

Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reduktion des Methanschlupfes von Gasaufbereitungsanlagen mittels Einsatz methanotropher Mikroorganismen

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

AM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

Julia Reuß
geboren am 09. März 1984 in Bamberg

MAINZ, JANUAR 2015

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	11
2 Einleitung	13
2.1 Erneuerbare Energien in Deutschland	13
2.2 Nutzung von Biogas aus Biomasse	15
2.3 Biogasaufbereitung und die Problematik des Methanschlupfes	17
2.4 Methan als Treibhausgas	18
2.5 Abbau von Methan durch methanotrophe Bakterien	19
2.5.1 Systematische Einteilung methanotropher Bakterien	19
2.5.2 Zentrale Stoffwechselwege	21
2.5.3 Gliederung methanotropher Bakterien in Typ I, Typ II und Typ X	23
2.6 Termiten als natürliche Methanquelle	24
2.6.1 Systematische Einordnung von Termiten	24
2.6.2 Der Abbau von Holz durch Termiten	25
2.6.3 Der Termitendarm und dessen mikrobielle Flora	26
2.7 Ziele der Arbeit	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Organismen	29
3.2 Mikrobiologische Methoden	32
3.2.1 Nährmedien und Kulturbedingungen	32
3.2.2 Isolierung von methanoxidierenden Bakterien	33
3.2.3 Zellzahlbestimmung	34
3.2.4 Überprüfung des Wachstums anhand der optischen Dichte	34
3.2.5 Medienoptimierung	34

3.3 Umweltproben	35
3.4 Termiten	36
3.4.1 Präparation von Termitendärmen	36
3.4.2 Bestimmung von Körper- und Darmgewicht sowie Darmvolumen	36
3.5 Chemikalien und Gase	36
3.6 Enzyme, Biochemikalien und Kits	38
3.7 Geräte und Hilfsmittel	39
3.8 Analytische Methoden	40
3.8.1 Methanbestimmung durch Gaschromatographie	40
3.8.2 Bestimmung des Gehalts an Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB) durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	41
3.8.2.1 Isolierung von PHB aus Zellen methanotropher Bakterien	42
3.8.2.2 Bestimmung des PHB-Gehalts	42
3.8.3 MALDI-TOF-MS	43
3.8.4 Analyse der zellulären Fettsäuren	44
3.9 Molekularbiologische Methoden	44
3.9.1 DNA-Extraktion	44
3.9.2 PCR-Methoden	45
3.9.2.1 Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA	45
3.9.2.2 Amplifikation der für methanotrophe Bakterien spezifischen <i>pmoA</i> - Gensequenz	47
3.9.2.3 Amplifikation der <i>nifH</i> -Gensequenz	48
3.9.2.4 Amplifikation der <i>sMMO</i> -Gensequenz	50
3.9.2.5 (Nested) Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR	51
3.9.2.6 Real-Time-quantitative-PCR	54
3.9.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	55

INHALTSVERZEICHNIS

3.9.4	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese	56
3.9.5	Agarose-Gelelektrophorese	58
3.9.6	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen und PCR-Aufreinigung	59
3.9.7	Klonierung	59
3.9.8	Sequenzierung und Sequenzanalyse	62
3.10	Physiologische Untersuchungen	62
3.10.1	Nachweis der Ausbildung der sMMO	62
3.10.2	Zellwandstabilität gegenüber SDS	62
3.10.3	Toleranz gegenüber NaCl	63
3.10.4	Temperaturoptimum und -toleranz	63
3.10.5	pH-Optimum und -toleranz	63
3.10.6	Verwertbare Kohlenstoffquellen	63
3.10.7	Verwertbare Stickstoffquellen	64
3.10.8	Hitzeresistenz	64
3.11	Untersuchungen zur Formiatausscheidung von methanotrophen Bakterien	64
3.11.1	Formiatnachweis	64
3.11.2	Zusatz von Formiatanaloga	65
3.11.3	Einsatz von artifiziellen Elektronenakzeptoren	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Verbreitung von methanoxidierenden Bakterien in verschiedenen Habitaten	66
4.2	Inhomogene Verteilung der bakteriellen Mikroflora im Termitendarm	69
4.3	Methanotrophe Bakterien im Intestinaltrakt verschiedener Termiten	70
4.3.1	Nachweis durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	70
4.3.2	Nachweis durch <i>pmoA</i> -spezifische Primer	71
4.3.3	Nachweis mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)	73

