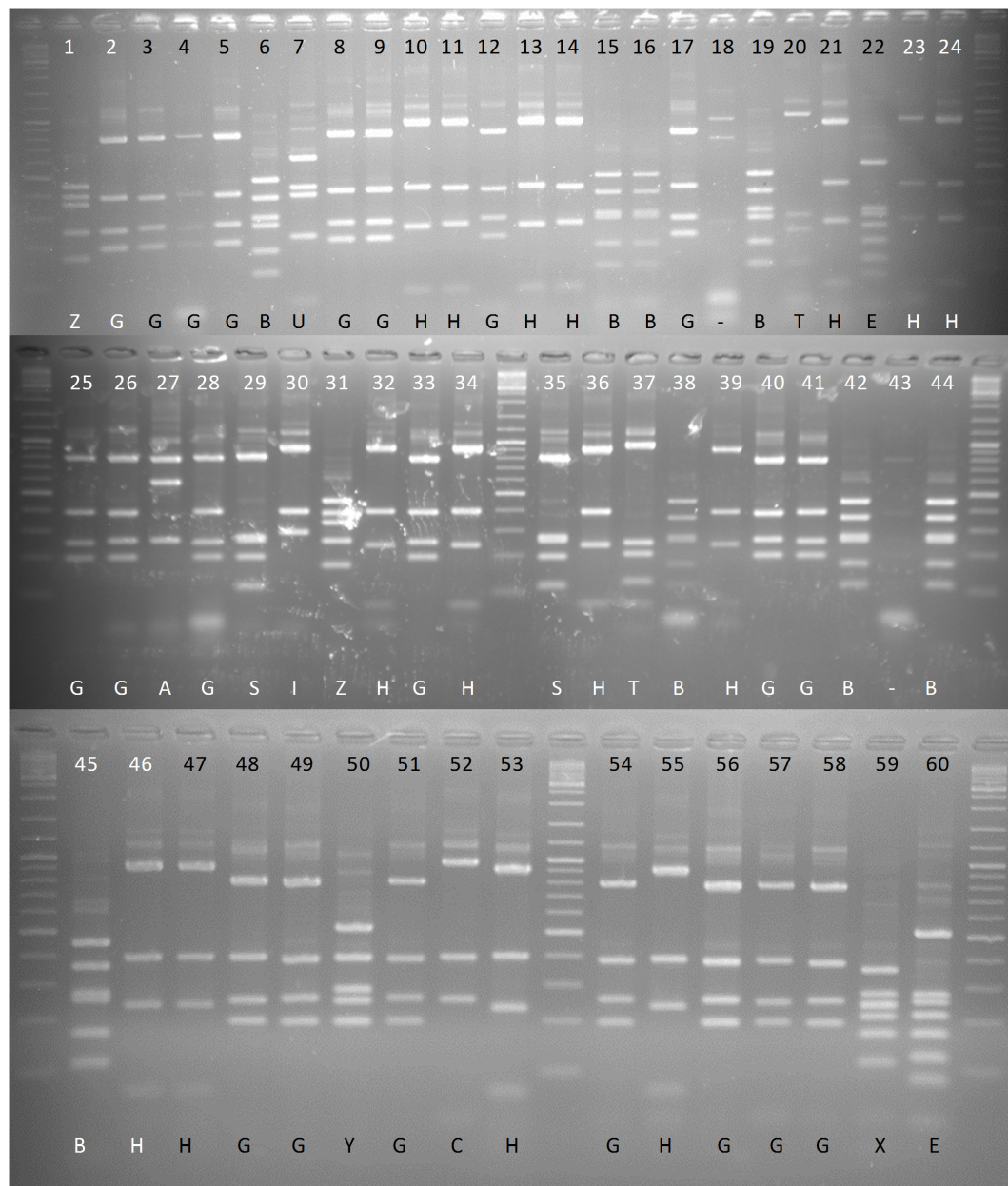


Abbildung 42: **Hinfi-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Ap1).**
 Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

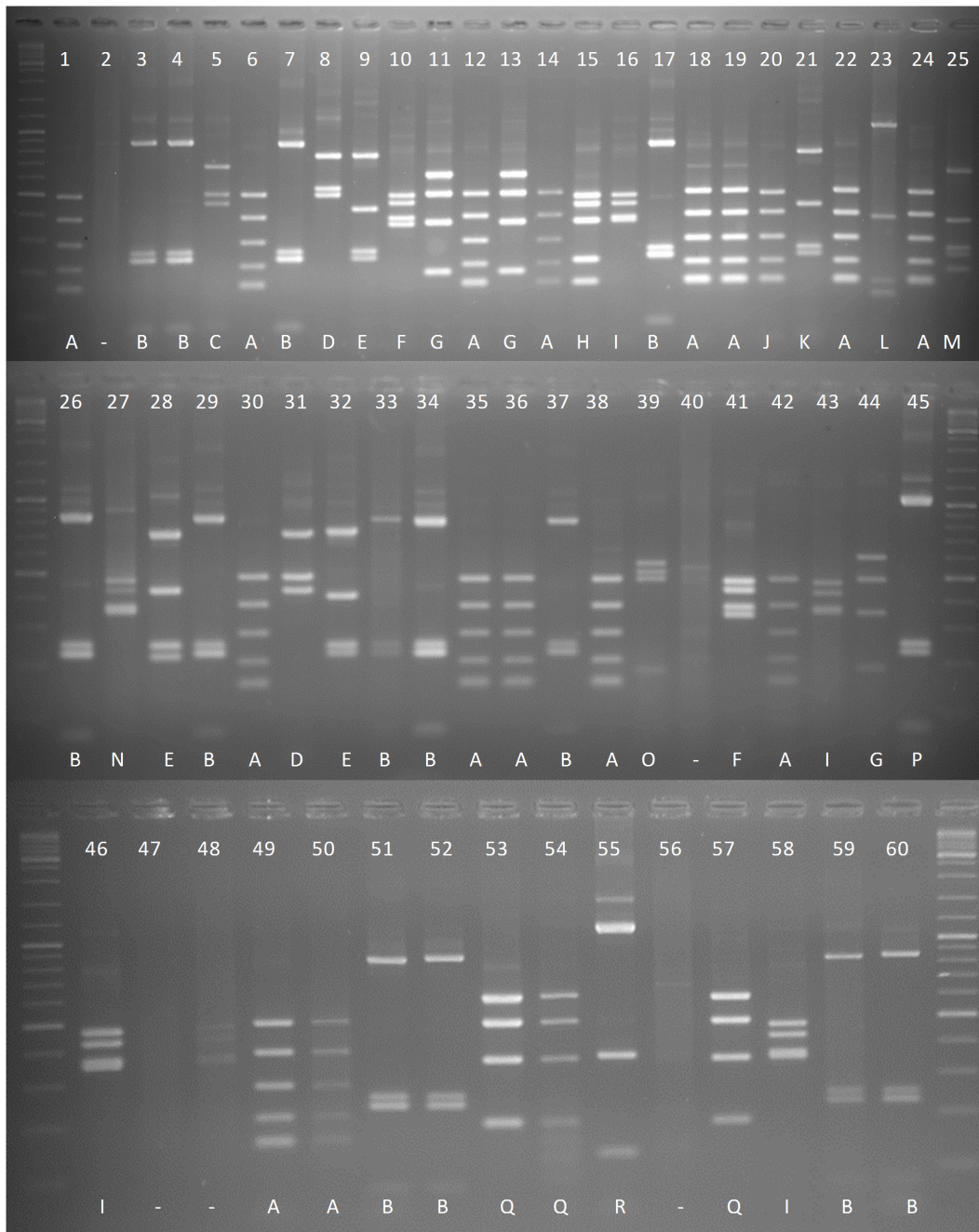


Abbildung 43: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Ap2).**
 Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

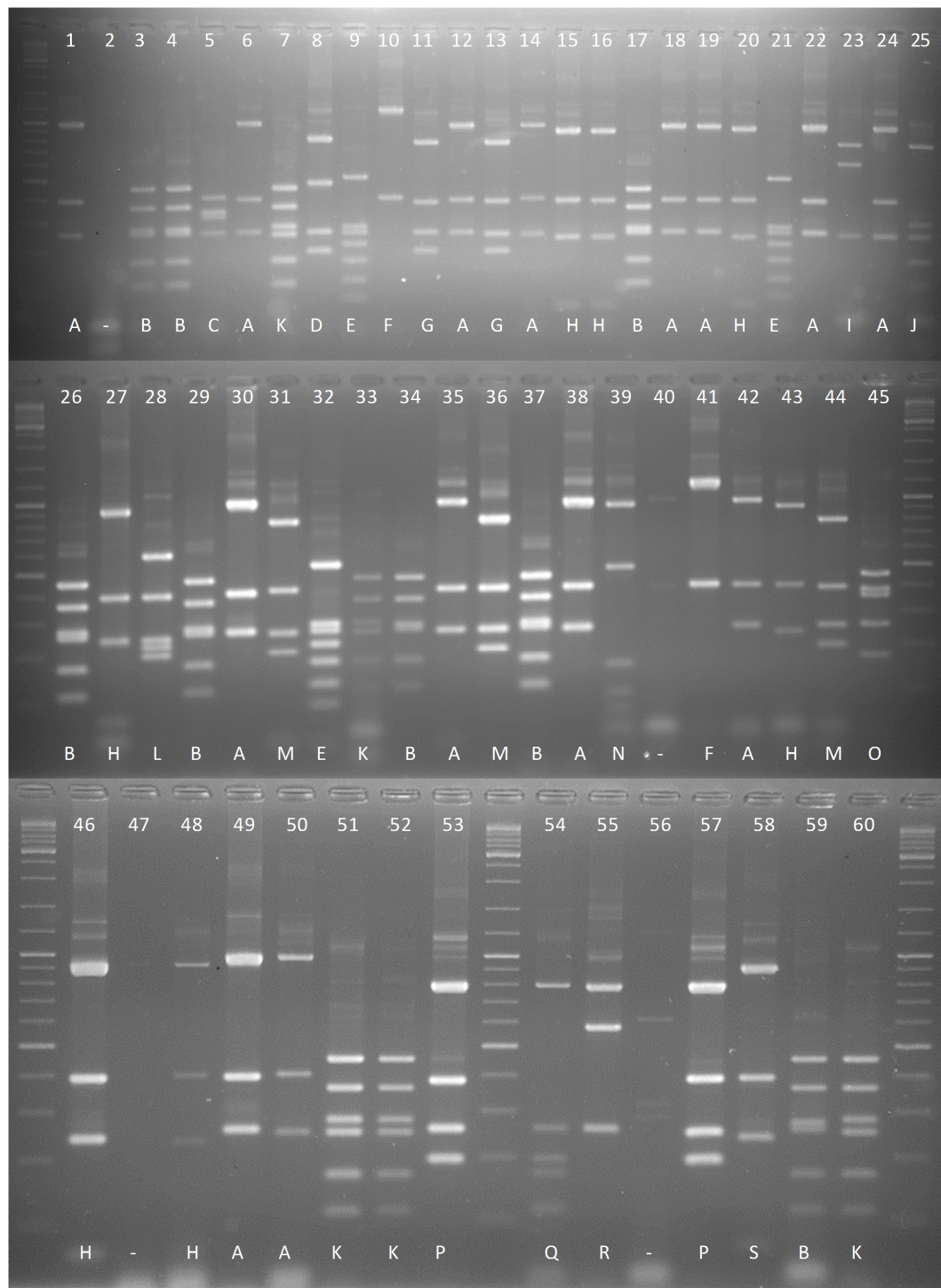


Abbildung 44: **Hinfl-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Ap2).**
 Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

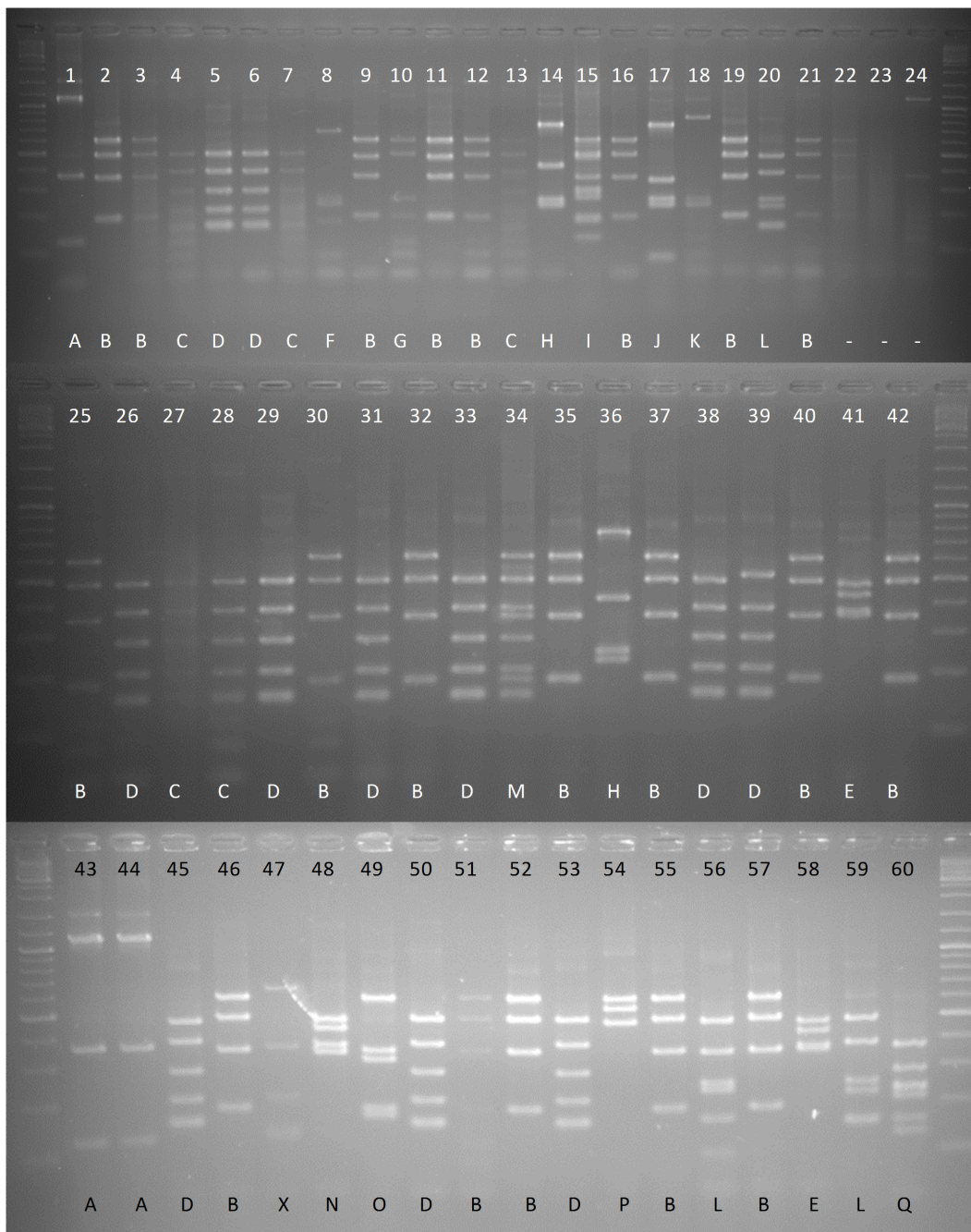


Abbildung 45: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Ap3).**
 Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

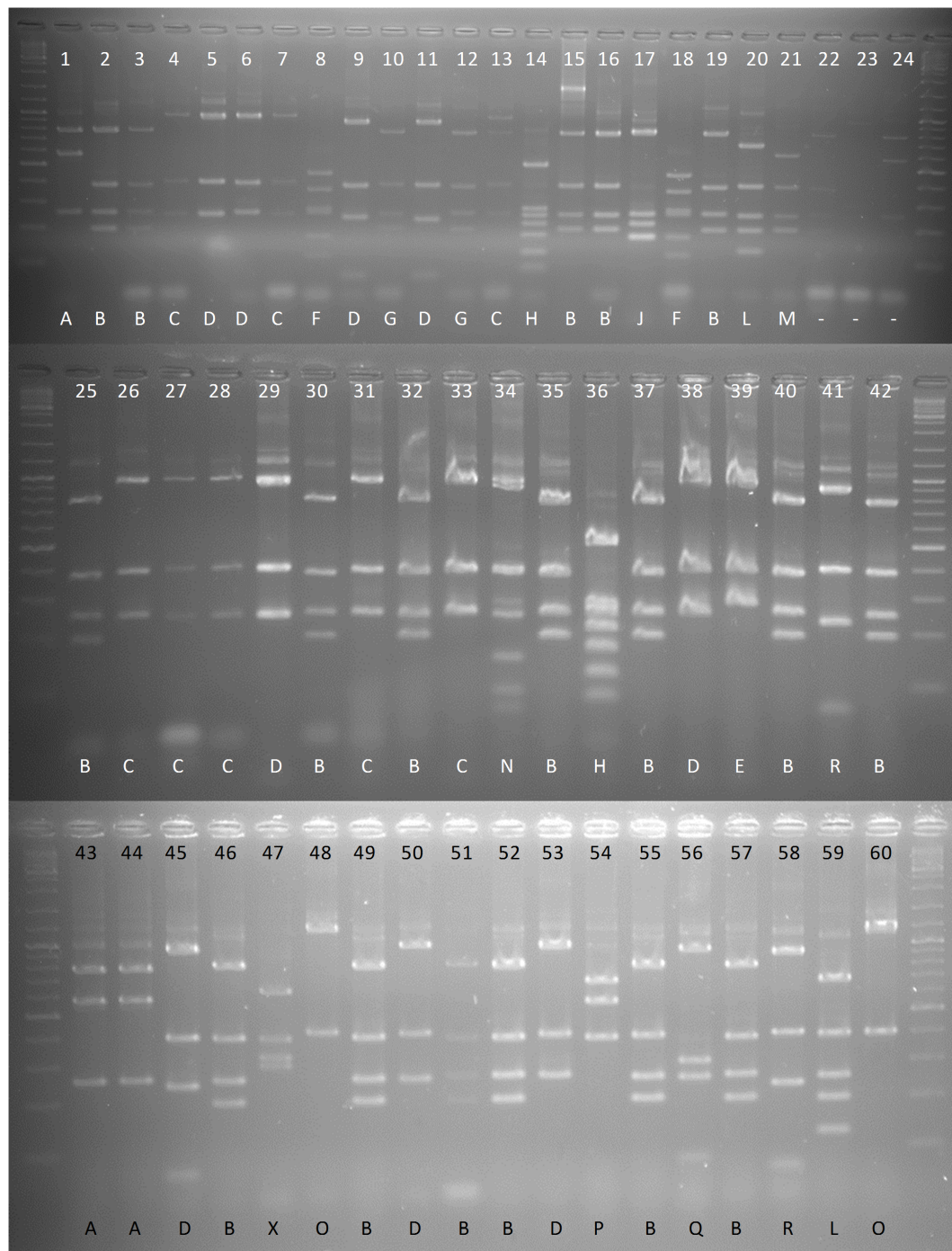


Abbildung 46: **Hinf**I-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Ap3). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

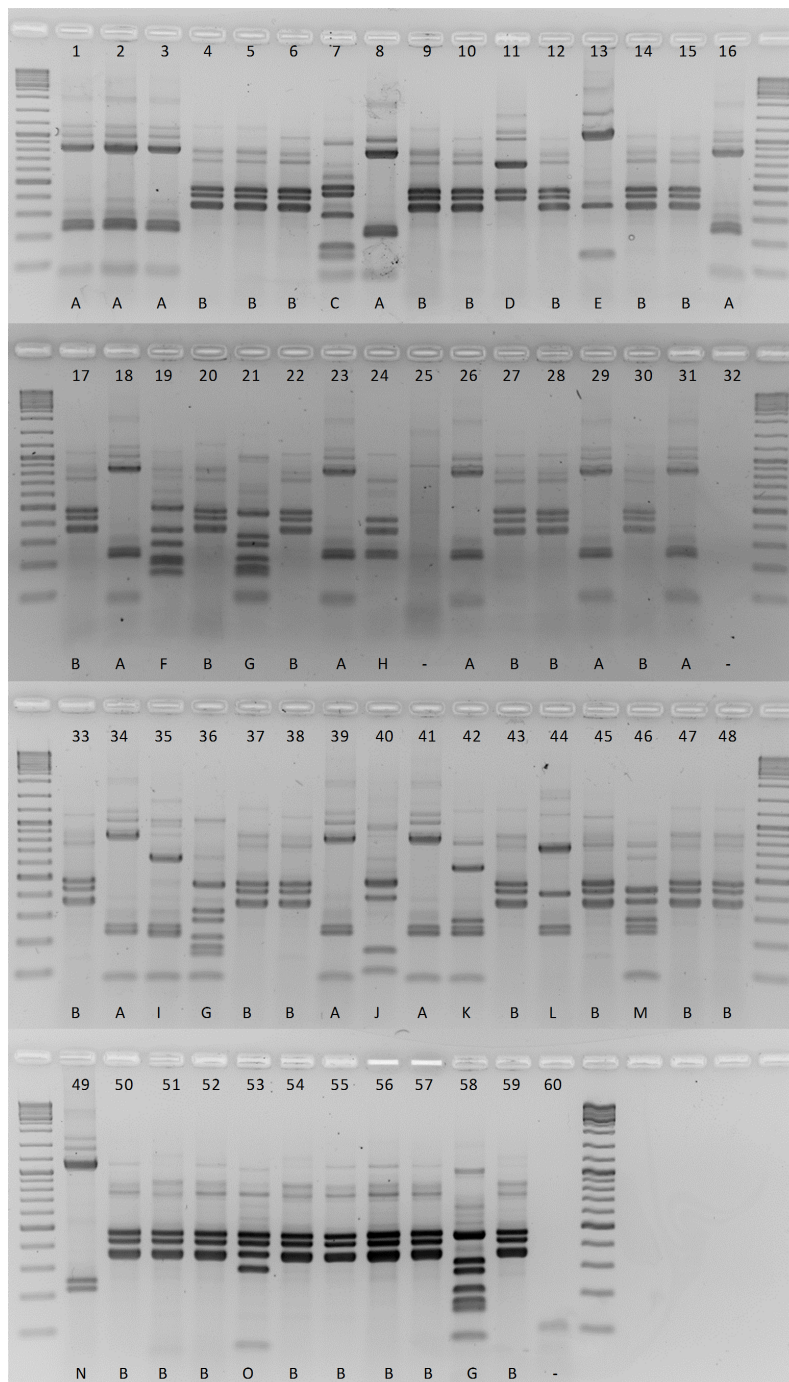


Abbildung 47: **HhaI**-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe G1). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