4.3.3.1	Gewichtsbestimmung der verwendeten Termiten	73
4.3.3.2	Verteilung der Gesamtzellzahl und von MOB im Termitendarm . . .	74
4.4	Isolierung methanoxidierender Bakterien aus dem Termitendarm	75
4.4.1	Überprüfung der Reinheit der Isolate	76
4.5	Systematische Zuordnung der methanabbauenden Isolate	77
4.5.1	16S rDNA-Gensequenzen der methanotrophen Termitenisolate	77
4.5.2	Specifically amplified polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) und nested specifically amplified polymorphic DNA-PCR (nSAPD-PCR)	78
4.5.3	Fettsäuremuster der methanoxidierenden Termitenisolate	79
4.5.4	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-time of flight massen- spektroskopische (MALDI-TOF-MS)-Analysen	80
4.6	Morphologische und physiologische Merkmale methanoxidierender Isolate aus dem Termitendarm	81
4.6.1	Morphologische Untersuchungen	81
4.6.2	Produktion von Poly- β -Hydroxybuttersäure	84
4.6.3	Temperatur-Toleranz und -Optimum	84
4.6.4	pH-Toleranz und -Optimum	89
4.6.5	Ausbildung der sMMO	91
4.6.6	Stickstofffixierung	91
4.6.7	Verwertung von Stickstoffquellen	92
4.6.8	Verwertung von Kohlenstoffquellen	93
4.6.9	Toleranz gegenüber NaCl	93
4.6.10	Zellwandstabilität gegenüber SDS	93
4.7	Einsatz der Isolate in Biogasaufbereitungsanlagen	94
4.7.1	Reaktorkonstruktion	94
4.7.2	Medienoptimierung zum erhöhten Methanabbau	97
4.8	Rückgewinnung des Intermediats Formiat als energiereiches Substrat	98

INHALTSVERZEICHNIS

5 Diskussion	100
5.1 Methanquellen und die Präsenz von methanoxidierenden Bakterien	100
5.2 Differenzierende Methanabbauraten	103
5.3 Methanotrophe Isolate aus den Termiten <i>Neotermes castaneus</i> , <i>Incisitermes marginipennis</i> und <i>Mastotermes darwiniensis</i> als neue <i>Methylocystis</i> -Arten?	104
5.4 Reduktion des Methanschlupfes in Biogasaufbereitungsanlagen durch methanoxidierende Termitenisolate	109
5.5 Ausblick	113
6 Literatur	115
A Abkürzungsverzeichnis	128
B Veröffentlichungen und Präsentationen	130
C Lebenslauf	131
D Danksagung	132

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein biologisches Verfahren zur Reduzierung des Methanschlupfes in Gasaufbereitungsanlagen entwickelt. Der Methanschlupf entsteht, wenn das in Biogasanlagen produzierte Biogas auf normierte Erdgasqualität aufgereinigt wird, welches notwendig ist, um es in das bestehende Erdgasnetz einleiten zu können. Bei dieser Aufreinigung wird aus dem Biogas auch ein Teil des Methans mit ausgewaschen und gelangt mit dem Abgas der Gasaufbereitungsanlage in die Umwelt. Bisher wird dieses methanhaltige Abgas verbrannt, da eine Freisetzung des starken Treibhausgases Methan durch das Erneuerbare-Energien-Gesetz untersagt ist. Dies reduziert die ökologische Bilanz und setzt die Wirtschaftlichkeit der gesamten Biogasanlage herab.

Um das Methan mit Hilfe eines biologischen Verfahrens zu entfernen, wurden zunächst methanoxidierende Bakterien (MOB) aus verschiedenen Habitaten isoliert, darunter auch erstmalig aus Termiten. Der Nachweis erfolgte durch (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung anhand spezifischer Primer bzw. Sonden für das Gen der partikulären Methanmonooxygenase, ein MOB kennzeichnendes Enzym. Ihr Titer wurde durch qPCR auf 10^2 - 10^3 MOB pro Termitendarm durch qPCR bestimmt. Mit Hilfe einer 16S rDNA Sequenzierung, der (n)SAPD-PCR, der Bestimmung der zellulären Fettsäurezusammensetzung sowie MALDI-TOF-MS-Analysen konnten die Termitenisolate der Gattung *Methylocystis* zugeordnet werden. Die fehlende Artzuweisung spricht jedoch für die Isolierung einer neuen Art.

Für den Einsatz der Isolate in Gasaufbereitungsanlagen wurde in Zusammenarbeit mit dem Prüf- und Forschungsinstitut in Pirmasens ein Reaktor im Technikumsmaßstab entwickelt und konstruiert. Der Reaktor wurde mit synthetischen Aufwuchskörper befüllt, diese mit einem neu gewonnenen potenten Termitenisolat besiedelt und der methanhaltige Abgasstrom der Gasaufbereitungsanlage darüber geleitet. Es wurde eine Reduktion des Methans um 68 % innerhalb von 30 Stunden erzielt. Medienoptimierungen wiesen das Potential auf, diesen Verbrauch um das bis zu 4-fache weiter zu steigern. Da durch die Oxidation des Methans im Abgasstrom der Gasaufbereitungsanlage Zellmasse und Polyhydroxybuttersäure (PHB) aufgebaut wurde, können diese als Substrat zurück in die Biogasanlagen geleitet werden und die Wirtschaftlichkeit weiter verbessern. Die Wirksamkeit des in diesem Projekt entwickelten Verfahrens wurde somit eindeutig demonstriert.

Abstract

In the scope of this work, a biological process for reducing the methane loss in gas upgrading plants was developed. So far, since the German Renewable Energies Act (EEG) prohibits the release of the strong greenhouse gas methane, methane-containing exhaust gas is burnt. This is inconsistent with the environmental issues and cuts down the economic efficiency of the entire biogas plant.

For a biological removal of methane, initially methane oxidizing bacteria (MOB) were isolated from different habitats. For the first time these microorganisms were isolated from termite guts. Evidence was provided by (quantitative real-time)PCR and fluorescent in situ hybridization using specific primers and probes, respectively, for the gene of the particulate monooxygenase, an enzyme characteristically for methanotrophic bacteria. The cell count was determined to $10^2 - 10^3$ MOB per termite gut using quantitative real-time PCR. By using 16S rDNA sequencing, (nested)specifically amplified polymorphic DNA ((n)SAPD)-PCR, MALDI-TOF-MS and analyses of the cellular fatty acid composition, the isolates from termite guts could be assigned to the genus *Methylocystis*. The lacking affiliation to a certain species indicates the isolation of a new species. For the application of the isolates in gas upgrading plants a reactor in semitechnical scale was developed and constructed in collaboration with the Test and Research Institute Pirmasens. The reactor was filled with growth bodies, colonized with a newly gained potent termite isolate and the methane containing waste gas from the gas upgrading plant was passed through. A reduction of methane of up to 68 % within 30 hours was achieved. Media optimizations revealed the potential of increasing this methane uptake up to fourfold.

The oxidation of methane resulted in the formation of cell mass and polyhydroxy-butyric acid (PHB) which can be returned to biogas plants as substrates. Thus, the economic efficiency is improved additionally. Hence, the effectiveness of the biological process developed in this project was clearly demonstrated.

2 Einleitung

2.1 Erneuerbare Energien in Deutschland

In den vergangenen 130 Jahren hat sich der durchschnittliche Energieverbrauch um das 16-fache erhöht (BMU, 2011). 2013 wurden 88,5 % dieses Energieverbrauchs durch Verwertung fossiler Brennstoffe wie Erdöl, Kohle oder Erdgas gedeckt (Abb. 1).

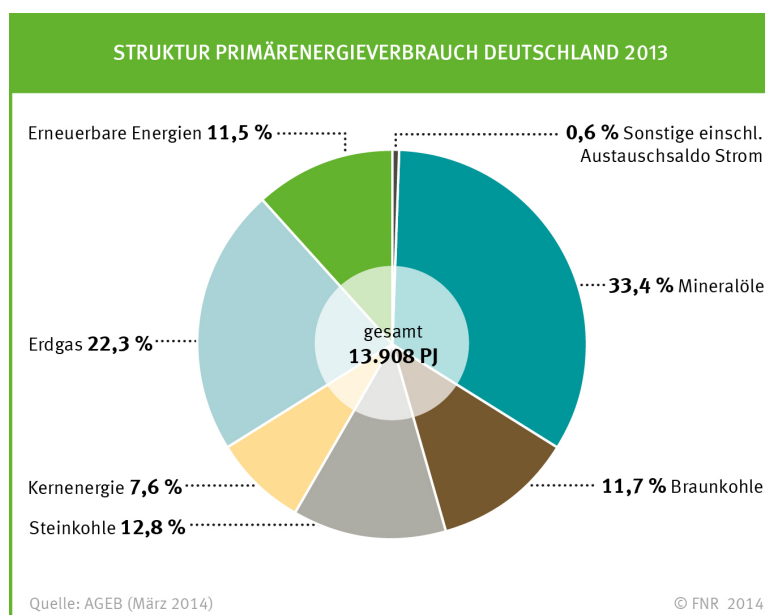


Abb. 1: Energiequellen in Deutschland. Quelle: FNR (2014c).

Die Nutzung dieser traditionellen Energieträger führt zu einer erheblichen Belastung der Umwelt und die begrenzte Verfügbarkeit dieser Rohstoffe stellt zudem die Wirtschaft und somit die ganze Gesellschaft vor Probleme. Das Maximum der Erdölförderung wurde bereits 2005 erreicht (MURRAY und KING, 2012) und nach Berechnungen der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR, 2009) reichen die Erdölvorkommen etwa 40 Jahre, wobei eine exakte Kalkulation durch die Entwicklung neuer Technologien und die mögliche Entdeckung neuer Rohstofffelder schwierig ist. Die Nutzung von Kernbrennstoffen wie beispielsweise Uran birgt ebenso das Problem der Ressourcenbegrenzung (Abb. 2) und durch die hohen gesundheitlichen Risiken, wie zuletzt das Reaktorunglück in Fukushima 2011 gezeigt hat, verliert diese zunehmend an Akzeptanz in der Bevölkerung.