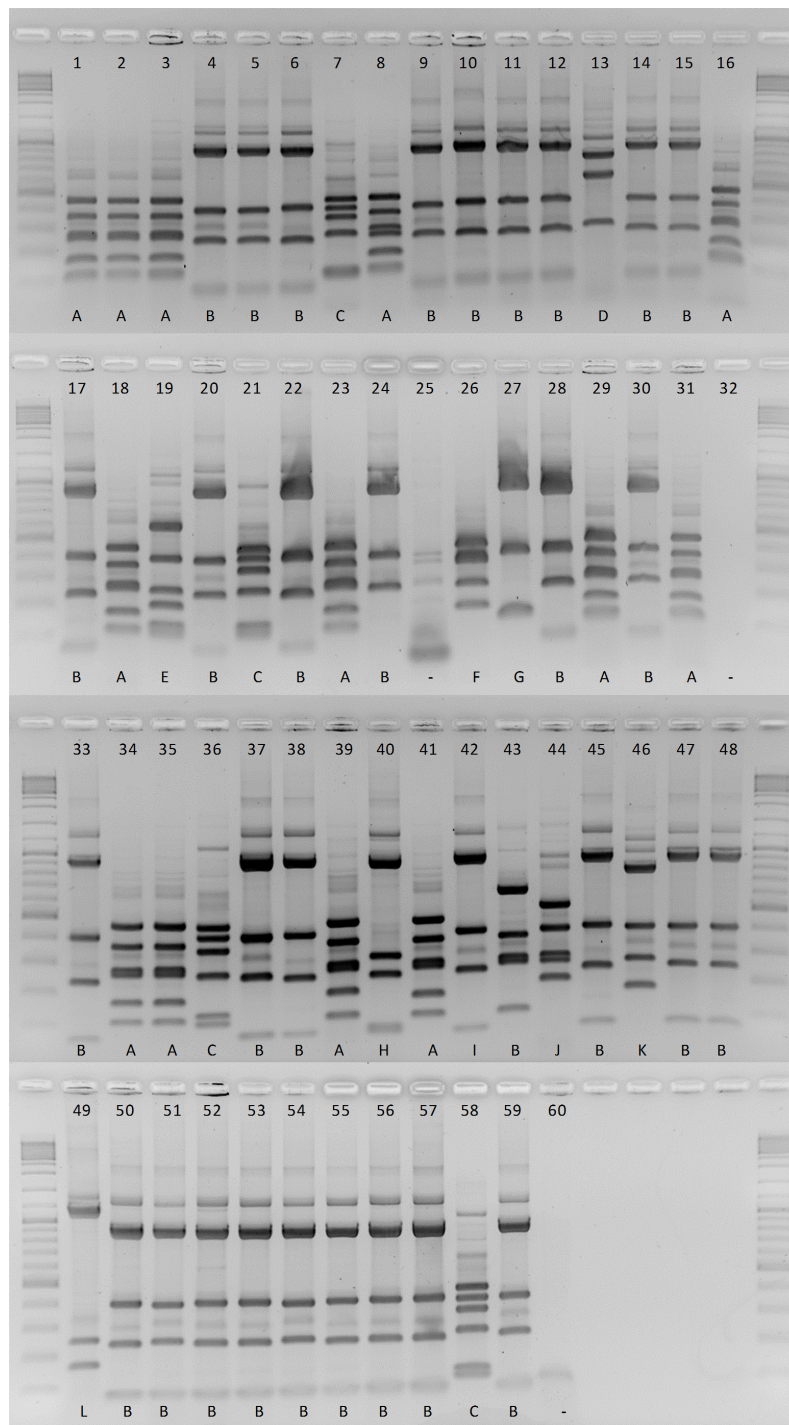


Abbildung 48: **Hinf**I-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe G1). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

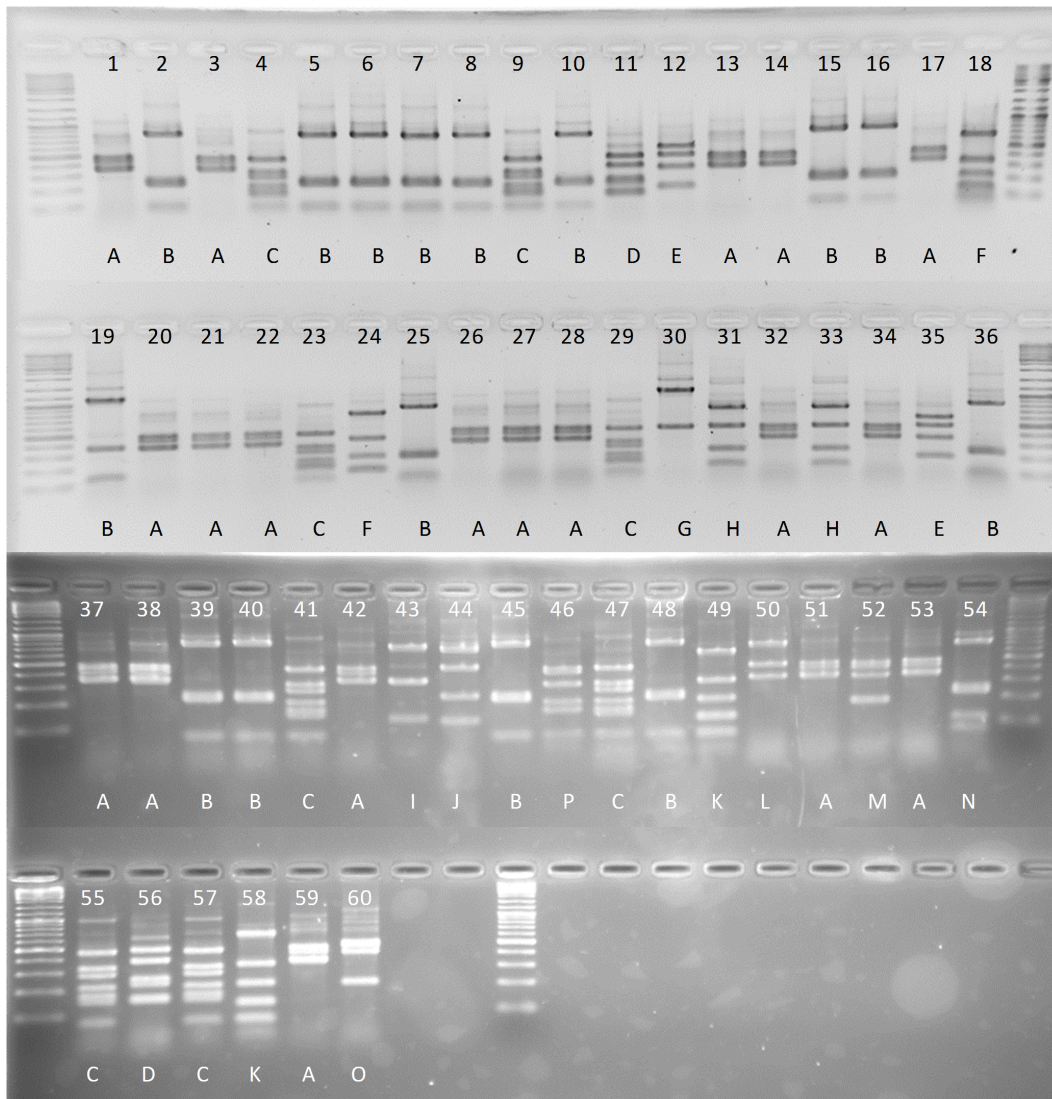


Abbildung 49: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe G2).** Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

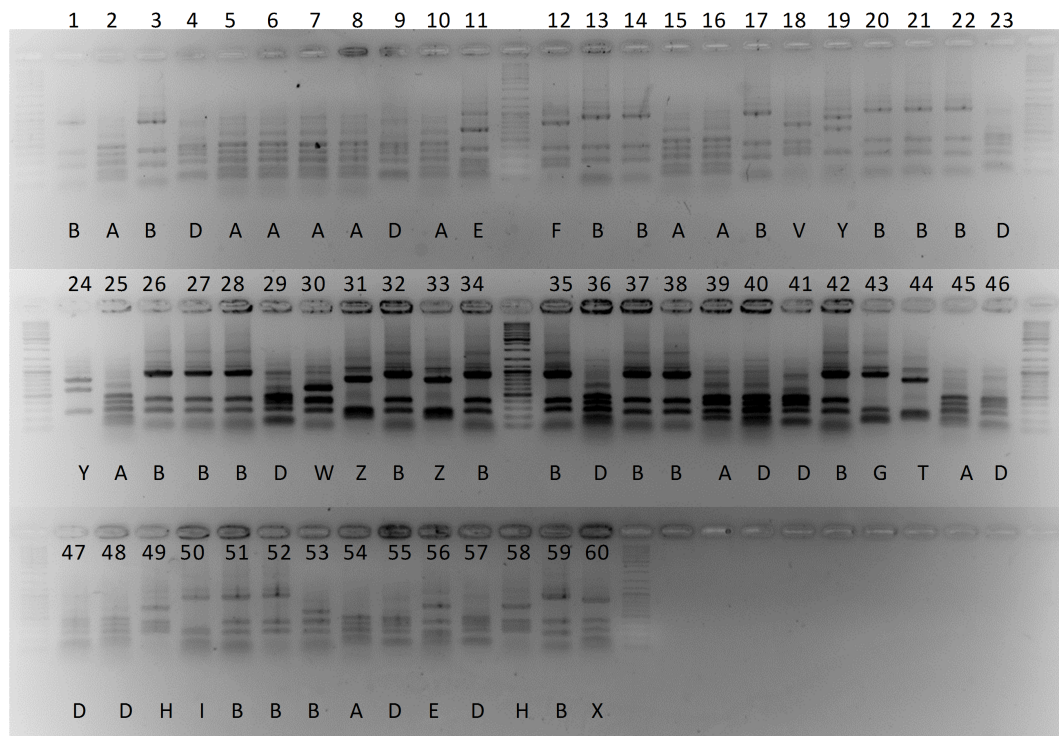


Abbildung 50: **Hinfi-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe G2).** Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

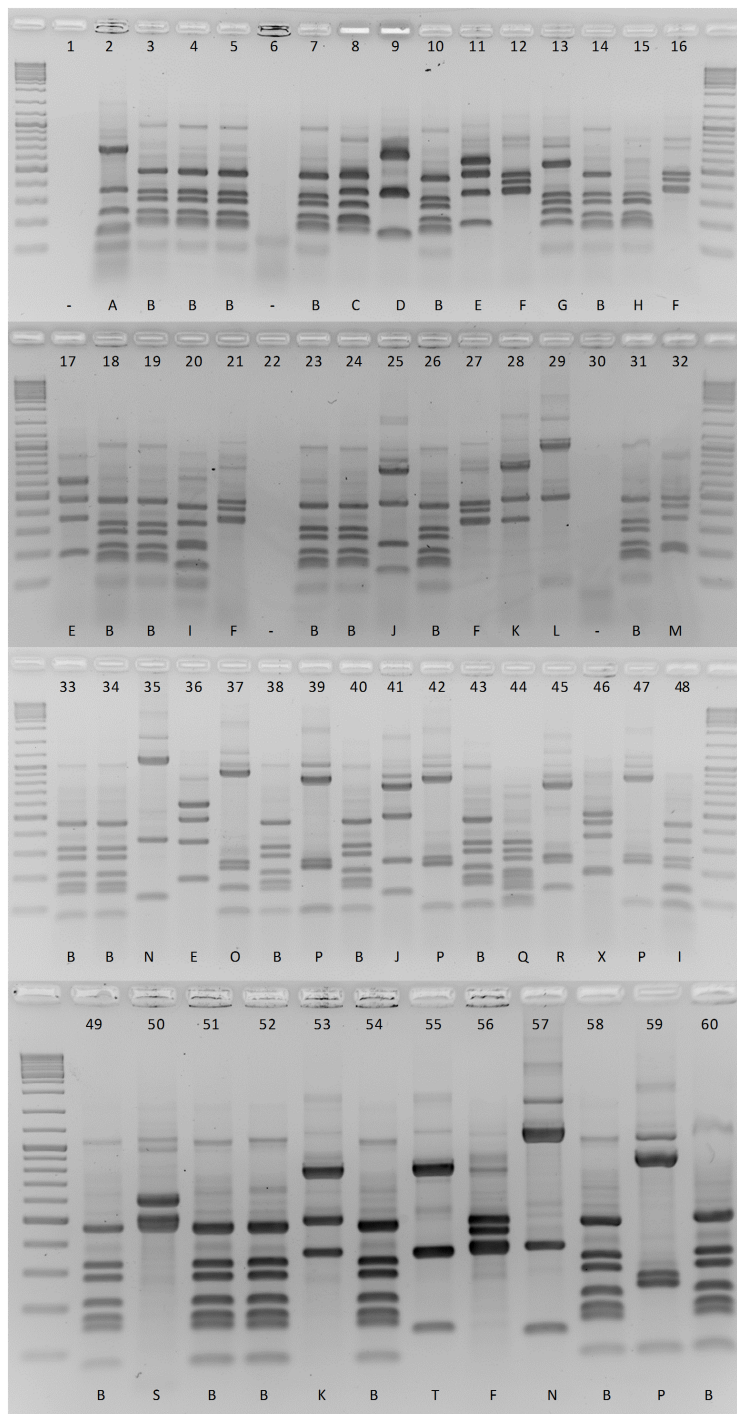


Abbildung 51: **HhaI**-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe G3). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

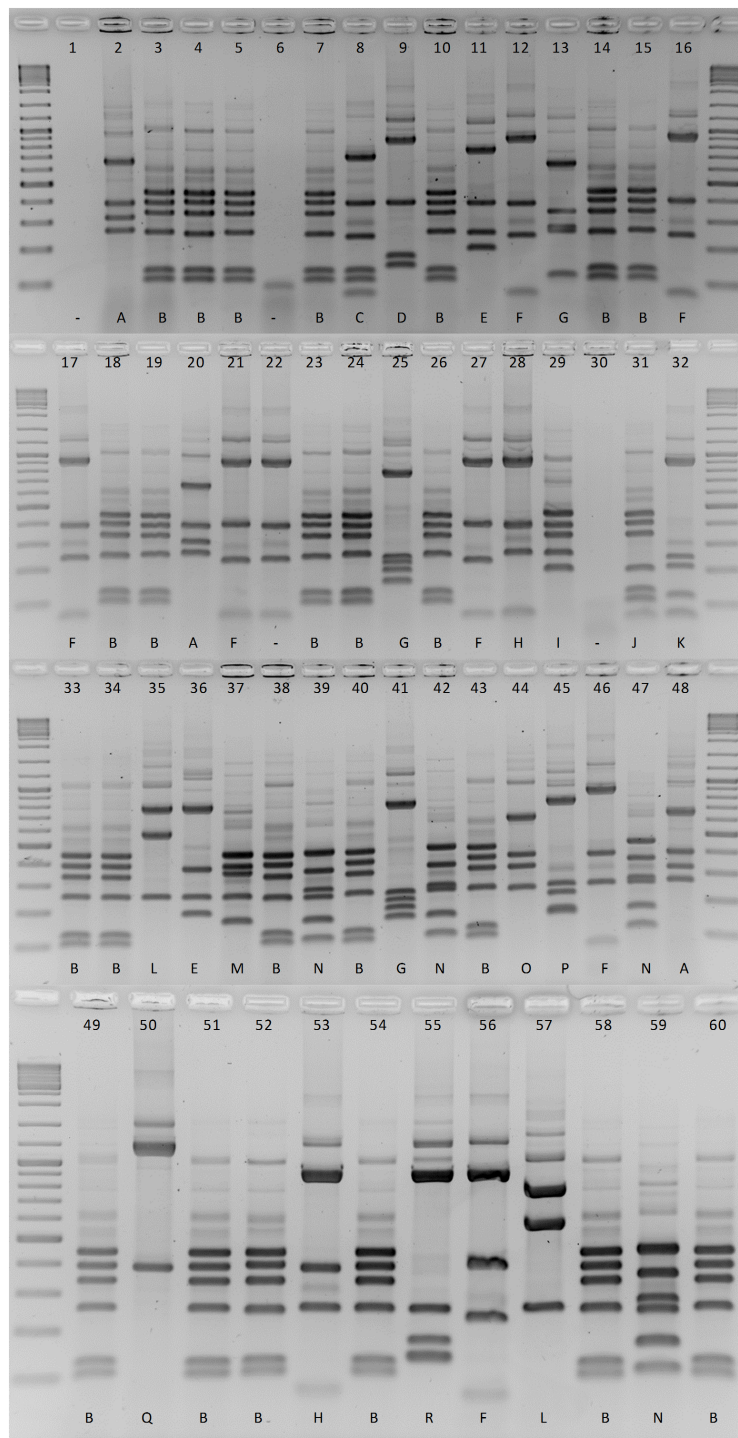


Abbildung 52: **Hinfi**-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe G3). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

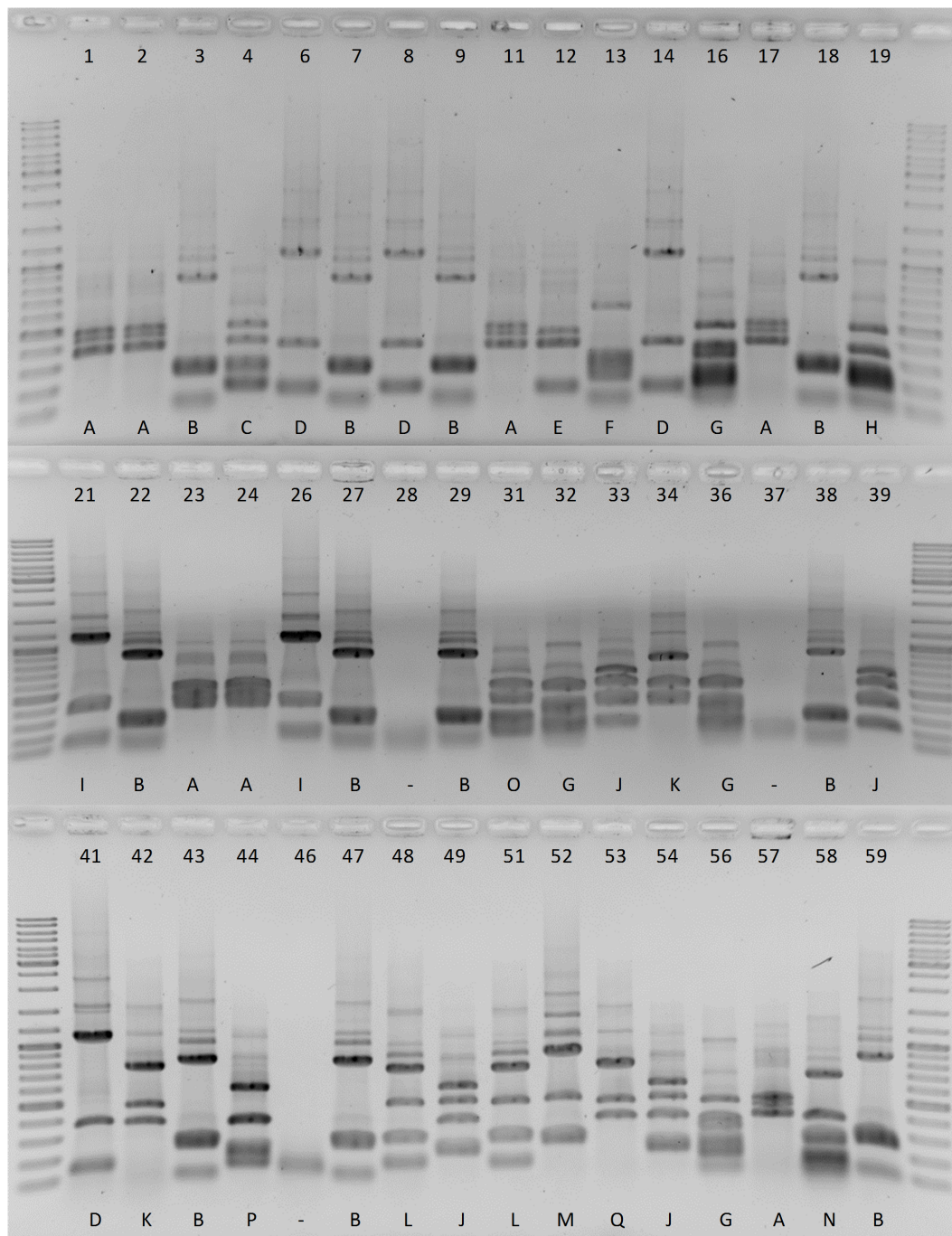


Abbildung 53: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe N1).** Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

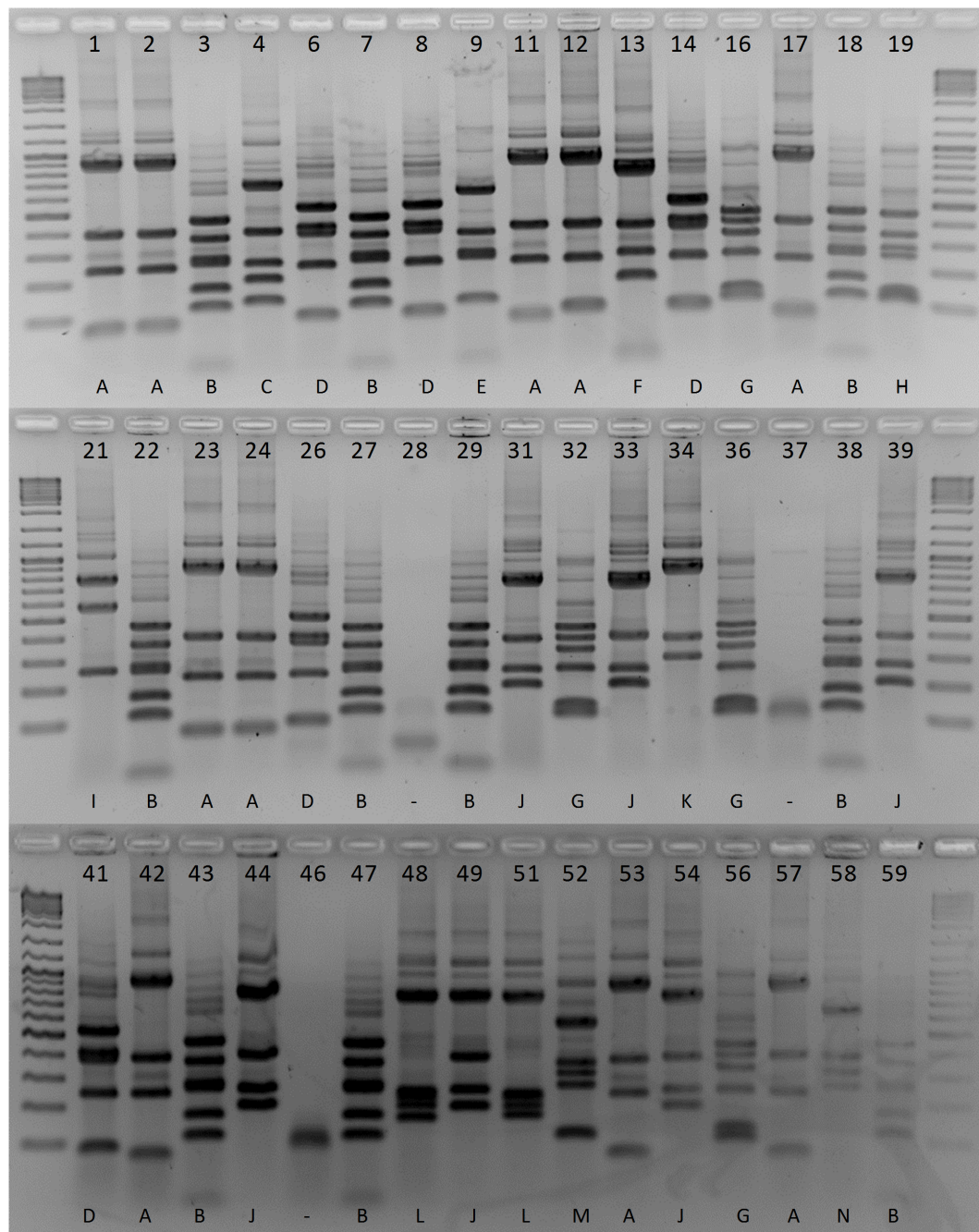


Abbildung 54: **Hinf**I-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe N1). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

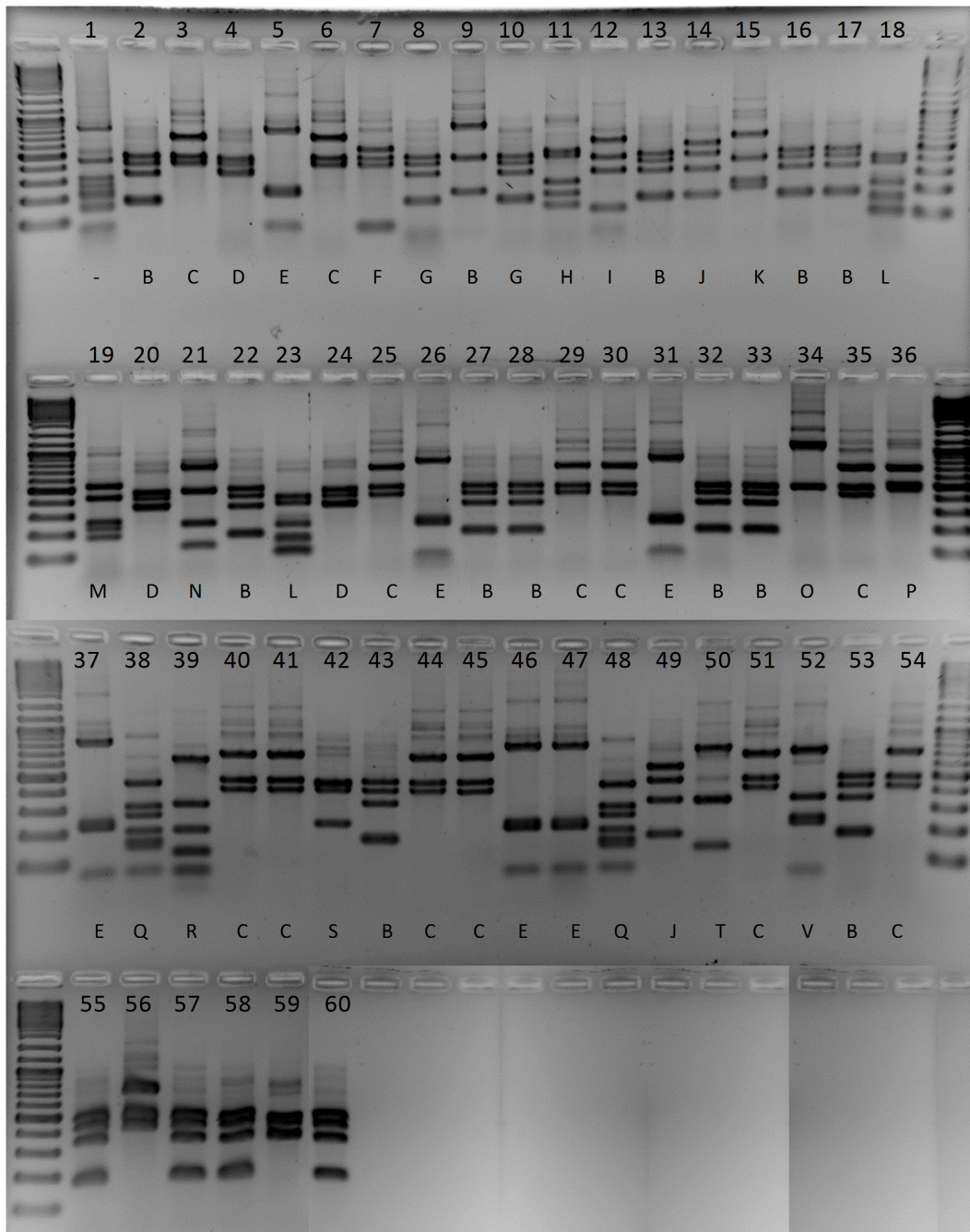


Abbildung 55: **HhaI**-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe N2). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

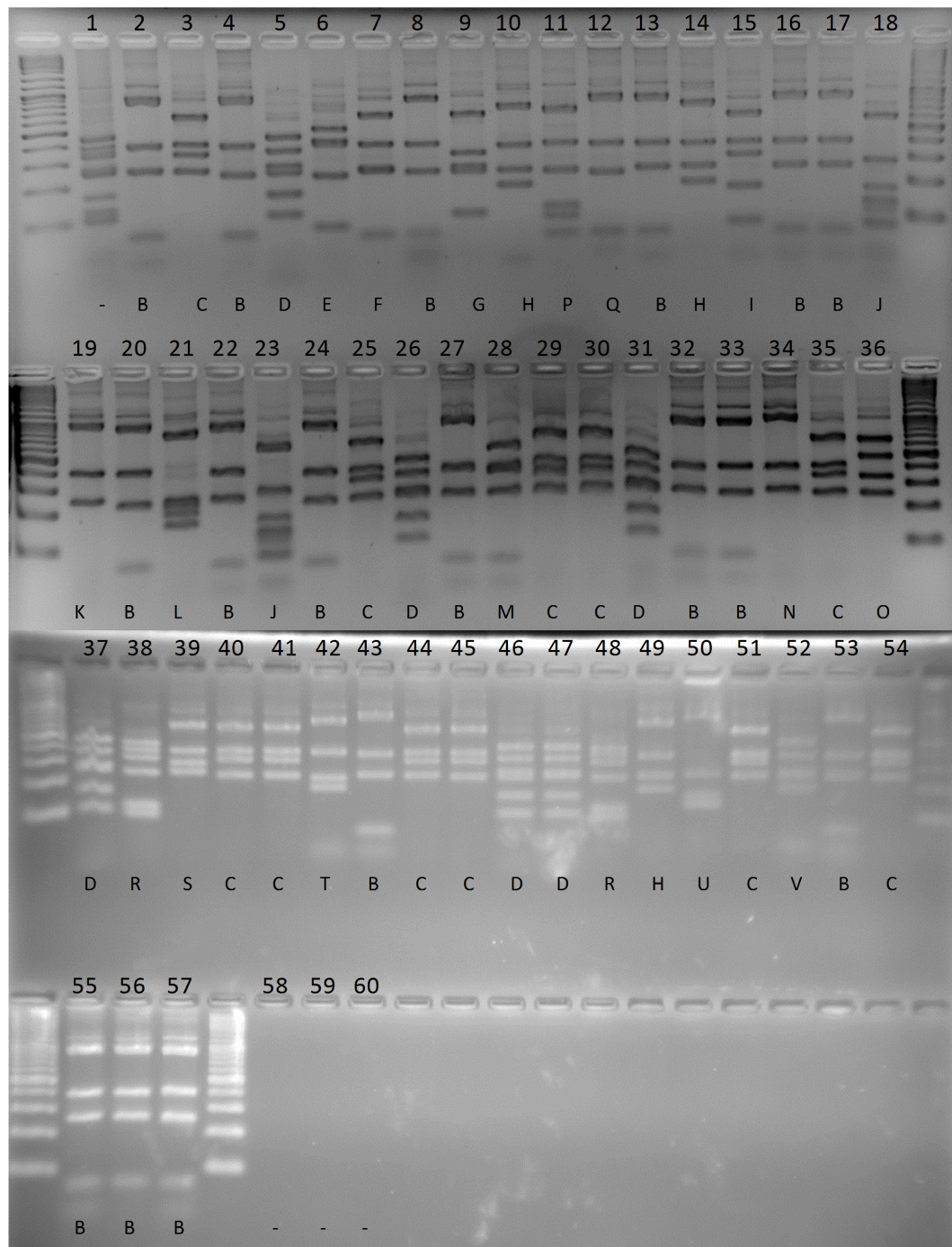


Abbildung 56: **Hin**I-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe N2). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

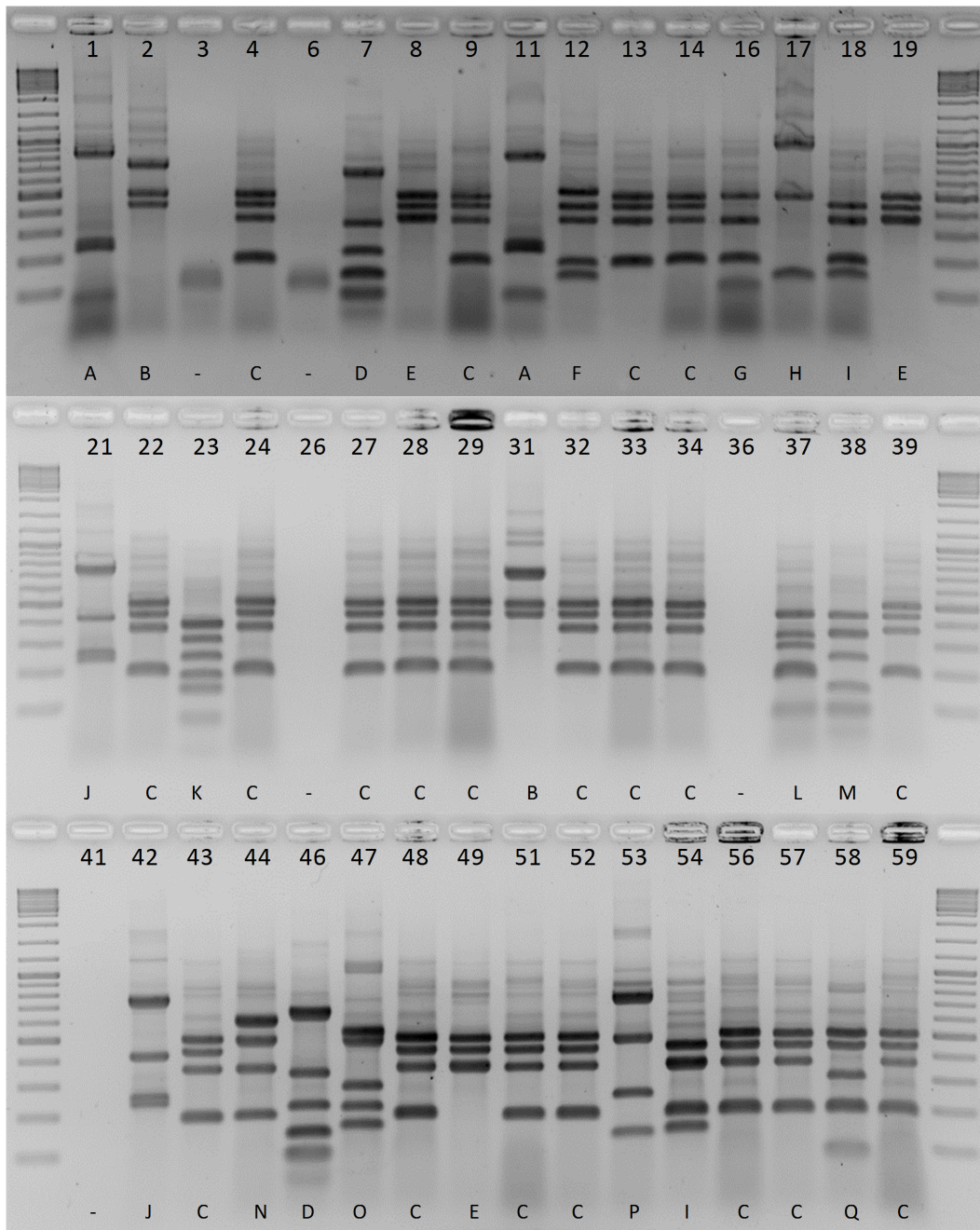


Abbildung 57: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe N3).** Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

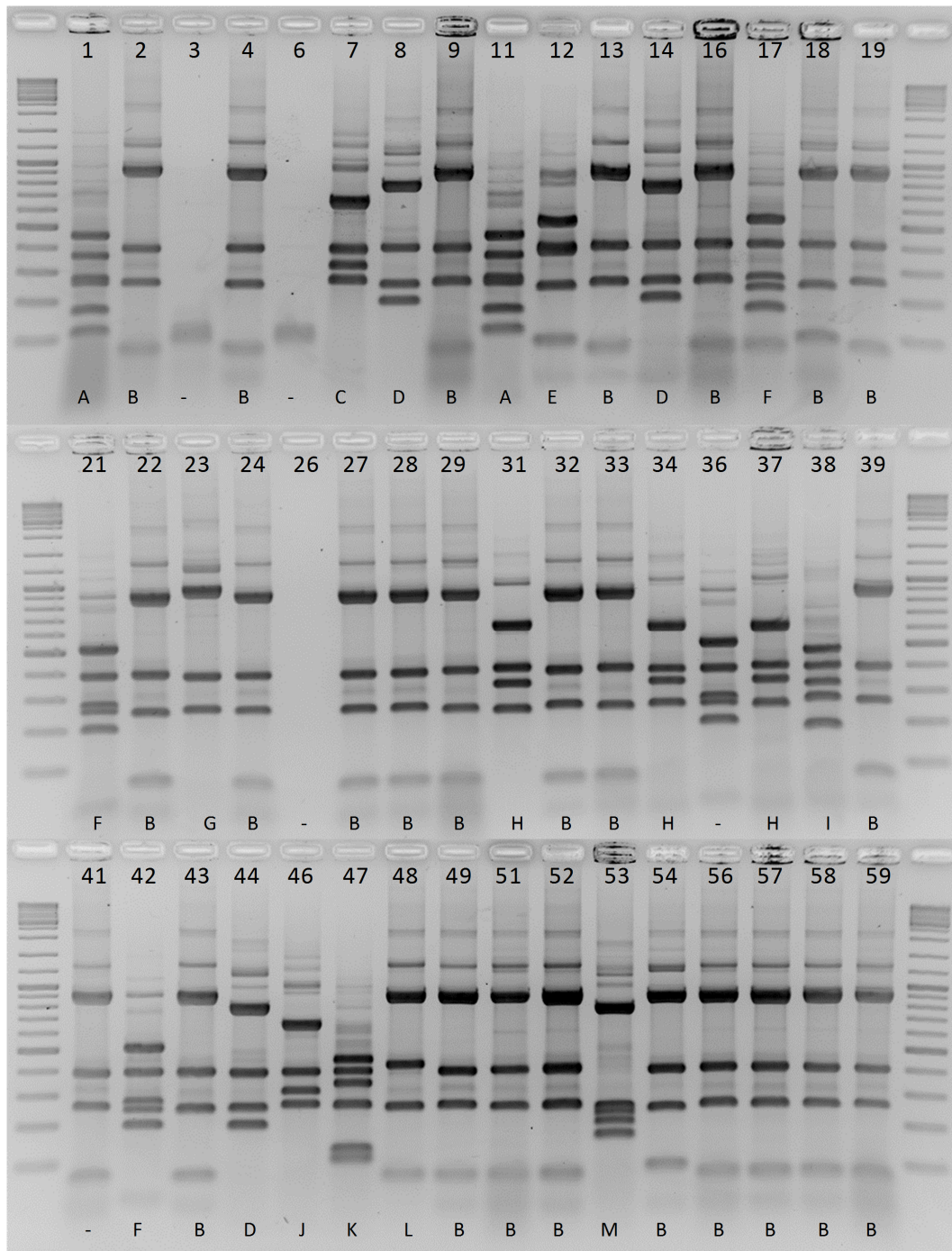


Abbildung 58: **Hinf**I-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe N3). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

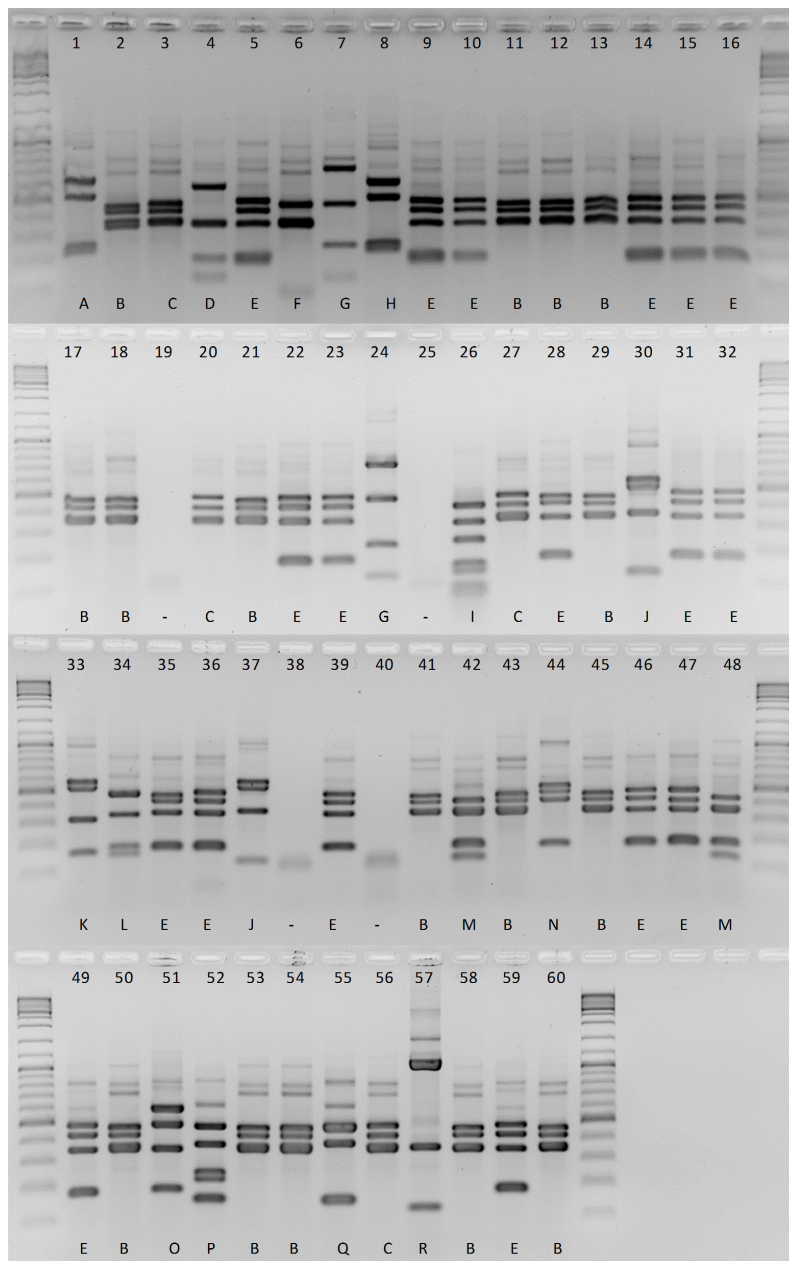


Abbildung 59: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Wp1).** Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