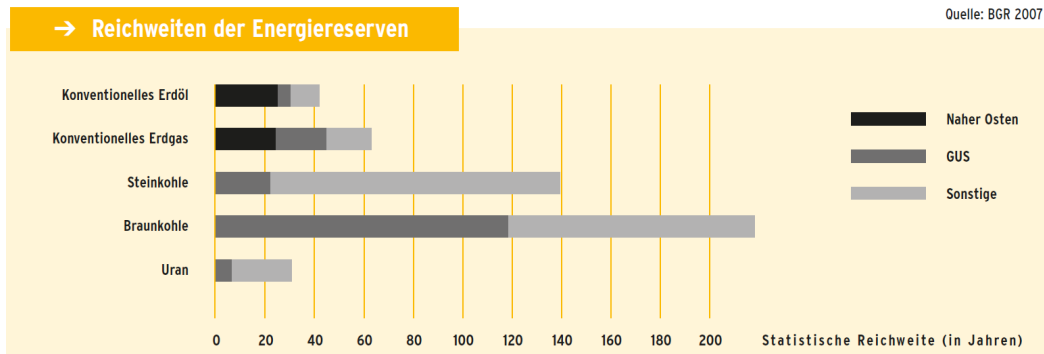


Abb. 2: Energiekraftstoffe und deren Limitierung in Jahren. Quelle: BMU (2011).

Als Folge des Zwischenfalls von Fukushima wurde von der Bundesregierung ein rascher Ausstieg aus der Kernenergie vorangetrieben (DREIZEHNTES GESETZ ZUR ÄNDERUNG DES ATOMGESETZTES, 2011) und die Förderung der Energiewende beschleunigt. Die Umsetzung dieser nachhaltigen Energieversorgung sieht u.a. die Subvention von erneuerbaren Energien (EE) wie Wind- und Wasserkraft, Solarenergie, Geothermie und Biomasse vor, wobei letztere den größten Teil an den EE repräsentiert (Abb. 3).

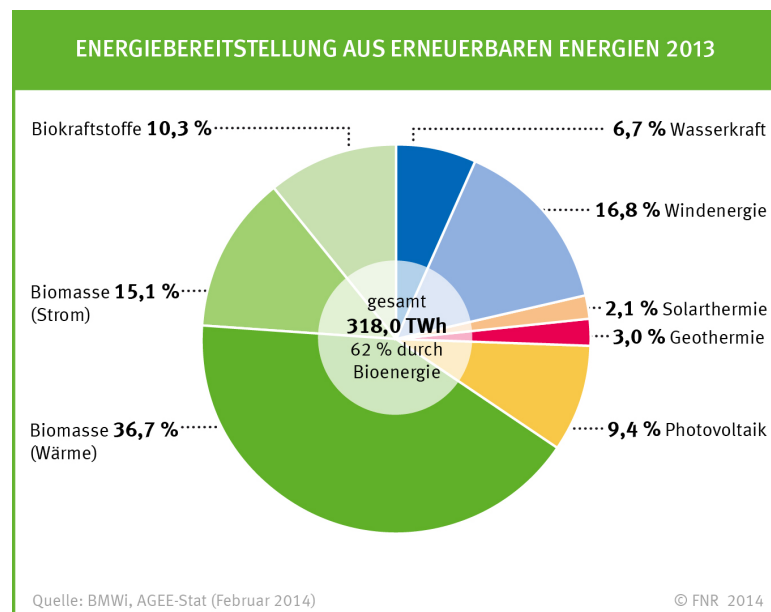


Abb. 3: Nutzungsanteil verschiedener erneuerbarer Energien. Quelle: FNR (2014b).

Zur energetischen Nutzung der Biomasse wird diese in Biogasanlagen zu Biogas umgesetzt. Hierbei weist ein Normkubikmeter Biogas einen Energiegehalt von 5 - 7,5 kWh auf. Dieser Wert schwankt aufgrund des unterschiedlichen Methangehalts im Biogas, der wiederum vom eingesetzten Substrat abhängig ist. Methan weist einen Heizwert von 9,97 kWh/Nm³ auf. Bei einem durchschnittlichen Methangehalt von 60 %, hat dieses Biogas einen Heizwert von etwa 6 kWh/Nm³ und es könnten hiermit 0,6 l Heizöl eingespart werden (KTBL, 2009; FNR, 2011). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden Biogasanlagen meist unmittelbar an Blockheizkraftwerke gekoppelt, die aus Biogas Strom sowie über Kraft-Wärmekopplungstechnik Wärme und Kälte erzeugen können, wenn der Methananteil des Biogases mind. 45 % beträgt. Problematisch hierbei ist die Lage vieler Biogasanlagen außerhalb geschlossener Ortschaften und somit fehlender Abnehmer der thermischen Energie, so dass ein Anschluss über sogenannte Nahwärmenetze häufig nicht ökonomisch gestaltet werden kann. Durch die Reformierung des EEG wird nun die Aufbereitung von Biogas auf Erdgasqualität gefördert, um dieses in das bestehende Erdgasnetz einbringen zu können und somit zum einen transport-, zum anderen aber auch, im Gegensatz etwa zur Windenergie, speicherfähig zu machen (FNR, 2010; DENA, 2013). Die Menge an Biogas, die 2014 in Deutschland produziert wurde, entspricht etwa 20 % der Erdgasimportmenge aus Russland, wobei das Potential des Biogases noch nicht voll ausgeschöpft wird. Durch technologische Weiterentwicklung wird geschätzt, dass bis zu 55 % des Erdgasimports durch aufgereinigtes Biogas ersetzt werden kann (BEE, 2014). Bereits heute zählt Deutschland mit rund 8000 sich in Betrieb befindlichen Biogasanlagen zu den wichtigsten Biogasproduzenten (FACHVERBAND BIOGAS E.V., 2015).