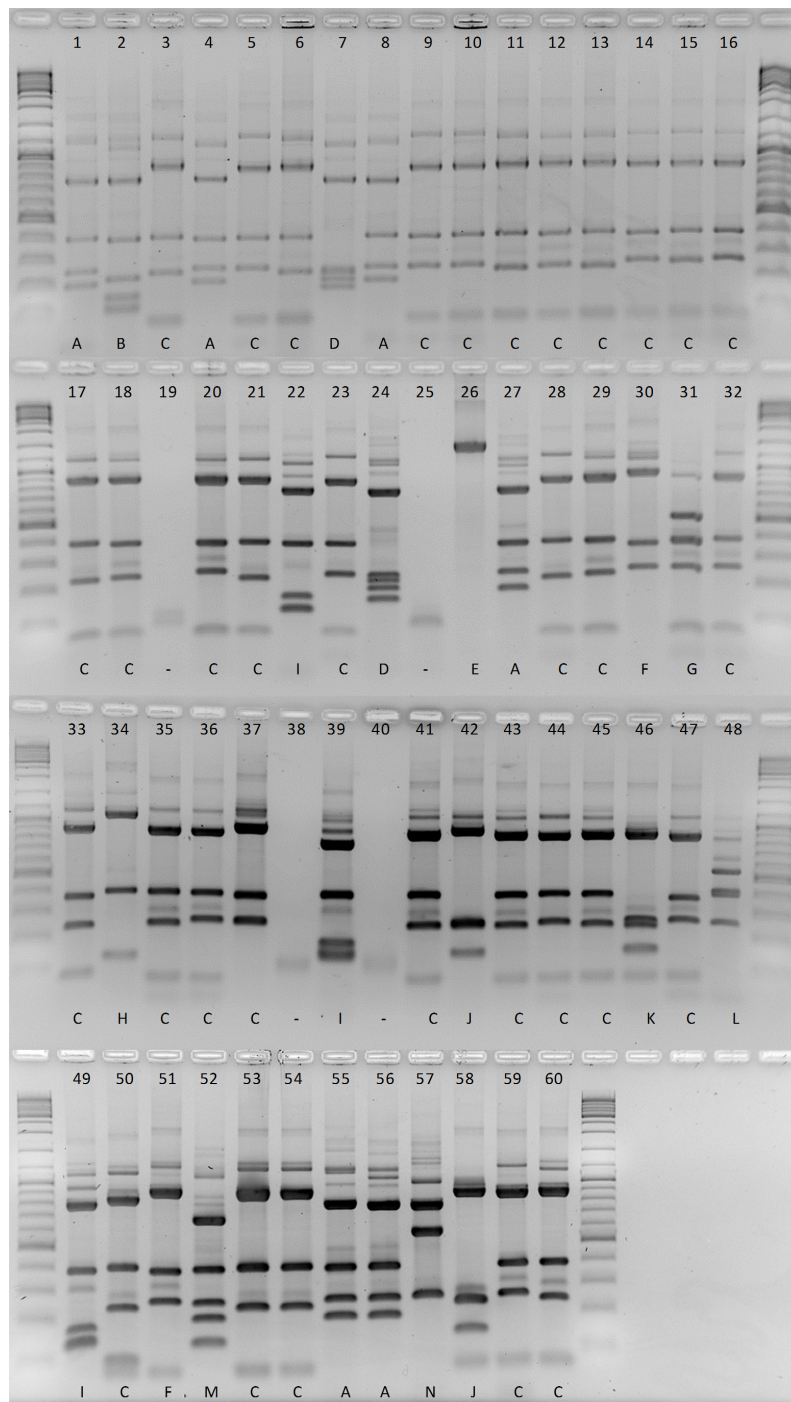


Abbildung 60: *Hinf*I-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Wp1). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

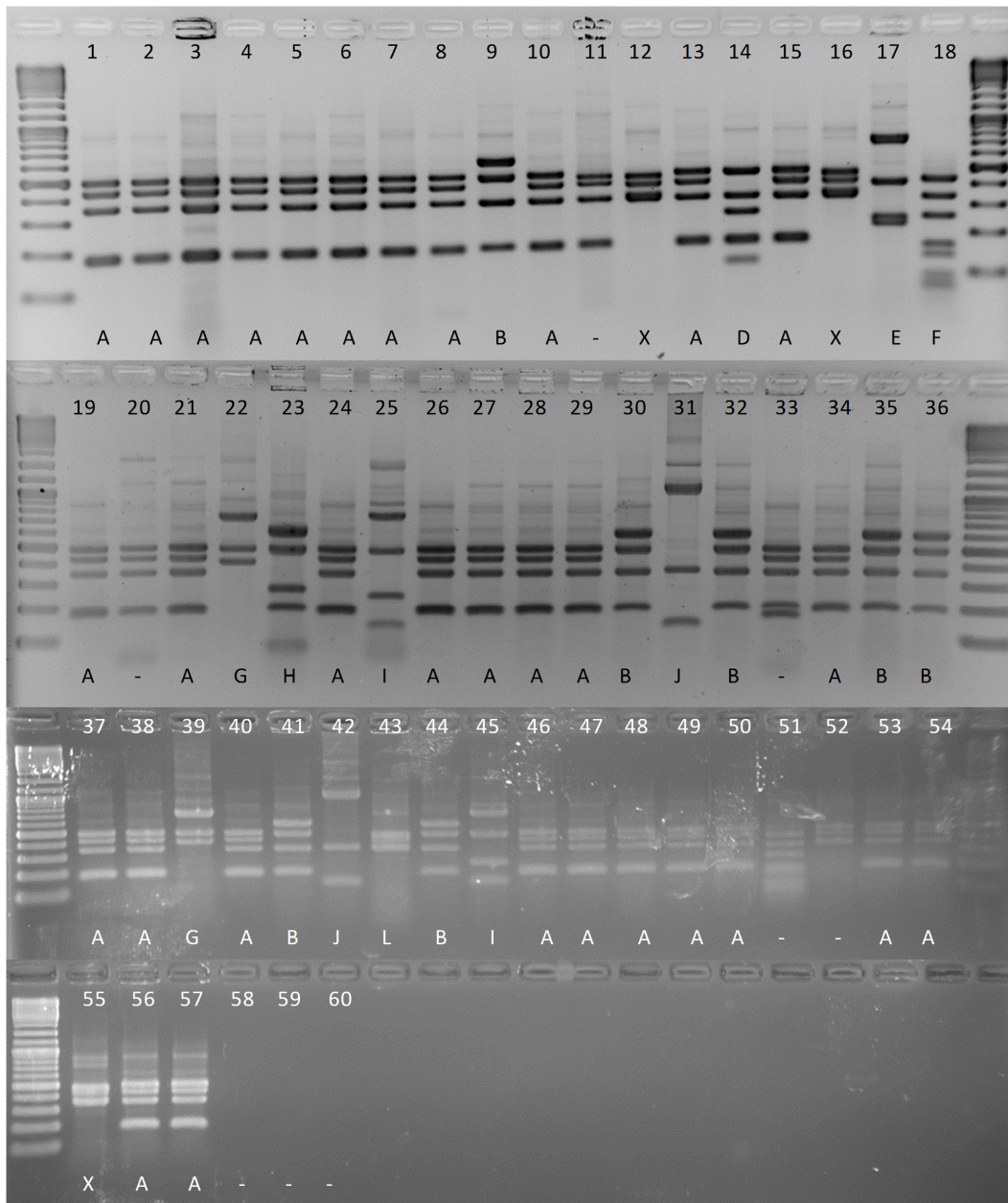


Abbildung 61: **HhaI**-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Wp2). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

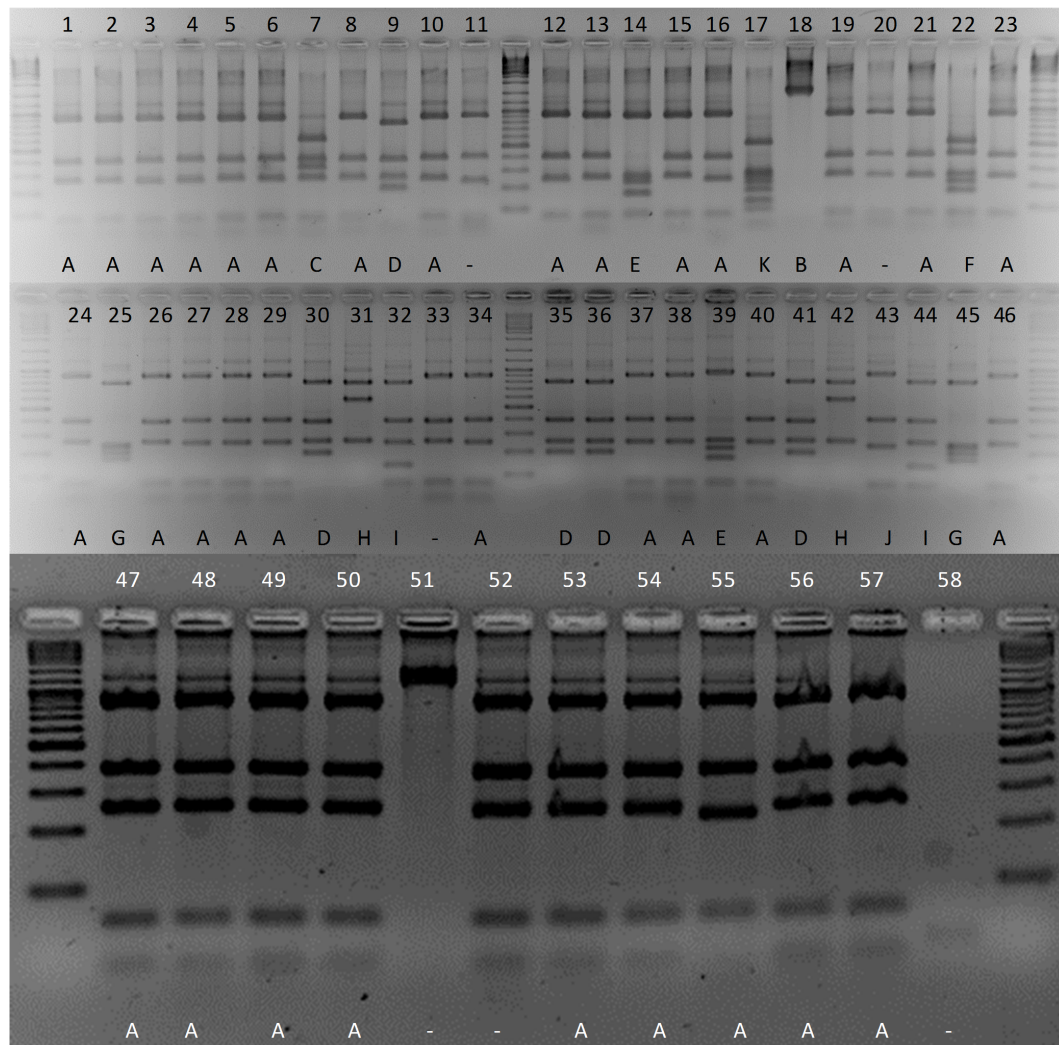


Abbildung 62: **Hinfi**-Verdau der bakteriellen **16S rDNA-Klone (Probe Wp2)**. Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

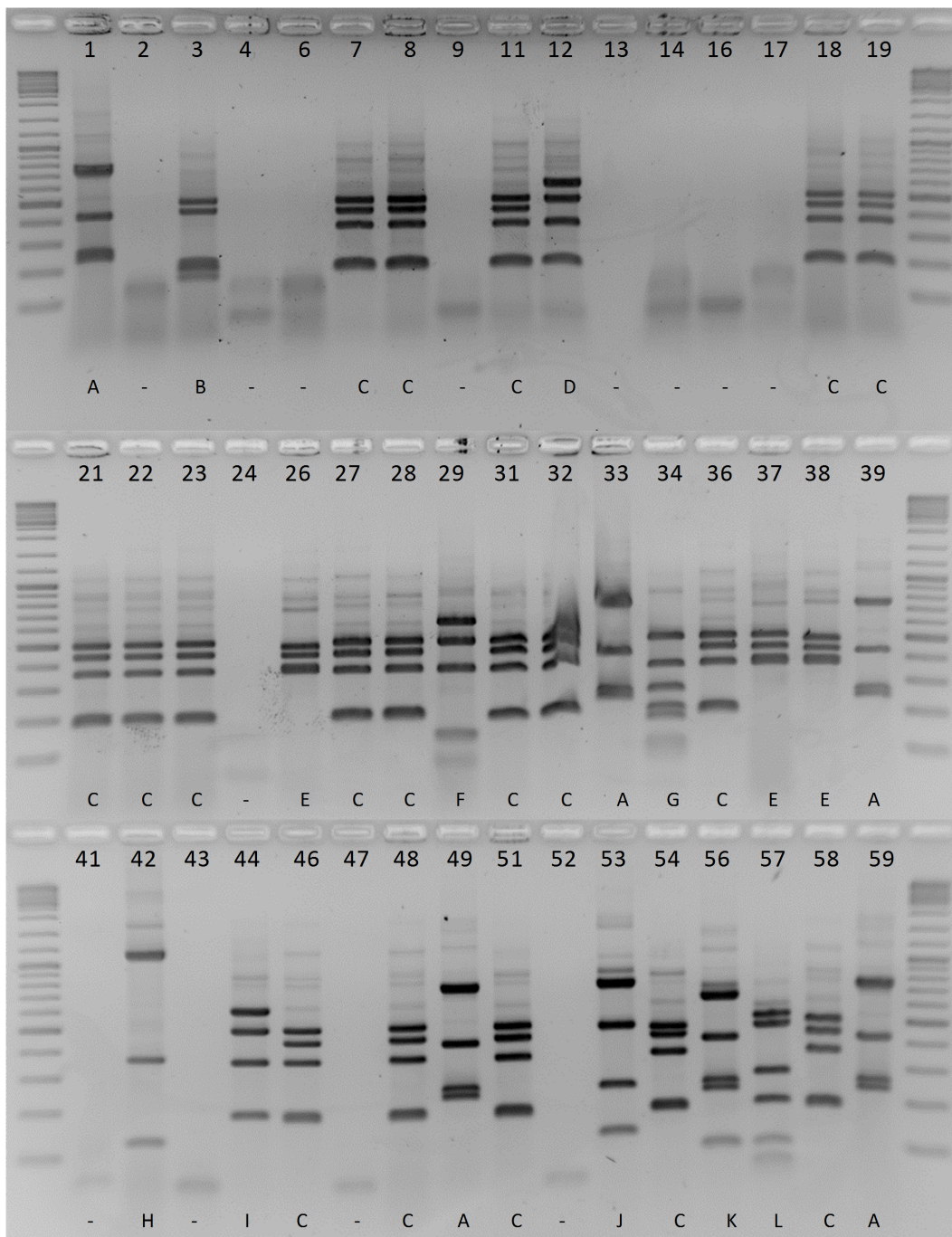


Abbildung 63: **HhaI-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Wp3).** Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

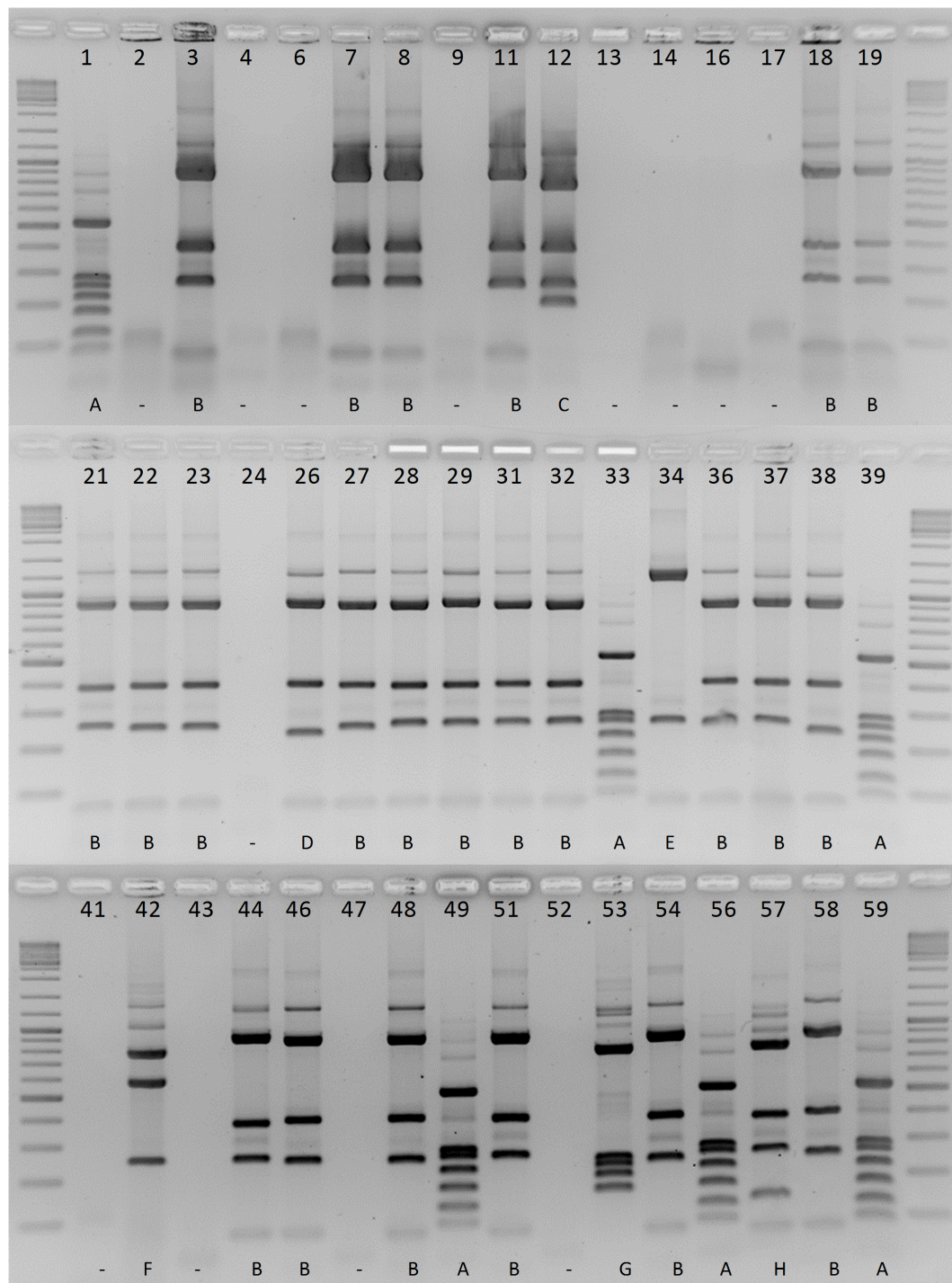


Abbildung 64: **Hinfl**-Verdau der bakteriellen 16S rDNA-Klone (Probe Wp3). Nummerierung: Klon-Nr., Buchstabe: Muster-Codierung (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 73).

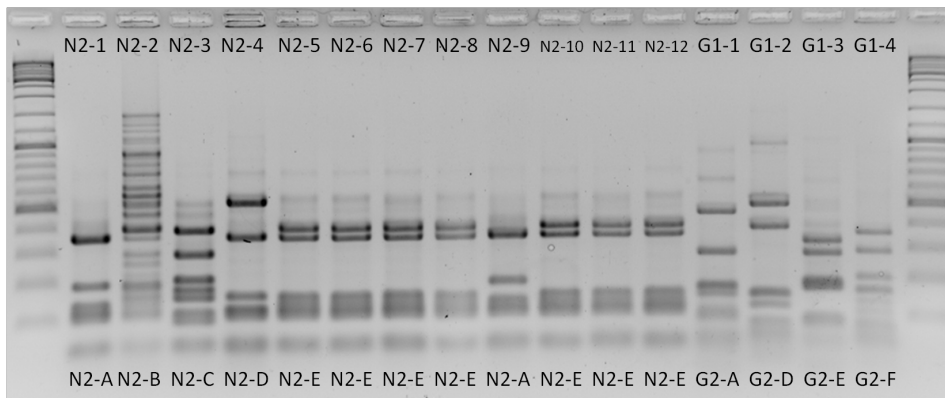


Abbildung 65: **BsuI-Verdau der archaeellen 16S rDNA-Klone** N2-1-ar bis N2-12-ar und G2-1-ar bis G2-4-ar. Unter den Bandenmustern ist die jeweilige ARDRA-Gruppe aufgeführt (vgl. Tabelle 50, S. 208).

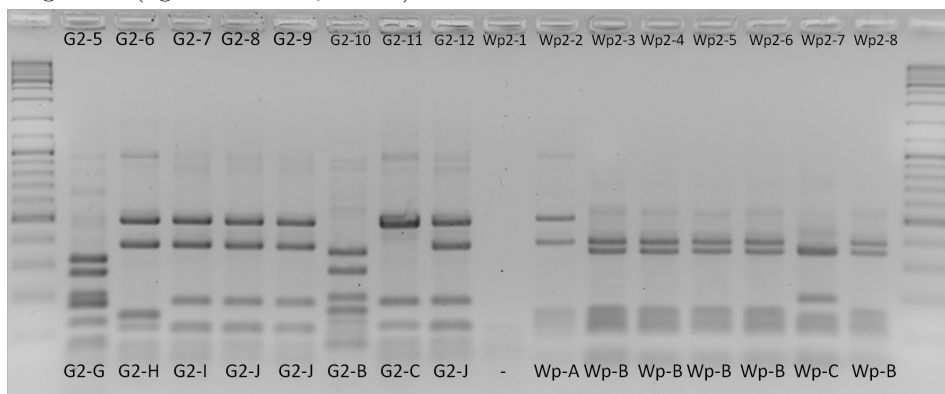


Abbildung 66: **BsuI-Verdau der archaeellen 16S rDNA-Klone** G2-5-ar bis G2-12-ar und Wp2-1-ar bis Wp2-8-ar. Unter den Bandenmustern ist die jeweilige ARDRA-Gruppe aufgeführt (vgl. Tabelle 50, S. 208).

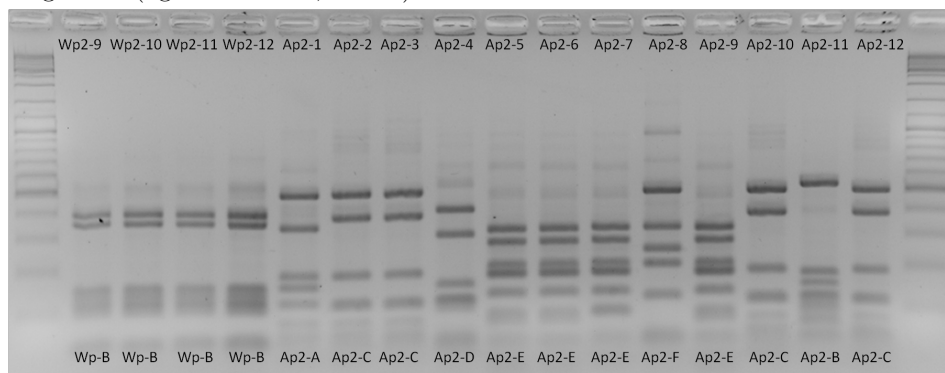


Abbildung 67: **BsuI-Verdau der archaeellen 16S rDNA-Klone** Wp2-9-ar bis Wp2-12-ar und Ap2-1-ar bis Ap2-12-ar. Unter den Bandenmustern ist die jeweilige ARDRA-Gruppe aufgeführt (vgl. Tabelle 50, S. 208).

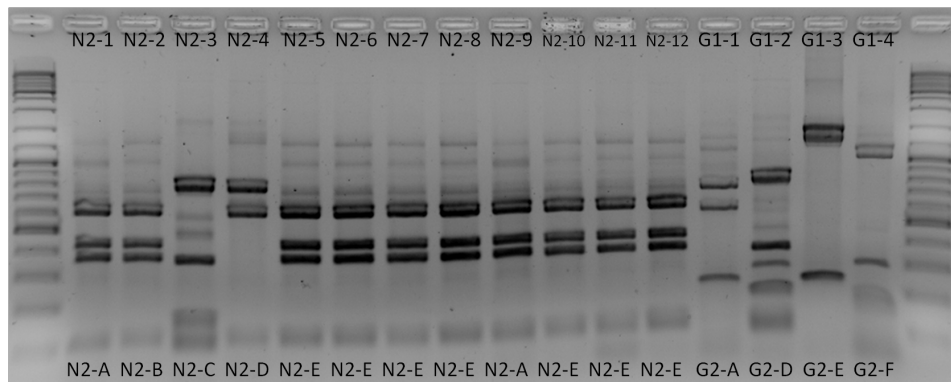


Abbildung 68: **Sma/ Xho-Verdau der archaeellen 16S rDNA-Klone** N2-1-ar bis N2-12-ar und G2-1-ar bis G2-4-ar. Unter den Bandenmustern ist die jeweilige ARDRA-Gruppe aufgeführt (vgl. Tabelle 50, S. 208).

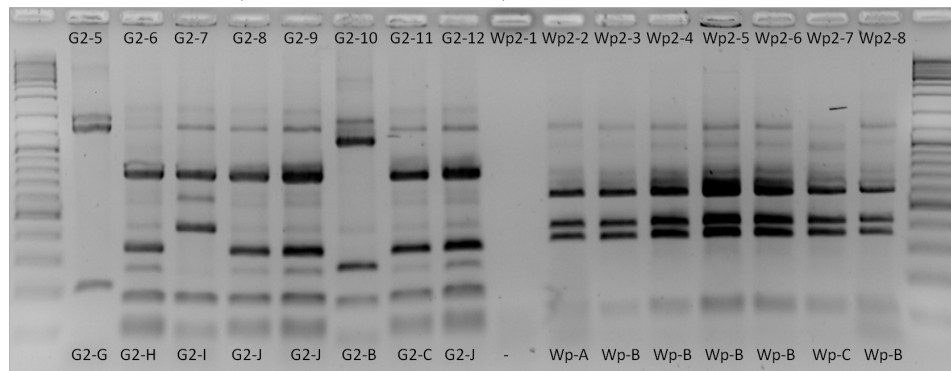


Abbildung 69: **Sma/ Xho-Verdau der archaeellen 16S rDNA-Klone** G2-5-ar bis G2-12-ar und Wp2-1-ar bis Wp2-8-ar. Unter den Bandenmustern ist die jeweilige ARDRA-Gruppe aufgeführt (vgl. Tabelle 50, S. 208).

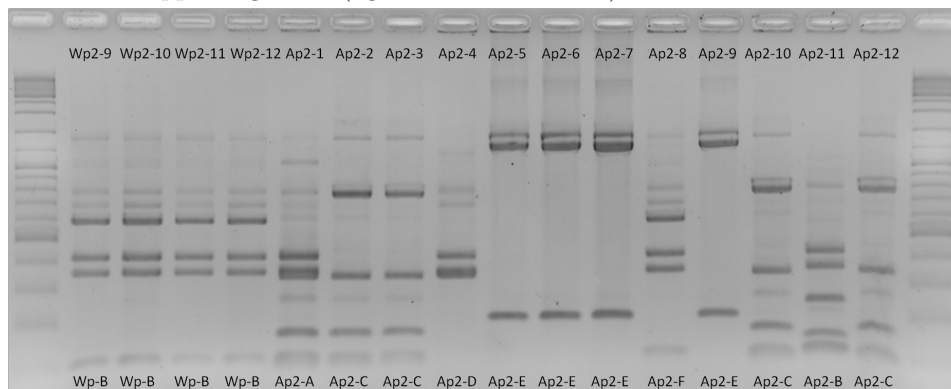


Abbildung 70: **Sma/ Xho-Verdau der archaeellen 16S rDNA-Klone** Wp2-9-ar bis Wp2-12-ar und Ap2-1-ar bis Ap2-12-ar. Unter den Bandenmustern ist die jeweilige ARDRA-Gruppe aufgeführt (vgl. Tabelle 50, S. 208).

Tabelle 29: **ARDRA-Auswertung Ap1.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
Ap1-0 ^a			2	Ap1-18, Ap1-43
Ap1-AA	A	A	1	Ap1-27
Ap1-BB	B	B	8	Ap1-6, Ap1-15, Ap1-16, Ap1-19, Ap1-38, Ap1-42, Ap1-44, Ap1-45
Ap1-CC	C	C	1	Ap1-52
Ap1-EE	E	E	2	Ap1-22, Ap1-60
Ap1-GG	G	G	21	Ap1-2, Ap1-3, Ap1-4, Ap1-5, Ap1-8, Ap1-9, Ap1-12, Ap1-17, Ap1-25, Ap1-26, Ap1-28, Ap1-33, Ap1-40, Ap1-41, Ap1-48, Ap1-49, Ap1-51, Ap1-54 , Ap1-56, Ap1-57, Ap1-58
Ap1-GY	G	Y	1	Ap1-50
Ap1-IH	I	H	15	Ap1-10 , Ap1-11, Ap1-13, Ap1-14, Ap1-21, Ap1-23, Ap1-24, Ap1-32, Ap1-34, Ap1-36, Ap1-39, Ap1-46, Ap1-47, Ap1-53, Ap1-55
Ap1-II	I	I	1	Ap1-30
Ap1-PZ	P	Z	2	Ap1-1, Ap1-31
Ap1-SS	S	S	2	Ap1-29 , Ap1-35
Ap1-TT	T	T	2	Ap1-20, Ap1-37
Ap1-UU	U	U	1	<i>Ap1-7</i>
Ap1-VX	V	X	1	Ap1-59

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis

Tabelle 30: **ARDRA-Auswertung Ap2.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
Ap2-0 ^a			2	Ap2-2, Ap2-47
Ap2-direkt ^b	n.b.	b.b.	3	Ap2-40, Ap2-48, Ap2-56
Ap2-AA	A	A	14	Ap2-1 , Ap2-6, Ap2-12, Ap2-14, Ap2-18, Ap2-19, Ap2-22, Ap2-24, Ap2-30, Ap2-35, Ap2-38, Ap2-42, Ap2-49, Ap2-50
Ap2-AM	A	M	1	<i>Ap2-36</i>
Ap2-BB	B	B	8	Ap2-3 , Ap2-4, Ap2-17, Ap2-26, Ap2-29, Ap2-34, Ap2-37, Ap2-59
Ap2-BK	B	K	5	Ap2-7 , Ap2-33, Ap2-51, Ap2-52, Ap2-60
Ap2-CC	C	C	1	Ap2-5
Ap2-DD	D	D	1	<i>Ap2-8</i>
Ap2-DM	D	M	1	<i>Ap2-31</i>
Ap2-EE	E	E	2	Ap2-9 , Ap2-32
Ap2-EL	E	L	1	Ap2-28
Ap2-FF	F	F	2	Ap2-10 , Ap2-41
Ap2-GG	G	G	2	Ap2-11 , Ap2-13
Ap2-GM	G	M	1	Ap2-44
Ap2-HH	H	H	1	Ap2-15
Ap2-IH	I	H	3	Ap2-16 , Ap2-43, Ap2-46
Ap2-IS	I	S	1	Ap2-58
Ap2-JH	J	H	1	<i>Ap2-20</i>
Ap2-KE	K	E	1	Ap2-21
Ap2-LI	L	I	1	<i>Ap2-23</i>
Ap2-MJ	M	J	1	<i>Ap2-25</i>
Ap2-NH	N	H	1	Ap2-27
Ap2-ON	O	N	1	Ap2-39
Ap2-PO	P	O	1	Ap2-45
Ap2-QP	Q	P	2	Ap2-53 , Ap2-57
Ap2-QQ	Q	Q	1	Ap2-54
Ap2-RR	R	R	1	Ap2-55

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis^b Direktsequenzierung ohne Restriktionsergebnis

Tabelle 31: **ARDRA-Auswertung Ap3.**

Fett: sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert; (in Klammern): sequenzierter Gruppenklon aus vorheriger ARDRA-Analyse.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	Hinfl		
Ap3-0 ^a			3	Ap3-22, Ap3-23, Ap3-24
Ap3-AA	A	A	3	(Ap1-27), Ap3-1, Ap3-43, Ap3-44
Ap3-BB	B	B	16	(Ap1-54), Ap3-2, Ap3-3, Ap3-16, Ap3-19, Ap3-25, Ap3-30, Ap3-32, Ap3-35, Ap3-37, Ap3-40, Ap3-42, Ap3-46, Ap3-51, Ap3-52, Ap3-55, Ap3-57
Ap3-BD	B	D	2	<i>Ap3-9</i> , Ap3-11
Ap3-BG	B	G	1	Ap3-12
Ap3-BM	B	M	1	Ap3-21
Ap3-CC	C	C	4	Ap3-4 , Ap3-7, Ap3-13, Ap3-28
Ap3-DC	D	C	4	Ap3-26 , Ap3-27, Ap3-31, Ap3-33
Ap3-DD	D	D	7	(Ap2-1), Ap3-5, Ap3-6, Ap3-29, Ap3-38, Ap3-45, Ap3-50, Ap3-53
Ap3-DE	D	E	1	Ap3-39
Ap3-ER	E	R	2	(Ap2-16), Ap3-41, Ap3-58
Ap3-FF ^b	F	F	1	Ap3-8
Ap3-GG	G	G	1	Ap3-10
Ap3-HH	H	H	2	(Ap2-9), Ap3-14, Ap3-36
Ap3-IB ^b	I	B	1	Ap3-15
Ap3-JJ	J	J	1	Ap3-17
Ap3-KF	K	F	1	(Ap2-3), Ap3-18
Ap3-LL	L	L	2	Ap3-20 , Ap3-59
Ap3-LQ	L	Q	1	Ap3-56
Ap3-MN ^b	M	N	1	Ap3-34
Ap3-NO	N	O	1	(Ap2-10), Ap3-48
Ap3-OB	O	B	1	Ap3-49
Ap3-PP	P	P	1	Ap3-54
Ap3-QO	Q	O	1	Ap3-60
Ap3-XX	X	X	1	Ap3-47

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis

^b ARDRA-Gruppe ohne analysierbares Sequenzierergebnis

Tabelle 32: **ARDRA-Auswertung G1.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
G1-0 ^a			3	G1-25, G1-32, G1-60
G1-AA	A	A	12	G1-1 , G1-2, G1-3, G1-8, G1-16, G1-18, G1-23, G1-29, G1-31, G1-34, G1-39, G1-41
G1-AF	A	F	1	G1-26
G1-BB	B	B	28	G1-4 , G1-5, G1-6, G1-9, G1-10, G1-12, G1-14, G1-15, G1-17, G1-20, G1-22, G1-28, G1-30, G1-33, G1-37, G1-38, G1-43, G1-45, G1-47, G1-48, G1-50, G1-51, G1-52, G1-54, G1-55, G1-56, G1-57, G1-59
G1-BG	B	G	1	G1-27
G1-CC	C	C	1	G1-7
G1-DB	D	B	1	G1-11
G1-ED	E	D	1	G1-13
G1-FE	F	E	1	G1-19
G1-GC	G	C	3	G1-21 , G1-36, G1-58
G1-HB	H	B	1	G1-24
G1-IA	I	A	1	G1-35
G1-JH	J	H	1	<i>G1-40</i>
G1-KI	K	I	1	<i>G1-42</i>
G1-LJ	L	J	1	G1-44
G1-MK	M	K	1	<i>G1-46</i>
G1-NL	N	L	1	G1-49
G1-OB	O	B	1	G1-53

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenziererergebnis

Tabelle 33: **ARDRA-Auswertung G2.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
G2-AB	A	B	19	G2-1, G2-3, G2-13, G2-14, G2-17, G2-20, G2-21, G2-22, G2-26, G2-27, G2-28, G2-32, G2-34, G2-37, G2-38, G2-42, G2-51, G2-53, G2-59
G2-BA	B	A	11	G2-2, G2-5, G2-6 , G2-7, G2-8, G2-10, G2-15, G2-16, G2-25, G2-39, G2-45
G2-BD	B	D	3	G2-36 , G2-40, G2-48
G2-BY	B	Y	1	G2-19
G2-CD	C	D	8	G2-4, G2-9, G2-23, G2-29, G2-41, G2-47, G2-55 , G2-57
G2-DE	D	E	2	G2-11, G2-56
G2-EB	E	B	1	<i>G2-35</i>
G2-EF	E	F	1	G2-12
G2-FV	F	V	1	G2-18
G2-FY	F	Y	1	G2-24
G2-GW	G	W	1	<i>G2-30</i>
G2-HZ	H	Z	2	G2-31 , G2-33
G2-IG	I	G	1	G2-43
G2-JT	J	T	1	G2-44
G2-KH	K	H	2	<i>G2-49</i> , G2-58
G2-LI	L	I	1	G2-50
G2-MB	M	B	1	G2-52
G2-NA	N	A	1	G2-54
G2-OX	O	X	1	G2-60
G2-PD	P	D	1	G2-46

Tabelle 34: **ARDRA-Auswertung G3.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
G3-0 ^a			4	G3-1, G3-6, G3-22, G3-30
G3-AA	A	A	1	<i>G3-2</i>
G3-BB	B	B	22	G3-3 , G3-4, G3-5, G3-7, G3-10, G3-14, G3-18, G3-19, G3-23, G3-24, G3-26, G3-33, G3-34, G3-38, G3-40, G3-43, G3-49, G3-51, G3-52, G3-54, G3-58, G3-60
G3-BJ	B	J	1	G3-31
G3-CC	C	C	1	<i>G3-8</i>
G3-DD	D	D	1	G3-9
G3-EE	E	E	2	G3-11 , G3-36
G3-EF	E	F	1	<i>G3-17</i>
G3-FF	F	F	5	G3-12 , G3-16, G3-21, G3-27, G3-56
G3-GG	G	G	1	<i>G3-13</i>
G3-HB	H	B	1	G3-15
G3-IA	I	A	2	G3-20 , G3-48
G3-JG	J	G	2	G3-25 , G3-41
G3-KH	K	H	2	<i>G3-28</i> , G3-53
G3-LI	L	I	1	G3-29
G3-MK	M	K	1	G3-32
G3-NL	N	L	2	G3-35 , G3-57
G3-OM	O	M	1	G3-37
G3-PN	P	N	4	G3-39 , G3-42, G3-47, G3-59
G3-QO	Q	O	1	<i>G3-44</i>
G3-RP	R	P	1	<i>G3-45</i>
G3-SQ	S	Q	1	G3-50
G3-TR	T	R	1	G3-55
G3-XF	X	F	1	G3-46

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis

Tabelle 35: **ARDRA-Auswertung N1.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
N1-0 ^a			3	N1-28, N1-37, N1-46,
N1-direkt ^b	n.b.	n.b.	12	N1-5, N1-10, N1-15, N1-20, N1-25, N1-30, N1-35, N1-40^c, N1-45, N1-50^c, N1-55, N1-60
N1-AA	A	A	7	N1-1, N1-2, N1-11, N1-17, N1-23, N1-24, N1-57
N1-BB	B	B	10	N1-3, N1-7, N1-18, N1-22, N1-27, N1-29, N1-38, N1-43, N1-47, N1-59
N1-BE	B	E	1	N1-9
N1-CC	C	C	1	N1-4
N1-DD	D	D	4	N1-6, N1-8, N1-14, N1-41
N1-EA	E	A	1	N1-12
N1-FF	F	F	1	<i>N1-13</i>
N1-GG	G	G	4	N1-16, N1-32, N1-36, N1-56
N1-HH	H	H	1	<i>N1-19</i>
N1-ID	I	D	1	N1-26
N1-II	I	I	1	N1-21
N1-JJ	J	J	4	<i>N1-33, N1-39, N1-49, N1-54</i>
N1-KA	K	A	1	N1-42
N1-KK	K	K	1	N1-34
N1-LL	L	L	2	N1-48, N1-51
N1-MM	M	M	1	<i>N1-52</i>
N1-NN	N	N	1	N1-58
N1-OJ	O	J	1	N1-31
N1-PJ	P	J	1	N1-44
N1-QA	Q	A	1	N1-53

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis^b Direktsequenzierung ohne Restriktionsergebnis^c sequenzierter Klon ohne analysierbares Sequenzierergebnis