2.2 Nutzung von Biogas aus Biomasse

Die Entstehung von Biogas ist ein durch Mikroorganismen verursachter natürlicher Prozess, der unter anaeroben Bedingungen stattfindet (REINEKE und SCHLÖMANN, 2007; BAUER et al., 2009). Im Wesentlichen werden 4 Stufen der Biogasbildung unterschieden. Zunächst werden die komplexen Makromoleküle des eingebrachten Substrats wie Polysaccharide (Cellulose, Hemicellulose), Fette oder Proteine durch bakterielle Exoenzyme wie Cellulasen, Glucosidasen, Amylasen, Lipasen oder Proteasen zu Mono- und Disacchariden, langkettigen Fettsäuren, Glycerin, Aminosäuren und Peptiden abgebaut.

Es besteht ein fließender Übergang zur zweiten Stufe der Biogasproduktion, der Acidogenese. Hierbei werden die in der Hydrolyse entstandenen Produkte durch Gärungen wie z.B. Butter-, Propion-, oder Milchsäuregärung zu kurzkettigen Fettsäuren, Alkoholen, Lactat, Succinat und aromatischen Verbindungen abgebaut. Die Zusammensetzung der hydrolytischen und acidogenen Mikroflora ist stark vom Substrat abhängig (BISCHOFBERGER et al., 2005). Typische mikrobielle Vertreter, die für diesen Schritt in Biogasanlagen verantwortlich sind, stammen beispielsweise aus den Gattungen *Clostridium*, *Bacillus* und *Bacteroides* (KÖNIG et al., 2011b). Im dritten Schritt, der Acetogenese, entstehen aus den Gärprodukten durch Gattungen wie *Acetobacterium* oder *Butyrobacterium* Acetat, CO₂ und H₂O (LFL, 2009). Diese werden wiederum während der Methanogenese von Archaeen zu Methan umgesetzt. Das entstandene Biogas stellt letztendlich ein Gasgemisch aus Methan (50 - 75 %), Kohlendioxid (25 - 45 %), Wasser (2 - 7 % relative Feuchte) und einem geringen Anteil unterschiedlicher Gase wie Stickstoff, Sauerstoff, Schwefelwasserstoff, Wasserstoff und Ammoniak (Tab. 1) dar (FNR, 2014a). Generell kann fast jede organische Substanz nach adäquater Aufenthaltsdauer in der Anlage zu Biogas umgesetzt werden, doch variiert die Zusammensetzung des Biogases je nach Zusammensetzung der Ausgangsstoffe (EDER und SCHULZ, 2006). Die durchschnittliche sog. hydraulische Verweilzeit des Substrats in Biogasanlagen beträgt 70 Tage (FNR, 2013). Um das gewonnene Biogas in das Erdgasnetz einspeisen und an die Verbraucher verteilen zu können, muss es in Biogasaufbereitungsanlagen auf exakt normierte Erdgasqualität aufbereitet werden.

Tab. 1: Zusammensetzung Biogas und Erdgas (FNR, 2010).

Komponente		H-Erdgas	Biogas
Methan	Vol.-%	93	50 - 75
Kohlendioxid	Vol.-%	0	25 - 45
Wasser	% rel. Feuchte	0	2 - 7
Sauerstoff	Vol.-%	0	< 2
Stickstoff	Vol.-%	14	< 2
Wasserstoff	Vol.-%	0	< 1
Schwefelwasserstoff	ppm	1 - 2	20 - 20000

2.3 Biogasaufbereitung und die Problematik des Methanschlupfes

Tab. 1 gibt die Zusammensetzung von H (high)-Erdgas im Vergleich zu Biogas wieder. Es werden drei Arten von Erdgas unterschieden, die sich im Gehalt des Methans unterscheiden. So weist das H-Erdgas höhere Methankonzentrationen auf als das L (low)-Erdgas, wobei das H-Erdgas aus der Nordsee stammt und das L-Erdgas aus GUS-Staaten.

Um das Biogas in die bestehenden Erdgasnetze leiten zu können, muss es zunächst zu Erdgasqualität in Biogasaufbereitungsanlagen aufgereinigt werden. Abb. 4 zeigt exemplarisch eine Biogasaufbereitungsanlage in Ronnenberg. Hierbei wird zum einen der Schwefelwasserstoff entfernt, welcher zusammen mit dem im Biogas befindlichen Wasserdampf sonst zu Schwefelsäure reagieren würde, welche sowohl die Bauteile der Aufbereitungsanlage sowie Bauteile der Gasleitungen korrodieren würde. Aus diesem Grund wird ebenfalls das Wasser entfernt. Die Kohlendioxidabscheidung erfolgt aufgrund der daraus resultierenden Methanerhöhung des Biogases, die die Brenneigenschaften verbessert. Die häufigsten Verfahren zur Aufreinigung von Erdgas stellen die Druckwasserwäsche (DWW) und die Druckwechseladsorption (PSA, engl. Pressure Swing Adsorption). Die DWW beruht auf dem physikalischen Prinzip der verschiedenartigen Löslichkeit unterschiedlicher Gase in Wasser. Bei diesem Verfahren wird das Rohbiogas unter Drücken von 6 bis 8 bar in Gegenstromrichtung zum Waschwasser geleitet. Das CO₂ löst sich im Waschwasser weit besser als Methan und wird mit dem Wasser aus dem Biogasstrom entfernt. Das Waschwasser wird durch Entfernung des Drucks, wodurch sich das CO₂ vom Wasser löst, wieder regeneriert. Ein geringer Teil von Methan löst sich jedoch ebenfalls im Waschwasser und wird bei seiner Regeneration frei. Dieser Methangehalt im Abgas der Gasaufbereitungsanlagen wird als Methanschlupf bezeichnet und liegt bei ca. 1 - 2 %. Bei der Methode der PSA wird die divergierende Adsorption von Gasen an speziellen porösen Materialien wie Aktivkohle oder Zeolith ausgenutzt. Das CO₂ bindet an die Materialien und der Methangehalt im Biogas wird erhöht. Die Regenerierung erfolgt über Druckentspannung und/oder Temperaturerhöhung, wobei hier ebenfalls ein Methanschlupf von 1 - 2 % entsteht (FNR, 2010). Nach Vorgaben des EEG ist dieser Methanschlupf auf max. 0,5 % zu beschränken, wodurch das Abgas der Biogasaufbereitungsanlagen nachbehandelt werden muss (EEG, 2009). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt finden hauptsächlich eine katalytische Nachverbrennung (KNV) oder eine thermische Oxidation mit FLOX-Brennern statt (FNR, 2010). Diese Verfahren führen jedoch zu einer deutlichen Verschlechterung der ökonomischen Bilanz von Biogasanlagen. Auf-

grund ökologischer Gesichtspunkte ist dennoch die Reduzierung von Methan essentiell, um die Erderwärmung zu reduzieren.



Abb. 4: Biogasaufbereitungsanlage in Ronnenberg. Im Hintergrund die zugehörige Biogasanlage. Quelle: FNR (2013).

2.4 Methan als Treibhausgas

Methan stellt neben CO_2 ein wichtiges und effektives Treibhausgas dar (WUEBBLES und EDMONDS, 1991). So absorbiert es die terrestrische Strahlung im Infrarotbereich von 4 - 100 nm und trägt durch die Reemission der absorbierten Strahlenenergie direkt zur Erderwärmung bei (GEBER, 2004). In den letzten 300 Jahren ist hauptsächlich durch anthropologische Ursachen aufgrund verstärkter Landwirtschaft und industrieller Emission der CH_4 -Gehalt der Atmosphäre von 0,75 auf 1,7 ppm gestiegen (HANSON und HANSON, 1996). Nach Schätzungen kann 2050 ein Gehalt von 2,1 bis 4,0 ppm erreicht werden (RAMANATHAN et al., 1985). Ein gesteigerter Methangehalt in der Troposphäre führt zudem zu einer Verminderung von Hydroxylradikalen, was das oxidative Potential der Atmosphäre herabsetzt und dadurch Schadstoffe wie Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffe, aber auch Methan selbst, länger in der Troposphäre verweilen (GEBER, 2004). Im Vergleich zu CO_2 hat Methan ein 26-fach höheres Potential zur Erderwärmung (LELIEVELD

et al., 1993). Eine Verringerung der Methanemission wäre dementsprechend effektiver im Kampf gegen die Erderwärmung als eine reduzierte Freisetzung äquivalenter Mengen an CO₂.

Etwa 520 Tg Methan werden jedes Jahr in die Atmosphäre entlassen, wobei ca. 70 % von anthropogenen Quellen ausgehen (IPPC, 1994). Natürliche Methanquellen stellen hauptsächlich die Feuchtgebiete wie die Tundra (115 Tg/Jahr) dar. Geringere Beiträge zur Methanemission liefern Seen und Ozeane, Wiederkäuer und Insekten. 90 % der freigesetzten Menge an Methan wird durch eine photochemische Reaktion durch Hydroxylradikale zu CO₂ oxidiert (HANSON und HANSON, 1996). Darüberhinaus werden große Mengen Methan durch mikrobielle Oxidation durch methanoxidierende Bakterien, die sog. MOB, kurz nach ihrer Bildung bereits wieder abgebaut und gelangen somit erst gar nicht in die Atmosphäre. So werden etwa in Reisfeldern 80 % des gebildeten Methans noch im Boden durch MOB abgebaut (REEBURGH et al., 1993). Allerdings hemmen hohe Nitrat- und Ammoniummengen, z.B. durch überhöhte Düngung, die Methanoxidation (BÉDARD und KNOWLES, 1989). Außerhalb der Reisfelder erreichen Böden und Sedimente einen durchschnittlichen Abbauegehalt von etwa 20 Tg/Jahr, Wüsten etwa 7 Tg/Jahr und Seen einen kleinen Anteil von etwa 5 Tg/Jahr (HANSON und HANSON, 1996). Durch ihre Fähigkeit zur Verwertung dieses Treibhausgases stellen methanotrophe Bakterien eine wichtigen Senke von Methan dar und liefern dadurch einen substantiellen Beitrag zur Begrenzung der Erderwärmung.