Tabelle 36: **ARDRA-Auswertung N2.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
N2-0 ^a			4	N2-1, N2-58, N2-59, N2-60
N2-BB	B	B	13	N2-2 , N2-8, N2-13, N2-16, N2-17, N2-22, N2-27, N2-32, N2-33, N2-43, N2-53, N2-55, N2-57
N2-BH	B	H	1	N2-10
N2-BM	B	M	1	N2-28
N2-CB	C	B	1	<i>N2-56</i>
N2-CC	C	C	11	N2-3 , N2-25, N2-29, N2-30, N2-35, N2-40, N2-41, N2-44, N2-45, N2-51, N2-54
N2-CE	C	E	1	<i>N2-6</i>
N2-DB	D	B	3	N2-4 , N2-20, N2-24
N2-ED	E	D	6	N2-5 , N2-26, N2-31, N2-37, N2-46, N2-47
N2-FF	F	F	1	N2-7
N2-GG	G	G	1	N2-9
N2-HP	H	P	1	N2-11
N2-IQ	I	Q	1	N2-12
N2-JH	J	H	2	N2-14 , N2-49
N2-KI	K	I	1	N2-15
N2-LJ	L	J	2	N2-18 , N2-23
N2-MK	M	K	1	<i>N2-19</i>
N2-NL	N	L	1	N2-21
N2-ON	O	N	1	N2-34
N2-PO	P	O	1	N2-36
N2-QR	Q	R	2	N2-38 , N2-48
N2-RS	R	S	1	N2-39
N2-ST	S	T	1	<i>N2-42</i>
N2-TU	T	U	1	N2-50
N2-VV	V	V	1	N2-52

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis

Tabelle 37: **ARDRA-Auswertung N3.**

Fett: sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert; (in Klammern): sequenzierter Gruppenklon aus vorheriger ARDRA-Analyse.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	HinfI		
N3-0 ^a			5	N3-3, N3-6, N3-26, N3-36, N3-41
N3-direkt ^b	n.b.	n.b.	12	N3-5, N3-10, N3-15, N3-20^c, N3-25^c, N3-30, N3-35, N3-40, N3-45, N3-50, N3-55, N3-60
N3-AA	A	A	2	(N1-3), N3-1, N3-11
N3-BB	B	B	1	<i>N3-2</i>
N3-BH	B	H	1	N3-31
N3-CB	C	B	17	N3-4 , N3-9, N3-13, N3-22, N3-24, N3-27, N3-28, N3-29, N3-32, N3-33, N3-39, N3-43, N3-51, N3-52, N3-56, N3-57, N3-59
N3-CD	C	D	1	<i>N3-14</i>
N3-CH	C	H	1	N3-34
N3-CL ^d	C	L	1	N3-48
N3-DC	D	C	1	N3-7
N3-DJ	D	J	1	N3-46
N3-EB	E	B	2	(N1-1), N3-19, N3-49
N3-ED ^d	E	D	1	N3-8
N3-FE	F	E	1	N3-12
N3-GB	G	B	1	N3-16
N3-HF	H	F	1	N3-17
N3-IB	I	B	2	<i>N3-18</i> , N3-54
N3-JF	J	F	2	N3-21 , N3-42
N3-KG	K	G	1	N3-23
N3-LH	L	H	1	<i>N3-37</i>
N3-MI	M	I	1	N3-38
N3-ND	N	D	1	N3-44
N3-OK	O	K	1	N3-47
N3-PM	P	M	1	N3-53
N3-QB	Q	B	1	N3-58

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenziererergebnis

^b Direktsequenzierung ohne Restriktionsergebnis

^c sequenzierter Klon ohne analysierbares Sequenziererergebnis

^d ARDRA-Gruppe ohne analysierbares Sequenziererergebnis

Tabelle 38: **ARDRA-Auswertung Wp1.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	Hinfl		
Wp1-0 ^a			4	Wp1-19, Wp1-25, Wp1-38, Wp1-40
Wp1-AA	A	A	1	Wp1-1
Wp1-BB	B	B	1	Wp1-2
Wp1-BC	B	C	14	Wp1-11 , Wp1-12, Wp1-13, Wp1-17, Wp1-18, Wp1-21, Wp1-29, Wp1-41, Wp1-43, Wp1-45, Wp1-50, Wp1-53, Wp1-54, Wp1-60
Wp1-BJ	B	J	1	Wp1-58
Wp1-CA	C	A	2	<i>Wp1-27</i> , Wp1-56
Wp1-CC	C	C	2	Wp1-3 , Wp1-20
Wp1-DA	D	A	1	Wp1-4
Wp1-EC	E	C	13	Wp1-5 , Wp1-9, Wp1-10, Wp1-14, Wp1-15, Wp1-16, Wp1-23, Wp1-28, Wp1-32, Wp1-35, Wp1-36, Wp1-47, Wp1-59
Wp1-EG	E	G	1	Wp1-31
Wp1-EI	E	I	3	Wp1-22 , Wp1-39, Wp1-49
Wp1-EK	E	K	1	Wp1-46
Wp1-FC	F	C	1	Wp1-6
Wp1-GD	G	D	2	Wp1-7 , Wp1-24
Wp1-HA	H	A	1	Wp1-8
Wp1-IE	I	E	1	Wp1-26
Wp1-JC ^b	J	C	1	Wp1-37
Wp1-JF	J	F	1	Wp1-30
Wp1-KC	K	C	1	<i>Wp1-33</i>
Wp1-LH ^b	L	H	1	Wp1-34
Wp1-MJ	M	J	1	<i>Wp1-42</i>
Wp1-ML	M	L	1	<i>Wp1-48</i>
Wp1-NC	N	C	1	Wp1-44
Wp1-OF	O	F	1	<i>Wp1-51</i>
Wp1-PM	P	M	1	Wp1-52
Wp1-QA	Q	A	1	<i>Wp1-55</i>
Wp1-RN	R	N	1	Wp1-57

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis^b ARDRA-Gruppe ohne analysierbares Sequenzierergebnis

Tabelle 39: **ARDRA-Auswertung Wp2.****Fett:** sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	Hinfl		
Wp2-0 ^a			8	Wp2-11, Wp2-20, Wp2-33, Wp2-51, Wp2-52, Wp2-58, Wp2-59, Wp2-60
Wp2-AA	A	A	30	Wp2-1 , Wp2-2, Wp2-3, Wp2-4, Wp2-5, Wp2-6, Wp2-8, Wp2-10, Wp2-13, Wp2-15, Wp2-19, Wp2-21, Wp2-24, Wp2-26, Wp2-27, Wp2-28, Wp2-29, Wp2-34, Wp2-37, Wp2-38, Wp2-40, Wp2-46, Wp2-47, Wp2-48, Wp2-49, Wp2-50, Wp2-53, Wp2-54, Wp2-56, Wp2-57
Wp2-AC	A	C	1	Wp2-7
Wp2-BD	B	D	5	Wp2-9 , Wp2-30, Wp2-35, Wp2-36, Wp2-41
Wp2-BI	B	I	2	Wp2-32 , Wp2-44
Wp2-DE	D	E	1	Wp2-14
Wp2-EK	E	K	1	Wp2-17
Wp2-FB	F	B	1	Wp2-18
Wp2-GE	G	E	1	Wp2-39
Wp2-GF	G	F	1	Wp2-22
Wp2-HA	H	A	1	<i>Wp2-23</i>
Wp2-IG	I	G	2	Wp2-25 , Wp2-45
Wp2-JH	J	H	2	Wp2-31 , Wp2-42
Wp2-LJ	L	J	1	Wp2-43
Wp2-XA	X	A	3	Wp2-12 , Wp2-16, Wp2-55

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis

Tabelle 40: **ARDRA-Auswertung Wp3.**

Fett: sequenzierter Gruppenklon; *kursiv:* als chimärer Klon aussortiert.

ARDRA-Gr.	Bandenmuster		Anzahl	vertretene Klone
	HhaI	Hinfi		
Wp3-0 ^a			13	Wp3-2, Wp3-4, Wp3-6, Wp3-9, Wp3-13, Wp3-14, Wp3-16, Wp3-17, Wp3-24, Wp3-41, Wp3-43, Wp3-47, Wp3-52
Wp3-direkt ^b	n.b.	n.b.	12	Wp3-5, Wp3-10^c, Wp3-15, Wp3-20, Wp3-25, Wp3-30, Wp3-35, Wp3-40, Wp3-45, Wp3-50, Wp3-55, Wp3-60
Wp3-AA	A	A	5	Wp3-1, Wp3-33, Wp3-39, Wp3-49, Wp3-59
Wp3-BB	B	B	1	Wp3-3
Wp3-CB	C	B	18	Wp3-7, Wp3-8, Wp3-11, Wp3-18, Wp3-19, Wp3-21, Wp3-22, Wp3-23, Wp3-27, Wp3-28, Wp3-31, Wp3-32, Wp3-36, Wp3-46, Wp3-48, Wp3-51, Wp3-54, Wp3-58
Wp3-DC	D	C	1	Wp3-12
Wp3-EB	E	B	2	Wp3-37, Wp3-38
Wp3-ED	E	D	1	Wp3-26
Wp3-FB	F	B	1	<i>Wp3-29</i>
Wp3-GE	G	E	1	Wp3-34
Wp3-HF	H	F	1	Wp3-42
Wp3-IB	I	B	1	Wp3-44
Wp3-JG	J	G	1	Wp3-53
Wp3-KA	K	A	1	Wp3-56
Wp3-LH	L	H	1	Wp3-57

^a Restriktionsergebnis ungenau oder fehlgeschlagen, kein Sequenzierergebnis

^b Direktsequenzierung ohne Restriktionsergebnis

^c sequenzierter Klon ohne analysierbares Sequenzierergebnis

Tabelle 41: **BLASTClust generierte Cluster der Gruppe P-Sequenzen.**

Parameter: 80 % Sequenzabdeckung, 97 % Sequenzidentität. **Fett:** Resequenzierung erfolgreich, (in Klammern): Resequenzierung fehlgeschlagen.

Cluster	vertretene Klone
P-1	Ap3-10, Ap3-21, G3-11, Wp1-22 , Ap3-49, N1-44, G2-12, Wp3-12, Ap1-50, Ap2-44, N3-44, Wp2-32, Wp1-4
P-2	G2-59, Wp1-6, Wp3-26, G1-11, Wp1-3, Wp3-5, G1-24, G1-27, Ap1-10 , Ap2-48, G1-53, Wp2-43, Wp1-11
P-3	G2-55, N2-11, N1-10 , N3-5, N1-16, N1-45, N1-55, G1-21, G3-31
P-4	Wp1-5, N3-55, N3-58, Wp1-44, N3-16, N3-4 , N3-15, Wp3-35, N3-60
P-5	G2-54, Ap1-59, G3-39 , Ap2-7, N2-5
P-6	N3-46 , G2-18, N2-39, G3-9
P-7	G2-44, Wp1-7 , Wp2-25
P-8	Wp2-17, Wp3-1
P-9	Wp3-42 , G2-24
P-10	Ap2-31 , N3-31
P-11	Ap3-4 , Ap2-36
P-12	G2-56
P-13	N2-18
P-14	Ap3-56
P-15	(G2-46)
P-16	Wp1-42
P-17	Ap2-56
P-18	Ap2-39
P-19	G2-50
P-20	(G3-20)
P-21	Wp1-58
P-22	(G1-19)
P-23	N2-6
P-24	Ap2-28
P-25	Ap1-37
P-26	G3-44
P-27	Wp3-40
P-28	G3-50
P-29	N2-50

Tabelle 42: **BLASTClust** generierte Cluster der Gruppe MP-Sequenzen.

Parameter: 80 % Sequenzabdeckung, 97 % Sequenzidentität, **Fett**: resequenzierte molekulare 16S rDNA-Klone der Gruppe P-Sequenzen (siehe Tabelle 41).

Cluster	vertretene Klone
MP-1	N3-10, N3-30, N2-2, Wp2-1, Wp1-46, Wp3-37, Wp3-45, G3-46, Wp1-31, N3-35, N2-28, Wp2-7, N3-40, Wp2-39, Wp3-7, Wp3-30, Wp2-14, Wp3-3, N3-4-re , Wp3-20, Wp3-44, Wp3-34
MP-2	G3-29, N3-50, G1-26, G2-36, G1-35, N1-20, G1-1, G3-39-re , Ap1-45, Ap1-31, G3-37, Ap3-17, G2-6, N1-15, Ap2-3, N1-9, N1-3, Ap2-45
MP-3	N2-12, Wp1-58-re , Ap2-15, G1-4, N2-4, Ap2-58, N1-42, N1-53, Ap1-10-re , Ap2-16, N1-34, N1-35, Wp2-12, G3-12, N1-1, Wp3-50, Ap2-27, N1-25
MP-4	N2-14, Ap1-54, Ap2-11, Wp2-9, Ap1-29, Wp1-22-re , Wp3-15, Ap3-12, Ap2-54, Ap2-53
MP-5	G1-13, Wp3-42-re , N1-21, Wp1-57, Ap1-27, G2-19, Ap2-55, G3-35, Wp2-31
MP-6	Wp3-1-re , Ap1-60, Ap2-21, Wp3-25, Wp3-56, Wp3-55, Wp3-60, Ap2-9
MP-7	G3-25, Wp1-7-re , G2-31, N3-53, Wp3-53, N1-48, N2-21
MP-8	N2-3, N3-31-re , N3-45, N2-36, Ap2-5, N2-34
MP-9	Ap3-26, Ap3-39, Ap3-4-re , Ap2-40, Ap2-1
MP-10	Ap3-20, Wp1-52, N1-4, G2-56-re , N1-31
MP-11	N1-10-re , G3-3, G1-7, N2-38, G3-15
MP-12	N1-6, N1-26, N1-30, N3-12
MP-13	N1-58, N3-46-re , N3-7
MP-14	G2-43, N2-50-re , G3-55
MP-15	G1-44, N3-21, N2-52
MP-16	Wp1-26, Wp2-18, Wp3-40-re
MP-17	N1-5, N1-12
MP-18	Ap2-56-re , Ap3-47
MP-19	Wp1-1, Wp1-8
MP-20	Wp1-2
MP-21	Ap1-52
MP-22	N2-9
MP-23	G1-49
MP-24	G2-50-re

Tabelle 42: Fortsetzung

Cluster	vertretene Klone
MP-25	N2-10
MP-26	Ap2-39-re
MP-27	Ap3-54
MP-28	Ap3-56-re
MP-29	G2-60
MP-30	N2-7
MP-31	G2-52
MP-32	Ap1-30
MP-33	N3-17
MP-34	G3-32
MP-35	N3-34
MP-36	Wp2-22
MP-37	N2-18-re
MP-38	Wp1-30
MP-39	N3-38
MP-40	Wp3-57
MP-41	N3-23
MP-42	Ap2-28-re
MP-43	G3-50-re
MP-44	Ap1-37-re
MP-45	Ap3-60
MP-46	Ap2-10
MP-47	N3-47
MP-48	N2-15

Tabelle 43: Zuordnung der Spezies-Cluster zu den ARDRA-Gruppen der Anreicherungskultur Ap1a.

ARDRA-Gruppen aus Tabellen 29, 30 und 31. Spezies-Cluster aus Tabelle 42.

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anzahl
Ap1-BB	Ap1-45	2	Ap1	8
Ap1-PZ	Ap1-31	2	Ap1	2
Ap1-VX	Ap1-59	2	Ap1	1
Ap1-IH	Ap1-10-re	3	Ap1	15
Ap1-GG	Ap1-54	4	Ap1	21
Ap1-SS	Ap1-29	4	Ap1	2
Ap1-GY	Ap1-50	4	Ap1	1
Ap1-AA	Ap1-27	5	Ap1	1
Ap1-EE	Ap1-60	6	Ap1	2
Ap1-CC	Ap1-52	21	Ap1	1
Ap1-II	Ap1-30	32	Ap1	1
Ap1-TT	Ap1-37-re	44	Ap1	2
Ap2-BB	Ap2-3	2	Ap2	8
Ap2-BK	Ap2-7	2	Ap2	5
Ap2-PO	Ap2-45	2	Ap2	1
Ap2-IH	Ap2-16	3	Ap2	3
Ap2-HH	Ap2-15	3	Ap2	1
Ap2-NH	Ap2-27	3	Ap2	1
Ap2-IS	Ap2-58	3	Ap2	1
Ap2-direkt	Ap2-48	3	Ap2	1
Ap2-GG	Ap2-11	4	Ap2	2
Ap2-QP	Ap2-53	4	Ap2	2
Ap2-QQ	Ap2-54	4	Ap2	1
Ap2-GM	Ap2-44	4	Ap2	1
Ap2-RR	Ap2-55	5	Ap2	1
Ap2-EE	Ap2-9	6	Ap2	2
Ap2-KE	Ap2-21	6	Ap2	1
Ap2-CC	Ap2-5	8	Ap2	1
Ap2-AA	Ap2-1	9	Ap2	14
Ap2-direkt	Ap2-40	9	Ap2	1
Ap2-direkt	Ap2-56-re	18	Ap2	1

Tabelle 43: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
Ap2-ON	Ap2-39-re	26	Ap2	1
Ap2-EL	Ap2-28-re	42	Ap2	1
Ap2-FF	Ap2-10	46	Ap2	2
Ap3-JJ	Ap3-17	2	Ap3	1
Ap3-KF	aus Ap2-3	2	Ap3	1
Ap3-ER	aus Ap2-16	3	Ap3	2
Ap3-BB	aus Ap1-54	4	Ap3	16
Ap3-BG	Ap3-12	4	Ap3	1
Ap3-GG	Ap3-10	4	Ap3	1
Ap3-BM	Ap3-21	4	Ap3	1
Ap3-OB	Ap3-49	4	Ap3	1
Ap3-AA	aus Ap1-27	5	Ap3	3
Ap3-HH	aus Ap2-9	6	Ap3	2
Ap3-DD	aus Ap2-1	9	Ap3	7
Ap3-DC	Ap3-26	9	Ap3	4
Ap3-CC	Ap3-4-re	9	Ap3	4
Ap3-DE	Ap3-39	9	Ap3	1
Ap3-LL	Ap3-20	10	Ap3	2
Ap3-XX	Ap3-47	18	Ap3	1
Ap3-PP	Ap3-54	27	Ap3	1
Ap3-LQ	Ap3-56-re	28	Ap3	1
Ap3-QO	Ap3-60	45	Ap3	1
Ap3-NO	aus Ap2-10	46	Ap3	1

Tabelle 44: Zuordnung der Spezies-Cluster zu den ARDRA-Gruppen der Anreicherungskultur G12.

ARDRA-Gruppen aus Tabellen 32, 33 und 34. Spezies-Cluster aus Tabelle 42.

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
G1-AA	G1-1	2	G1	12
G1-AF	G1-26	2	G1	1
G1-IA	G1-35	2	G1	1

Tabelle 44: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
G1-BB	G1-4	3	G1	28
G1-DB	G1-11	3	G1	1
G1-HB	G1-24	3	G1	1
G1-BG	G1-27	3	G1	1
G1-OB	G1-53	3	G1	1
G1-ED	G1-13	5	G1	1
G1-GC	G1-21	11	G1	3
G1-CC	G1-7	11	G1	1
G1-LJ	G1-44	15	G1	1
G1-NL	G1-49	23	G1	1
G2-BA	G2-6	2	G2	11
G2-BD	G2-36	2	G2	3
G2-NA	G2-54	2	G2	1
G2-AB	G2-59	3	G2	19
G2-EF	G2-12	4	G2	1
G2-BY	G2-19	5	G2	1
G2-FY	G2-24	5	G2	1
G2-HZ	G2-31	7	G2	2
G2-JT	G2-44	7	G2	1
G2-DE	G2-56-re	10	G2	2
G2-CD	G2-55	11	G2	8
G2-FV	G2-18	13	G2	1
G2-IG	G2-43	14	G2	1
G2-LI	G2-50-re	24	G2	1
G2-OX	G2-60	29	G2	1
G2-MB	G2-52	31	G2	1
G3-XF	G3-46	1	G3	1
G3-PN	G3-39-re	2	G3	4
G3-LI	G3-29	2	G3	1
G3-OM	G3-37	2	G3	1
G3-FF	G3-12	3	G3	5
G3-EE	G3-11	4	G3	2
G3-NL	G3-35	5	G3	2

Tabelle 44: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
G3-JG	G3-25	7	G3	2
G3-BB	G3-3	11	G3	22
G3-HB	G3-15	11	G3	1
G3-BJ	G3-31	11	G3	1
G3-DD	G3-9	13	G3	1
G3-TR	G3-55	14	G3	1
G3-MK	G3-32	34	G3	1
G3-SQ	G3-50-re	43	G3	1

Tabelle 45: **Zuordnung der Spezies-Cluster zu den ARDRA-Gruppen der Anreicherungskultur N12.**

ARDRA-Gruppen aus Tabellen 35, 36 und 37. Spezies-Cluster aus Tabelle 42.