2.5 Abbau von Methan durch methanotrophe Bakterien

Methanoxidierende Bakterien (MOB) sind ubiquitär verbreitet und sind sowohl in Feuchtgebieten wie der Tundra oder Reisfeldern, in Ozeanen, Seen aber auch auf Mülldeponien und in Wüsten zu finden. Sie weisen die einzigartige Fähigkeit auf, Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können und spielen eine wesentliche Rolle im Kohlenstoffkreislauf der Natur (HANSON und HANSON, 1996).

2.5.1 Systematische Einteilung methanotropher Bakterien

Das erste methanoxidierende Bakterium wurde von SÖHNGEN (1906) isoliert und als *Bacillus methanicus* beschrieben. Doch erst WHITTENBURY et al. (1970) legten durch

die Charakterisierung und Isolierung von über 100 Spezies eine Basis zur Bestimmung und Kultivierung methanoxidierender Bakterien.

Die MOB gehören zur Gruppe der Methyloprophen, die C₁-Verbindungen, die stärker reduziert sind als CO₂, zum Aufbau ihres Zellmaterials und als Energiequelle nutzen können. Während Methyloprope eine große Vielfalt an C₁-Verbindungen, wie beispielsweise methylierte Amine verwerten können, nutzen Methanotrope hierzu nur Methan, Methanol und Formaldehyd (OTTOW, 2011).

Die MOB sind gramnegativ und werden der α - und γ -Untergruppe der Abteilung der Proteobakterien zugeordnet. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden die MOB in die 11 Gattungen *Methylocystis*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylosinus*, *Methylosphaera*, *Methylothermus*, *Methylocella* und *Methylocapsa* unterteilt (DEDYSH et al., 2004). Tab. 2 gibt die systematische Einordnung und spezifische Charakteristika der Genera wieder.

Tab. 2: Systematische Einordnung und charakteristische Eigenschaften der methanotrophen Genera (RuMP: Ribulosemonophosphat; MMO: Methanmonooxygenase; sMMO: lösliche MMO; pMMO: partikuläre MMO).

Genus	Proteobakterien-Gruppe	Kohlenstoff-Assimilation	MMO	Stickstoff-Fixierung
<i>Methylocystis</i>	α	Serin-Weg	sMMO/pMMO	ja
<i>Methylobacter</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	nein
<i>Methylococcus</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	ja
<i>Methylocaldum</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	nein
<i>Methylomonas</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	nein
<i>Methylomicrobium</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	nein
<i>Methylosinus</i>	α	Serin-Weg	sMMO/pMMO	ja
<i>Methylosphaera</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	nein
<i>Methylothermus</i>	γ	RuMP-Weg	pMMO	nein
<i>Methylocella</i>	α	Serin-Weg	sMMO/pMMO	ja
<i>Methylocapsa</i>	α	Serin-Weg	pMMO	ja

2.5.2 Zentrale Stoffwechselwege

Die Oxidation von Methan durch MOB verläuft obligat aerob nach dem in Abb. 5 wiedergegebenen Schema.