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
N1-BB	N1-3	2	N1	10
N1-direkt	N1-15	2	N1	1
N1-direkt	N1-20	2	N1	1
N1-BE	N1-9	2	N1	1
N1-AA	N1-1	3	N1	7
N1-direkt	N1-25	3	N1	1
N1-KK	N1-34	3	N1	1
N1-direkt	N1-35	3	N1	1
N1-KA	N1-42	3	N1	1
N1-QA	N1-53	3	N1	1
N1-PJ	N1-44	4	N1	1
N1-II	N1-21	5	N1	1
N1-LL	N1-48	7	N1	2
N1-OJ	N1-31	10	N1	1
N1-CC	N1-4	10	N1	1
N1-GG	N1-16	11	N1	4
N1-direkt	N1-10-re	11	N1	1
N1-direkt	N1-45	11	N1	1

Tabelle 45: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
N1-direkt	N1-55	11	N1	1
N1-DD	N1-6	12	N1	4
N1-ID	N1-26	12	N1	1
N1-direkt	N1-30	12	N1	1
N1-NN	N1-58	13	N1	1
N1-EA	N1-12	17	N1	1
N1-direkt	N1-5	17	N1	1
N2-BB	N2-2	1	N2	13
N2-BM	N2-28	1	N2	1
N2-ED	N2-5	2	N2	6
N2-DB	N2-4	3	N2	3
N2-IQ	N2-12	3	N2	1
N2-JH	N2-14	4	N2	2
N2-NL	N2-21	7	N2	1
N2-CC	N2-3	8	N2	11
N2-ON	N2-34	8	N2	1
N2-PO	N2-36	8	N2	1
N2-QR	N2-38	11	N2	2
N2-HP	N2-11	11	N2	1
N2-RS	N2-39	13	N2	1
N2-TU	N2-50-re	14	N2	1
N2-VV	N2-52	15	N2	1
N2-GG	N2-9	22	N2	1
N2-BH	N2-10	25	N2	1
N2-FF	N2-7	30	N2	1
N2-LJ	N2-18-re	37	N2	2
N2-KI	N2-15	48	N2	1
N3-CB	N3-4-re	1	N3	17
N3-direkt	N3-10	1	N3	1
N3-direkt	N3-30	1	N3	1
N3-direkt	N3-35	1	N3	1
N3-direkt	N3-40	1	N3	1
N3-direkt	N3-15	1	N3	1

Tabelle 45: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
N3-GB	N3-16	1	N3	1
N3-direkt	N3-55	1	N3	1
N3-QB	N3-58	1	N3	1
N3-direkt	N3-60	1	N3	1
N3-AA	(N1-3)	2	N3	2
N3-direkt	N3-50	2	N3	1
N3-EB	(N1-1)	3	N3	2
N3-ND	N3-44	4	N3	1
N3-PM	N3-53	7	N3	1
N3-BH	N3-31-re	8	N3	1
N3-direkt	N3-45	8	N3	1
N3-direkt	N3-5	11	N3	1
N3-FE	N3-12	12	N3	1
N3-DJ	N3-46-re	13	N3	1
N3-DC	N3-7	13	N3	1
N3-JF	N3-21	15	N3	2
N3-HF	N3-17	33	N3	1
N3-CH	N3-34	35	N3	1
N3-MI	N3-38	39	N3	1
N3-KG	N3-23	41	N3	1
N3-OK	N3-47	47	N3	1

Tabelle 46: **Zuordnung der Spezies-Cluster zu den ARDRA-Gruppen der Anreicherungskultur Wp2a.**

ARDRA-Gruppen aus Tabellen 38, 39 und 40. Spezies-Cluster aus Tabelle 42.

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
Wp1-EC	Wp1-5	1	Wp1	13
Wp1-EG	Wp1-31	1	Wp1	1
Wp1-EK	Wp1-46	1	Wp1	1
Wp1-NC	Wp1-44	1	Wp1	1
Wp1-BC	Wp1-11	3	Wp1	14

Tabelle 46: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
Wp1-CC	Wp1-3	3	Wp1	2
Wp1-BJ	Wp1-58-re	3	Wp1	1
Wp1-FC	Wp1-6	3	Wp1	1
Wp1-EI	Wp1-22-re	4	Wp1	3
Wp1-DA	Wp1-4	4	Wp1	1
Wp1-RN	Wp1-57	5	Wp1	1
Wp1-GD	Wp1-7-re	7	Wp1	2
Wp1-PM	Wp1-52	10	Wp1	1
Wp1-IE	Wp1-26	16	Wp1	1
Wp1-AA	Wp1-1	19	Wp1	1
Wp1-HA	Wp1-8	19	Wp1	1
Wp1-BB	Wp1-2	20	Wp1	1
Wp1-JF	Wp1-30	38	Wp1	1
Wp2-AA	Wp2-1	1	Wp2	30
Wp2-DE	Wp2-14	1	Wp2	1
Wp2-GE	Wp2-39	1	Wp2	1
Wp2-AC	Wp2-7	1	Wp2	1
Wp2-XA	Wp2-12	3	Wp2	3
Wp2-LJ	Wp2-43	3	Wp2	1
Wp2-BD	Wp2-9	4	Wp2	5
Wp2-BI	Wp2-32	4	Wp2	2
Wp2-JH	Wp2-31	5	Wp2	2
Wp2-EK	Wp2-17	6	Wp2	1
Wp2-IG	Wp2-25	7	Wp2	2
Wp2-FB	Wp2-18	16	Wp2	1
Wp2-GF	Wp2-22	36	Wp2	1
Wp3-CB	Wp3-7	1	Wp3	18
Wp3-EB	Wp3-37	1	Wp3	2
Wp3-direkt	Wp3-20	1	Wp3	1
Wp3-BB	Wp3-3	1	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-30	1	Wp3	1
Wp3-GE	Wp3-34	1	Wp3	1
Wp3-IB	Wp3-44	1	Wp3	1

Tabelle 46: Fortsetzung

ARDRA-Gr.	sequenzierter Klon	MP-Cluster	Probe	Anz. Klone
Wp3-direkt	Wp3-45	1	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-35	1	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-50	3	Wp3	1
Wp3-ED	Wp3-26	3	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-5	3	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-15	4	Wp3	1
Wp3-DC	Wp3-12	4	Wp3	1
Wp3-HF	Wp3-42-re	5	Wp3	1
Wp3-AA	Wp3-1-re	6	Wp3	5
Wp3-direkt	Wp3-25	6	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-55	6	Wp3	1
Wp3-KA	Wp3-56	6	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-60	6	Wp3	1
Wp3-JG	Wp3-53	7	Wp3	1
Wp3-direkt	Wp3-40-re	16	Wp3	1
Wp3-LH	Wp3-57	40	Wp3	1

Tabelle 47: **Ergebnis der Analyse auf chimäre Sequenzen (Gr. P).**

Ergebnis der Überprüfung der Sequenzen aus Gruppe P (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 75) auf chimäre Sequenzfragmente durch DECIPHER's Find Chimera unter Angabe der betroffenen Nukleotidbereiche.

Name (Nt)	Classification/ Group/ Chimeric Region
Ap2-23 (1010)	Kosmotoga/ Thermotogae/ Anaerolineaceae (11-50), Ktedonobacteria (6-50), Deferribacterales (91-130), Nitrospiraceae (11-75), Sphingomonas (1-40), Bdellovibrionales (11-135), Desulfobacteraceae (1-125), Desulfovibrionales (11-125), Desulfuromonadales (1-125), Sorangiineae (46-125), Syntrophobacterales (11-280), Holophagae (11-55), Gp1 (6-75), Granulicella (11-75), Acidobacteria Gp3 (6-75), Acidobacteria Gp5 (11-55), Gp6 (6-75), Acidobacteria Gp22 (6-125), Gp10 (11-55), Acidobacteria Gp17 (11-55), Erysipelotrichaceae (11-50)
Ap2-25 (933)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Clostridiaceae 1 (1-150), unclassified Clostridia (46-155), Peptococcaceae 2 (46-150), Lachnospiraceae incertae sedis (46-150), unclassified Lachnospiraceae (1-150)
G1-40 (945)	Gp3/ Acidobacteria Gp3/ Rubrobacteridae (751-850), Dictyoglomi (751-850), Peptococcaceae 2 (751-945)
N1-19 (938)	Desulfovibrio/ Desulfovibrionales/ Desulfuromonadales (1-45), Spirochaetales (16-245)
N1-33 (964)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Bacillus (96-135), Bacillales Incertae Sedis X (96-135), Paenibacillaceae 1 (96-140), Clostridiaceae 1 (96-135), Peptococcaceae 2 (36-305), unclassified Lachnospiraceae (96-135)
N2-19 (712)	Syntrophaceticus/ Thermoanaerobacterales/ Peptococcaceae 2 (561-670)
N2-42 (965)	Cryptanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Thermotogae (496-965)
N3-14 (989)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Peptococcaceae 2 (46-505)
N3-18 (994)	Pelotomaculum/ Peptococcaceae 2/ Fibrobacteres (871-910), Fusobacteriales (871-910), Gp4 (871-910), Peptococcaceae 1 (866-910), Parvimonas (866-910), Clostridiales Incertae Sedis XII (866-910), unclassified Thermoprotei (871-910), unclassified

Tabelle 47: Fortsetzung

Name (Nt)	Classification/ Group/ Chimeric Region
	Euryarchaeota (871-910)
N3-37 (1000)	Pelotomaculum/ Peptococcaceae 2/ Desulfovibrionales (811-975)
Wp1-48 (985)	unclassified Peptococcaceae 2/ Peptococcaceae 2/ unclassified Chloroflexi (921-960), Dictyoglomi (921-960), Spirochaetales (836-965), Thermotogae (771-980)
Wp2-23 (1005)	Anaerobaculum/ Synergistaceae/ Coriobacteriaceae (936-975), Anaerolineaceae (936-975), unclassified Chloroflexi (936-975), Ktedonobacteria (936-975), Bdellovibrionales (936-975), Syntrophobacterales (936-975), Alteromonadaceae (936-975), unclassified Proteobacteria (936-975), Mollicutes (936-975), Alicyclobacillaceae (936-975), Bacillaceae 2 (936-975), Bacillales Incertae Sedis X (936-975), Paenibacillaceae 1 (936-975), unclassified Bacillales (936-975), Syntrophomonadaceae (936-975), Parvimonas (936-975), Acetivibrio (936-975), Flavonifractor (936-975), Saccharofermentans (936-975), Oscillibacter (936-975), Clostridium IV (936-975), unclassified Veillonellaceae (936-975), Clostridium XII (936-975), Family II (936-975), GpIV (936-975), unclassified Cyanobacteria (936-975), Family V (936-975)

Tabelle 48: **Ergebnis der Analyse auf chimäre Sequenzen (Gr. MP).**

Ergebnis der Überprüfung der Sequenzen aus Gruppe MP (siehe Abschnitt 4.4.1, S. 78) auf chimäre Sequenzfragmente durch DECIPHER's Find Chimera unter Angabe der betroffenen Nukleotidbereiche.

Name (Nt)	Classification/ Group/ Chimeric Region
Ap1-7 (1119)	un. Bacillales/ un. Bacillales/ Erysipelotrichaceae (891-1105)
Ap2-20 (1018)	Syntrophobacter/ Syntrophobacterales/ Acidimicrobinae (806-1010), un. Clostridia (671-935), Peptococcaceae 2 (606-1015)
Ap2-31-re (1060)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Thermoanaerobacterales (81-410)
Ap2-36-re (1016)	Syntrophobacter/ Syntrophobacterales/ Synergistaceae (586-1015), Thermotogae (826-1010), Halanaerobiales (876-1010)
Ap2-8 (1036)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Syntrophomonadaceae (51-385)
Ap3-9 (1007)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Synergistaceae (56-255)
G1-42 (1058)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Spirochaetales (1-1055)
G1-46 (1044)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Spirochaetales (456-1030)
G2-30 (1040)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Spirochaetales (1-285)
G2-35 (1048)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Acidobacteria Gp17 (851-1020), Peptococcaceae 2 (446-1020), un. Clostridiales (446-1020)
G2-49 (1058)	un. Thermoanaerobacteraceae/ un. Thermoanaerobacterales/ Rhodothermaceae (871-1045), Deinococci (871-1040), Gemmatimonas (871-1040)
G3-13 (1071)	un. Firmicutes/ un. Firmicutes/ Desulfovibrionales (506-1070)
G3-17 (1052)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/Synergistaceae (96-285)
G3-2 (1067)	un. Thermoanaerobacteraceae/ un. Thermoanaerobacterales/ Rhodothermaceae (871-1045), Deinococci (871-1040),

Tabelle 48: Fortsetzung

Name (Nt)	Classification/ Group/ Chimeric Region
	Gemmatimonas (871-1040)
G3-28 (1059)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Synergistaceae (861-1030)
G3-44-re (1063)	un. Desulfovibrionaceae/ un. Desulfovibrionales/ Actinomycetaceae (61-130), Rubrobacteridae (31-255), un. Chloroflexi (36-255), Ktedonobacteria (36-115), Paeni- bacillaceae 1 (31-310), un. Clostridia (21-310), Pepto- coccaceae 2 (1-310), Eubacteriaceae (21-95), Parvi- monas (31-110), Clostridiales Incertae Sedis XVI (31-120), un. Clostridiales (11-310), Thermoanaerobacterales (31-310), un. Firmicutes (31-305)
G3-45 (1099)	Petrotoga/ Thermotogae/ Spirochaetales (656-1080)
G3-8 (1027)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Desulfovibrionales (26-255), un. Deltaproteobacteria (26-210), Alteromonadaceae (26-120), Gammaproteobacteria incertae sedis (26-120)
N1-13 (1078)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Spirochaetales (316-1040)
N1-52 (1035)	un. Clostridiales/ un. Clostridiales/ Spirochaetales (51-415)
N1-60 (1075)	Tepidanaerobacter/ Peptococcaceae 2/ Spirochaetales (1-640)
N2-56 (1071)	un. Peptococcaceae 2/ Peptococcaceae 2/ Thermoanaero- bacterales (1-420)
N2-6-re (1071)	Sedimentibacter/ Parvimonas/ Peptococcaceae 2 (921-1035), Syntrophomonadaceae (921-1035)
N3-2 (1047)	Pelotomaculum/ Peptococcaceae 2/ Thermoanaerobacterales (66-290)
Wp1-27 (1087)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ un. Bacillaceae 1 (941-1060), Bacillus (941-1060), Bacillaceae 2 (941-1060), Bacillales Incertae Sedis X (941-1060), Listeriaceae (941-1060), Plano- coccaceae (941-1060), Jeotgalicoccus (941-1055), Staphylo-

Tabelle 48: Fortsetzung

Name (Nt)	Classification/ Group/ Chimeric Region
	coccus (941-1055), un. Bacillales (941-1060), Aerococcaceae (941-1060), Carnobacterium (941-1055), Trichococcus (941-1060), Enterococcaceae (941-1060), Streptococcus (941-1060), Peptococcaceae 1 (941-1060), un. Firmicutes (941-1060)
Wp1-33 (1080)	Cloacibacillus/ Synergistaceae/ un. Burkholderiales incertae sedis (886-1080), un. Clostridia (871-1050), Peptococcaceae 1 (826-1050), Peptococcaceae 2 (811-1050), Eubacteriaceae (881-1050), Parvimonas (871-1050), Clostridiales Incertae Sedis XII (871-1050), Clostridium XIVb (876-1050), un. Lachnospiraceae (886-1050), Peptostreptococcaceae (871-1050), un. Ruminococcaceae (836-1050), un. Clostridiales (831-1050)
Wp1-42-re (1083)	Kosmotoga/ Thermotogae/ Peptococcaceae 2 (36-465), Thermoanaerobacterales (36-465)
Wp1-51 (1049)	Pelotomaculum/ Peptococcaceae 2/ Synergistaceae (81-195)
Wp1-55 (1060)	Aminobacterium/ Synergistaceae/ Bacteroides (6-475), Rikenellaceae (1-475), Barnesiella (16-475), Petrimonas (1-475), Paludibacter (1-475), Parabacteroides (6-475), Porphyromonas (6-475), Proteiniphilum (1-475), un. Porphyromonadaceae (1-475), un. Prevotellaceae (11-475), un. Bacteroidales (1-480), Cytophagaceae (6-475), un. Sphingobacteriales (6-475), Bacteroidetes incertae sedis (1-475), un. Bacteroidetes (1-475), un. Cyanobacteria (6-80)
Wp3-29 (1059)	Pelotomaculum/ Peptococcaceae 2/ Synergistaceae (71-190)

Tabelle 49: **Liste der bakteriellen 16S rDNA Sequenzen.**

Die Spezies-Abkürzungen sind in der Abkürzungsliste aufgeführt. **Max:** Max Score (NCBI Datenbankabfrage), **Coverage:** Sequenzabdeckung (NCBI Datenbankabfrage), **Ident:** Sequenzidentität (NCBI Datenbankabfrage), **Dir:** Sequenzorientierung (pm: minus, pp: plus), **MP-Cl.:** MP-Cluster.

Klon	nächster Verwandter	Länge [Nt]	Max	Coverage [%]	Ident [%]	Dir	MP-Cl.
Ap1-10-re	Tace	1045	1927	99	100	pm	3
Ap1-27	Mesoinf	1060	1941	100	99	pm	5
Ap1-29	Acol	1060	1892	98	99	pm	4
Ap1-30	Tace	1061	1620	100	95	pm	32
Ap1-31	Treposteno	1077	1310	96	89	pm	2
Ap1-37-re	Desulfotothermobenz	1012	1188	100	88	pm	44
Ap1-45	Trepocald	1078	1349	100	89	pm	2
Ap1-50	Acol	962	1679	100	98	pp	4
Ap1-52	Tace	1096	1628	100	94	pm	21
Ap1-54	Acol	1094	2006	99	99	pm	4
Ap1-59	Trepocald	997	1122	99	87	pp	2
Ap1-60	CandCloacaacid	1063	1515	98	93	pm	6
Ap2-1	Syntrsulf	992	1831	99	100	pm	9
Ap2-10	Christenminuta	1006	1251	98	89	pm	46
Ap2-11	Acol	1080	1978	100	99	pm	4
Ap2-15	Tace	1075	1964	100	99	pm	3
Ap2-16	Tace	1045	1921	99	99	pm	3
Ap2-21	CandCloacaacid	1050	1489	99	92	pm	6
Ap2-27	Tace	1018	1869	100	99	pm	3
Ap2-28-re	Prolixibella	1038	1369	96	91	pm	42
Ap2-3	Treposteno	1045	1332	100	90	pm	2
Ap2-39-re	Syntrwolf	1074	1670	98	95	pm	26
Ap2-40	Syntrsulf	1024	1875	100	99	pm	9
Ap2-44	Acol	954	1762	100	100	pp	4
Ap2-45	Treposteno	996	1266	98	90	pm	2
Ap2-48	Tace	924	1661	100	99	pp	3
Ap2-5	Syntrschink	977	1463	92	96	pm	8
Ap2-53	Acol	880	1626	100	100	pm	4

Tabelle 49: Forts.

Klon	nächster Verw.	bp	Max	Cov	Id	Dir	Clu
Ap2-54	Acol	1023	1890	100	100	pm	4
Ap2-55	Mesoinf	1054	1919	100	99	pm	5
Ap2-56-re	Thermoanabacbrock	1053	1099	98	86	pm	18
Ap2-58	Tace	1056	1929	100	99	pm	3
Ap2-7	Trepocald	955	1068	99	87	pp	2
Ap2-9	CandCloacaacid	996	1408	99	92	pm	6
Ap3-10	Acol	1077	1844	94	99	pp	4
Ap3-12	Acol	1038	1906	100	99	pm	4
Ap3-17	Trepozuelz	1053	1138	98	87	pm	2
Ap3-20	Proteiniacetati	1050	1616	100	94	pm	10
Ap3-21	Acol	1045	1908	100	99	pp	4
Ap3-26	Syntrsulf	1141	2091	100	99	pm	9
Ap3-39	Syntrsulf	1068	1901	96	99	pm	9
Ap3-47	Thermoanabackeratin	1028	1074	99	86	pm	18
Ap3-49	Acol	981	1725	99	99	pp	4
Ap3-4-re	Syntrsulf	1032	1901	100	99	pm	9
Ap3-54	Ornatiliapprima	1070	1472	96	93	pm	27
Ap3-56-re	CandSoliusi	1067	1456	100	91	pm	28
Ap3-60	Caldilineaaerophila	1009	1042	100	85	pm	45
G1-1	Trepocald	1081	1360	100	89	pm	2
G1-11	Tace	1019	1866	100	99	pp	3
G1-13	Mesoinf	1115	2026	100	99	pm	5
G1-21	Damino	946	1639	98	98	pp	11
G1-24	Tace	944	1679	99	99	pp	3
G1-26	Trepocald	1091	1363	99	89	pm	2
G1-27	Tace	933	1646	99	99	pp	3
G1-35	Trepocald	1087	1367	99	90	pm	2
G1-4	Tace	1069	1947	100	99	pm	3
G1-44	CandCloacaacid	1067	1509	98	93	pm	15
G1-49	Paludipropionici	1084	1441	96	92	pm	23
G1-53	Tace	924	1629	100	99	pp	3
G1-7	Damino	1027	1847	100	99	pm	11
G2-12	Acol	969	1738	100	99	pp	4

Tabelle 49: Forts.

Klon	nächster Verw.	bp	Max	Cov	Id	Dir	Clu
G2-18	Caloramatoraustrali	983	1020	99	86	pp	13
G2-19	Mesoinf	1055	1906	99	99	pm	5
G2-24	Mesoinf	987	1779	100	99	pp	5
G2-31	Defluviitunis	1057	1901	97	100	pm	7
G2-36	Trepocald	1091	1367	99	89	pm	2
G2-43	Saccharofermaceti	1069	1500	100	92	pm	14
G2-44	Defluviitunis	974	1799	100	100	pp	7
G2-50-re	Tace	1082	1458	99	91	pm	24
G2-52	Moortheace	1062	1380	98	90	pm	31
G2-54	Trepocald	1096	1256	100	88	pp	2
G2-55	Damino	1082	1906	98	99	pp	11
G2-56-re	Proteiniacetati	1040	1587	100	94	pm	10
G2-59	Tace	1037	1877	100	99	pp	3
G2-6	Treposteno	1053	1341	99	90	pm	2
G2-60	Paenibacimuci	1064	1321	99	89	pm	29
G3-11	Acol	1017	1869	99	99	pp	4
G3-12	Tace	1040	1882	100	99	pm	3
G3-15	Damino	1000	1792	100	99	pm	11
G3-25	Defluviitunis	1081	1960	98	100	pm	7
G3-29	Treposteno	1103	1099	94	86	pm	2
G3-3	Damino	1033	1864	100	99	pm	11
G3-31	Damino	942	1635	97	99	pp	11
G3-32	Desulfotothermobenz	1058	1162	98	87	pm	34
G3-35	Mesoinf	1051	1886	100	99	pm	5
G3-37	Trepocald	1072	1347	99	89	pm	2
G3-39-re	Trepocald	1079	1367	100	90	pm	2
G3-46	Peloiso	1073	1685	96	96	pm	1
G3-50-re	Anaerothermo	1030	1175	100	87	pm	43
G3-55	Saccharofermaceti	1039	1445	99	92	pm	14
G3-9	Caloramatoraustrali	958	955	99	85	pp	13
N1-1	Tace	1040	1899	100	99	pm	3
N1-10-re	Damino	1036	1864	100	99	pm	11
N1-12	Tace	1061	1578	100	94	pm	17

Tabelle 49: Forts.

Klon	nächster Verw.	bp	Max	Cov	Id	Dir	Clu
N1-15	Treposteno	1052	1328	99	90	pm	2
N1-16	Damino	956	1655	97	99	pp	11
N1-20	Trepocald	1084	1367	99	90	pm	2
N1-21	Mesoinf	1076	1954	100	99	pm	5
N1-25	Tace	1011	1851	100	99	pm	3
N1-26	Sedimentisaal	1065	1605	95	95	pm	12
N1-3	Treposteno	1023	1303	100	90	pm	2
N1-30	Sedimentisaal	1063	1613	95	95	pm	12
N1-31	Proteiniacetati	1025	1598	100	95	pm	10
N1-34	Tace	1045	1882	99	99	pm	3
N1-35	Tace	1043	1888	100	99	pm	3
N1-4	Proteiniacetati	1046	1598	100	94	pm	10
N1-42	Tace	1056	1932	99	99	pm	3
N1-44	Acol	974	1790	99	99	pp	4
N1-45	Damino	956	1626	97	98	pp	11
N1-48	Defluviitunis	1031	1862	98	99	pm	7
N1-5	Tace	1074	1596	100	94	pm	17
N1-53	Tace	1047	1905	100	99	pm	3
N1-55	Damino	956	1639	97	98	pp	11
N1-58	Moorthiace	1075	1131	98	86	pm	13
N1-6	Sedimentisaal	1075	1635	95	95	pm	12
N1-9	Treposteno	1039	1321	100	90	pm	2
N2-10	Peloiso	1075	1539	96	94	pm	25
N2-11	Damino	993	1722	99	98	pp	11
N2-12	Tace	1098	1709	99	95	pm	3
N2-14	Acol	1106	2032	100	99	pm	4
N2-15	Sphaeropleo	919	917	99	85	pm	48
N2-18-re	Sphaeroglobo	1050	1901	100	99	pm	37
N2-2	Peloiso	1081	1690	95	96	pm	1
N2-21	Defluviitunis	868	1519	96	99	pm	7
N2-28	Peloiso	1061	1653	95	96	pm	1
N2-3	Synterschink	1104	1642	92	96	pm	8
N2-34	Thermacephae	862	1275	100	93	pm	8

Tabelle 49: Forts.

Klon	nächster Verw.	bp	Max	Cov	Id	Dir	Clu
N2-36	Thermacephae	1011	1495	100	93	pm	8
N2-38	Damino	1023	1845	100	99	pm	11
N2-39	Caloramatoraustrali	972	981	100	85	pp	13
N2-4	Tace	1068	1940	100	99	pm	3
N2-5	Trepocald	797	902	100	87	pp	2
N2-50-re	Saccharofermaceti	1048	1472	99	92	pm	14
N2-52	CandCloacaacid	747	1064	100	93	pm	15
N2-7	Thermacephae	1063	1363	99	90	pm	30
N2-9	Thermacephae	1091	1448	95	92	pm	22
N3-10	Peloiso	1084	1679	95	96	pm	1
N3-12	Sedimentihyd	1063	1572	95	94	pm	12
N3-15	Cryptphenol	950	1439	99	94	pp	1
N3-16	Cryptphenol	961	1421	99	94	pp	1
N3-17	Cryptphenol	1060	1448	98	92	pm	33
N3-21	CandCloacaacid	1020	1441	99	92	pm	15
N3-23	Anaerobacmobile	1041	1399	100	91	pm	41
N3-30	Peloiso	1083	1688	95	96	pm	1
N3-31-re	Thermacephae	1049	1572	99	94	pm	8
N3-34	Moorthiace	1057	1441	100	91	pm	35
N3-35	Peloiso	1066	1666	95	96	pm	1
N3-38	Sphaeropleo	1044	1199	99	88	pm	39
N3-40	Peloiso	1056	1659	95	96	pm	1
N3-44	Acol	912	1646	100	99	pp	4
N3-45	Syntschink	1044	1554	91	96	pm	8
N3-46-re	Moorthiace	1070	1107	98	86	pm	13
N3-47	Damino	998	1236	100	89	pm	47
N3-4-re	Peloiso	1045	1646	96	96	pm	1
N3-5	Damino	958	1668	97	99	pp	11
N3-50	Trepocald	1095	1378	99	90	pm	2
N3-53	Defluviitunis	1052	1890	97	100	pm	7
N3-55	Cryptphenol	1032	1535	97	94	pp	1
N3-58	Cryptphenol	1026	1489	98	93	pp	1
N3-60	Cryptphenol	931	1380	99	94	pp	1

Tabelle 49: Forts.

Klon	nächster Verw.	bp	Max	Cov	Id	Dir	Clu
N3-7	Moorthiace	1039	1081	99	86	pm	13
Wp1-1	Proteiniacetati	1045	1541	100	93	pm	19
Wp1-11	Tace	915	1631	100	99	pp	3
Wp1-2	Christenminuta	1101	1247	98	87	pm	20
Wp1-22-re	Acol	1056	1781	99	97	pm	4
Wp1-26	Ornatiliapprema	1061	1437	96	92	pm	16
Wp1-3	Tace	984	1760	99	99	pp	3
Wp1-30	Cloacibaciporcorum	1050	1483	96	93	pm	38
Wp1-31	Peloiso	1069	1679	96	96	pm	1
Wp1-4	Acol	851	1515	100	99	pp	4
Wp1-44	Cryptphenol	1012	1472	100	93	pp	1
Wp1-46	Peloschi	1074	1530	93	94	pm	1
Wp1-5	Cryptphenol	1033	1498	97	94	pp	1
Wp1-52	Proteiniacetati	1048	1602	100	94	pm	10
Wp1-57	Mesoinf	1064	1921	100	99	pm	5
Wp1-58-re	Tace	1081	1773	99	96	pm	3
Wp1-6	Tace	1031	1805	100	98	pp	3
Wp1-7-re	Defluviitunis	1061	1895	96	99	pm	7
Wp1-8	Proteiniacetati	1034	1530	99	93	pm	19
Wp2-1	Peloiso	1079	1683	95	96	pm	1
Wp2-12	Tace	1041	1890	100	99	pm	3
Wp2-14	Peloiso	1049	1631	95	96	pm	1
Wp2-17	CandCloacaacid	1011	1077	93	92	pp	6
Wp2-18	Ornatiliapprema	1028	1421	97	92	pm	16
Wp2-22	Peloschi	1055	1182	94	88	pm	36
Wp2-25	Defluviitunis	939	1688	99	99	pp	7
Wp2-31	Mesoinf	1051	1901	99	99	pm	5
Wp2-32	Acol	908	1653	100	99	pp	4
Wp2-39	Peloschi	1055	1356	94	91	pm	1
Wp2-43	Tace	923	1639	100	99	pp	3
Wp2-7	Peloiso	1058	1650	96	96	pm	1
Wp2-9	Acol	1062	1953	99	99	pm	4
Wp3-12	Acol	968	1788	100	100	pp	4

Tabelle 49: Forts.

Klon	nächster Verw.	bp	Max	Cov	Id	Dir	Clu
Wp3-15	Acol	1048	1927	99	99	pm	4
Wp3-1-re	CandCloacaacid	1067	1504	98	93	pm	6
Wp3-20	Peloiso	1044	1637	96	96	pm	1
Wp3-25	CandCloacaacid	1039	1487	100	93	pm	6
Wp3-26	Tace	1026	1857	100	99	pp	3
Wp3-3	Peloiso	1047	1650	96	96	pm	1
Wp3-30	Cryptphenol	1051	1509	100	93	pm	1
Wp3-34	Peloiso	1042	1624	95	96	pm	1
Wp3-35	Cryptphenol	932	1334	99	93	pp	1
Wp3-37	Peloschi	1074	1507	93	94	pm	1
Wp3-40-re	Ornatiliapprima	1024	1417	97	92	pm	16
Wp3-42-re	Mesoinf	1096	1997	100	99	pm	5
Wp3-44	Cryptphenol	1043	1600	99	94	pm	1
Wp3-45	Peloiso	1074	1653	95	96	pm	1
Wp3-5	Tace	947	1661	99	99	pp	3
Wp3-50	Tace	1033	1884	99	99	pm	3
Wp3-53	Defluviitunis	1039	1890	98	100	pm	7
Wp3-55	CandCloacaacid	1027	1454	99	92	pm	6
Wp3-56	CandCloacaacid	1032	1467	100	92	pm	6
Wp3-57	Anaerobacmobile	1044	1812	100	98	pm	40
Wp3-60	CandCloacaacid	1021	1469	100	93	pm	6
Wp3-7	Peloiso	1055	1637	95	96	pm	1

Tabelle 50: **ARDRA-Auswertung archaeller 16S rDNA-Klone.**

Gel-Bilder ab S. 170, Gr.-Klon: sequenzierter Gruppenklon.

ARDRA-Gr.	Gr.-Klon	nächster Verwandter	Anzahl
N2-A-ar	N2-1-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	2
N2-B-ar	N2-2-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	1
N2-C-ar	N2-3-ar	<i>Methanobacterium petrolearium</i>	1
N2-D-ar	N2-4-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	1
N2-E-ar	N2-5-ar	<i>Methanosarcina mazei</i>	7
G2-A-ar	G2-1-ar	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i>	1
G2-B-ar	G2-10-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1
G2-C-ar	G2-11-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1
G2-D-ar	G2-2-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1
G2-E-ar	G2-3-ar	<i>Treponema caldaria</i>	1
G2-F-ar	G2-4-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1
G2-G-ar	G2-5-ar	<i>Treponema caldaria</i>	1
G2-H-ar	G2-6-ar	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	1
G2-I-ar	G2-7-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1
G2-J-ar	G2-8-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	3
Wp2-A-ar	Wp2-2-ar	<i>Methanosarcina horonobensis</i>	1
Wp2-B-ar	Wp2-3-ar	<i>Methanosarcina vacuolata</i>	9
Wp2-C-ar	Wp2-7-ar	<i>Methanosarcina thermophila</i>	1
Ap2-A-ar	Ap2-1-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1
Ap2-B-ar	Ap2-11-ar	<i>Methanosaeta concilii</i>	1
Ap2-C-ar	Ap2-2-ar	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	4
Ap2-D-ar	Ap2-4-ar	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	1
Ap2-E-ar	Ap2-5-ar	<i>Treponema caldaria</i>	4
Ap2-F-ar	Ap2-8-ar	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	1

Berechnung der Abbildung 39 (unten) Für eine chemische Reaktion wie beispielsweise $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$ besteht zwischen der Änderung der Freien Energie ΔG und den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer folgende Beziehung:

Berechnung der Änderung der Freien Energie ΔG einer Reaktion

$$\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

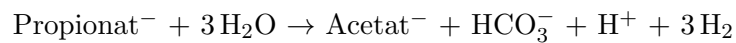
Nach Zinder (1984) ergibt sich bei 37 °C und pH 7 folgende vereinfachte Gleichung:

Berechnung der Änderung der Freien Energie $\Delta G'$ bei 37°C und pH 7

$$\Delta G' = \Delta G^{0'} + 5,94 \log \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

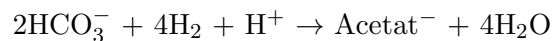
Zinder (1984) definierte für die Berechnung von $\Delta G'$ in anaeroben Bioreaktoren (im Rahmen dieser Arbeit als $\Delta G^{\text{öko}}$ bezeichnet) folgende Bedingungen: 37°C Fermenter-Temperatur, pH 7, 1 mM Acetat und Propionat, 20 mM HCO_3^- , 0,6 atm CH_4 sowie 10^{-4} atm H_2 . Damit ergeben sich für die Propionat-Oxidation, die Acetat-Oxidation, die Homoacetogenese und die hydrogenotrophe sowie acetiklastische Methanogenese folgende Werte für $\Delta G'$ (bzw. $\Delta G^{\text{öko}}$):

Reaktion A: Reaktion der Propionat-Oxidation



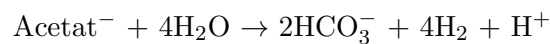
$$\Delta G' = +76,1 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,001 \cdot 0,02 \cdot (10^{-4})^3}{0,001} = -5,3 \text{ kJ/Reaktion}$$

Reaktion B: Reaktion der autotrophen Homoacetogenese



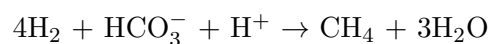
$$\Delta G' = -104,6 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,001}{0,02^2 \cdot (10^{-4})^4} = -7,2 \text{ kJ/Reaktion}$$

Reaktion C: Reaktion der syntrophen Acetat-Oxidation



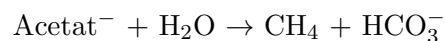
$$\Delta G' = +104,6 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,02^2 \cdot (10^{-4})^4}{0,001} = +7,2 \text{ kJ/Reaktion}$$

Reaktion D: Reaktion der hydrogenotrophen Methanogenese



$$\Delta G' = -135,6 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,6}{0,02 \cdot (10^{-4})^4} = -31,8 \text{ kJ/Reaktion}$$

Reaktion E: Reaktion der acetiklastischen Methanogenese



$$\Delta G' = -31,0 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,6 \cdot 0,02}{0,001} = -24,6 \text{ kJ/Reaktion}$$

(Reaktionsgleichungen und Werte für $\Delta G^{0'}$ aus Thauer et al. (1977))

Behandelt man den Wasserstoffpartialdruck als Variable, so lassen sich für die gezeigten Reaktionen Gleichungen mit einer Variablen aufstellen. Beispielsweise

ergibt sich für die Berechnung von $\Delta G'$ der Propionat-Oxidation:

Berechnung von $\Delta G'$ der Propionat-Oxidation bei variablem $p[H_2]$

Gleichung A:

$$\Delta G' = +76,1 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,001 \cdot 0,02 \cdot \mathbf{X}^3}{0,001}$$

In Abbildung 39 (unten) wurde die Freie Energie pro Mol Propionat der vollständigen Propionat-Oxidation in Syntrophie dargestellt. Dem Modell entsprechend (vgl. Abbildung 38, S. 120), können während der Verwertung von 8 Mol Propionat die hydrogenotrophe und die acetiklastische Methanogenese jeweils **siebenmal** ablaufen, die syntrophe Acetat-Oxidation **viermal** und die autotrophe Homoacetogenese **dreimal**. Insofern wurden die Gleichungen zur Berechnung der Werte für $\Delta G'$ (bzw. $\Delta G^{\text{öko}}$) entsprechend auf die Berechnung *pro Mol Propionat* angepasst:

Gleichung A:

Berechnung von $\Delta G'$ der Propionat-Oxidation bei variablem $p[H_2]$

$$\Delta G' = +76,1 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,001 \cdot 0,02 \cdot \mathbf{X}^3}{0,001}$$

Gleichung B:

Berechnung von $\Delta G'$ der autotrophen Homoacetogenese bei variablem $p[H_2]$

$$\Delta G' = -104,6 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,001}{0,02^2 \cdot \mathbf{X}^4} \cdot \frac{3}{8}$$

Gleichung C:

Berechnung von $\Delta G'$ der syntrophen Acetat-Oxidation bei variablem $p[H_2]$

$$\Delta G' = +104,6 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,02^2 \cdot \mathbf{X}^4}{0,001} \cdot \frac{4}{8}$$

Gleichung D:

Berechnung von $\Delta G'$ der hydrogenotrophen Methanogenese bei variablem $p[H_2]$

$$\Delta G' = -135,6 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,6}{0,02 \cdot \mathbf{X}^4} \cdot \frac{7}{8}$$

Gleichung E:

Berechnung von $\Delta G'$ der acetiklastischen Methanogenese bei variablem $p[H_2]$

$$\Delta G' = -31,0 \text{ kJ/Rkt} + 5,94 \log \frac{0,6 \cdot 0,02}{0,001} \cdot \frac{7}{8}$$

8 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta G^{0'}$	Caldilineaaerophila
Freie Energie unter biochemischen Standardbedingungen	<i>Caldilinea aerophila</i>
$\Delta G^{öko}$	Caloramatoraustrali
Freie Energie für anoxische Ökosysteme nach (Zinder, 1984)	<i>Caloramator australicus</i>
Acol	CandCloacaacid
<i>Aminobacterium colombiense</i>	<i>Candidatus</i> "Cloacamonas acidaminovorans"
Anaerobacmobile	CandSoliusi
<i>Anaerobaculum mobile</i>	<i>Cand. Solibacter usitatus</i>
Anaerothermo	Christenminuta
<i>Anaerolinea thermophila</i>	<i>Christensenella minuta</i>
Ap1a	Cloacibaciporcorum
Propionat-verwertende Anreicherungskultur	<i>Cloacibacillus porcorum</i>
ARDRA	Cryptphenol
Amplified ribosomal DNA restriction analysis	<i>Cryptanaerobacter phenolicus</i>
ATP	Damino
Adenosintriphosphat	<i>Desulfovibrio aminophilus</i>
BGA	Defluviitunis
Biogasanlage	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>
BGR	DEPC
Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe	Diethylpyrocarbonat
BMWi	Desulfotothermobenz
Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie	<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>
Bp	DIW
Basenpaare	Deutsches Institut für Wirtschaftsforschung e. V.
BP	dNTP
BP p.l.c.	Desoxynukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
bzw.	EU
beziehungsweise	Europäische Union
	F13
	Propionat-verwertende Anreicherungskultur

FISH

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FNRFachagentur Nachwachsende Rohstoffe
e. V.**G12**Propionat-verwertende Anreicherungskul-
tur**G7**Zusammenschluss sieben bedeutender In-
dustriationen**G113**Propionat-verwertende Anreicherungskul-
tur**HPLC**

High pressure liquid chromatography

Ident

Sequenzidentität

IEA

International Energy Agency

IMWInstitut für Mikrobiologie und Weinför-
schung**IPCC**Intergovernmental Panel on Climate
Change**Mesoinf***Mesotoga infera***Moorthiace***Moorella thermoacetica***MW, kW**

Megawatt, Kilowatt

N12Propionat-verwertende Anreicherungskul-
tur**N13**Propionat-verwertende Anreicherungskul-
tur**NawaRo**

nachwachsende Rohstoffe

NCBINational Center for Biotechnology Infor-
mation**Nt**

Nukleotide

Ornatiliapprima*Ornatilinea apprima***Paenibacimuci***Paenibacillus mucilaginosus***Paludipropionici***Paludibacter propionicigenes***PAS**

Protein-Domäne mit Sensor-Funktion

PCR

Polymerase chain reaction

Peloiso*Pelotomaculum isophthalicum***Peloschi***Pelotomaculum schinkii***PES**

Polyethersulfon

PI-Medium

Propionat-haltiges Nährmedium

Pr

Propionat/ Propionsäure

Prolixibella*Prolixibacter bellariivorans***Proteiniacetati***Proteiniphilum acetatigenes***qPCR**

quantitative PCR

RF	Reaktorfiltrat	Syntroschink	<i>Syntrophaceticus schinkii</i>
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	Syntrosulf	<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>
Rkt.	Reaktion	Syntrowolf	<i>Syntrophomonas wolfei</i>
S.	Seite	Tace	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>
s. o.	siehe oben	Thermacephae	<i>Thermacetogenium phaeum</i>
s. S.	siehe Seite	Thermoanabacbrock	<i>Thermoanaerobacter brockii</i>
s. u.	siehe unten	Thermoanabackeratin	<i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i>
S1	Propionat-verwertende Anreicherungskultur	Trepocald	<i>Treponema caldaria</i>
S2	Propionat-verwertende Anreicherungskultur	Treposteno	<i>Treponema stenostrepta</i>
Saccharofermaceti	<i>Saccharofermentans acetigenes</i>	Trepozuelz	<i>Treponema zuelzeriae</i>
SAOB	syntroph Acetat oxidierende Bakterien	u. a.	unter anderem
Sedimentihyd	<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i>	VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Sedimentisaal	<i>Sedimentibacter saalensis</i>	vgl.	vergleiche
Sphaeroglobo	<i>Sphaerochaeta globosa</i>	Wp2a	Propionat-verwertende Anreicherungskultur
Sphaeropleo	<i>Sphaerochaeta pleomorpha</i>	z. B.	zum Beispiel
		z. Z.	zur Zeit