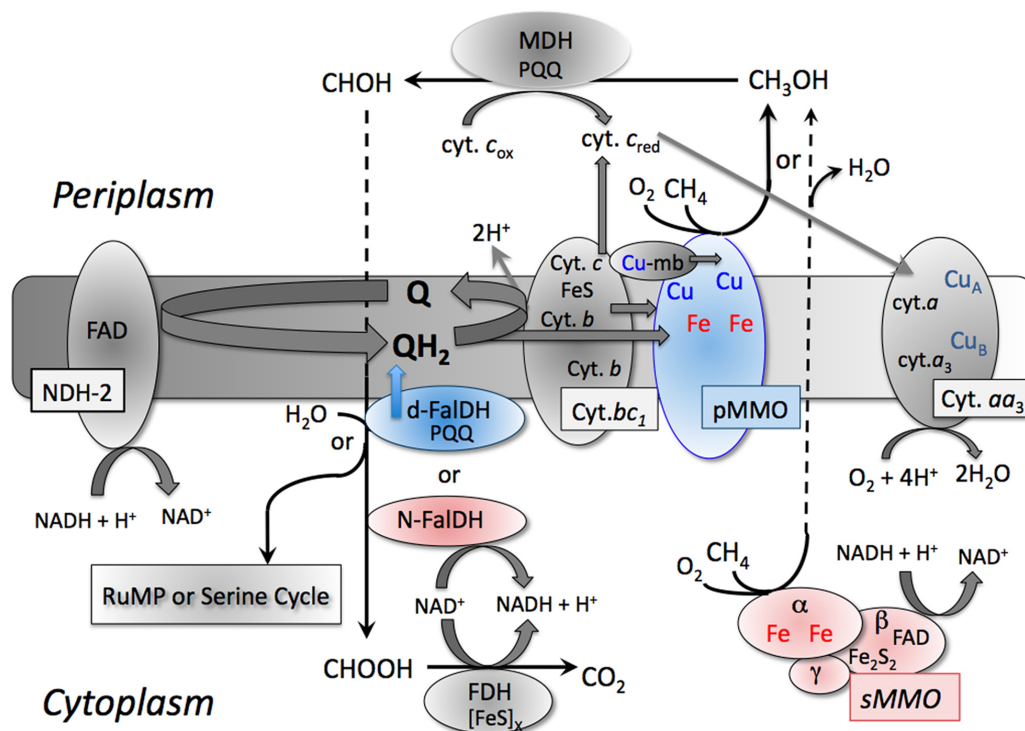
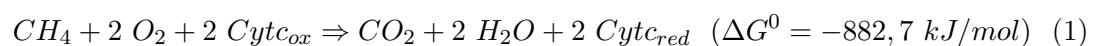


Abb. 5: Vorgeschlagener Stoffwechselweg der Methanoxidation in Methanotrophen. Blaue Proteine: Positive Kupfer-Regulation. Rote Proteine: Negative Kupfer-Regulation. Cyt: Cytochrom; D-FalDH: Chinon-abhängige Formaldehyddehydrogenase; FDH: Formiatdehydrogenase; N-FalDH: NAD(P)-abhängige Formaldehyddehydrogenase; NDH-2: NADH-Dehydrogenase Typ II; pMMO: partikuläre Methanmonooxygenase; Q: Ubichinon; FAD: Flavinadeninindinukleotid; MDH: Methanoldehydrogenase; PQQ: Pyrrolochinolinchinon; sMMO: lösliche Methanmonooxygenase; RuMP: Ribulosemonophosphat. Quelle: SEMRAU et al. (2010).

Der Stoffwechsel wird durch eine Methanmonooxygenase (MMO) initiiert, welche zwei Reduktionsäquivalente nutzt, um die O-O-Bindung von molekularem Sauerstoff aufzuspalten. Ein Sauerstoffatom wird zu H₂O reduziert, das zweite Sauerstoffatom wird zum Aufbau von Methanol verwendet. Die Methanmonooxygenase kann in zwei Formen auftreten: einer im Zellplasma gelösten, der sMMO, welche nach Zentrifugation der Zellextrakte bei 150000 x g über einen Zeitraum von 75 Minuten immer noch gelöst vorliegt, sowie einer partikulären, membrangebundenen Form, der pMMO, die bei glei-

cher Zentrifugation sedimentiert (HANSON und HANSON, 1996). Während die pMMO in allen bekannten MOB mit Ausnahme von *Methylocella* spp. vorkommt (THEISEN und MURRELL, 2005), wird die sMMO nur von wenigen MOB ausgebildet (HANSON und HANSON, 1996). Im Gegensatz zur pMMO, welche Kupfer im aktiven Zentrum aufweist, enthält die sMMO ein Di-Eisenzentrum (ELANGO et al., 1997). Die sMMO wird bei niedrigen Kupfergehalten ($< 0,89 \mu\text{mol/g}$ Zellrockengewicht) gebildet und stellt einen Überlebensmechanismus dar, wenn in der Umwelt der Kupfergehalt ein limitierender Faktor ist (SEMRAU et al., 2010). Die pMMO wird nur bei Kupfergehalten ab $0,85 - 1,00 \mu\text{mol/g}$ Zellrockengewicht ausgebildet. Bei Nutzung der pMMO werden höhere Wachstumsraten erreicht, da dieses Enzym im Gegensatz zur sMMO, welche NADH-abhängig ist, auch Elektronendonatoren mit höherem Potential nutzen kann (HANSON und HANSON, 1996). Vermutlich entwickelten sich die pMMO und sMMO unabhängig voneinander, da beide MMOs weder genetische noch strukturelle Analogien aufweisen. Die pMMO ist dagegen mit der Ammoniakmonooxygenase von nitrifizierenden Bakterien verwandt (SEMRAU et al., 1995). Die MMOs stellen einzigartige und stark konservierte Gensequenzen innerhalb der MOB dar und werden aufgrund dessen zum Nachweis von methanoxidierenden Bakterien genutzt (CHENG et al., 1999). Das Methanol wird schließlich weiter durch die Methanoldehydrogenase (MDH) zu Formaldehyd oxidiert. Durch die Oxidation von Formaldehyd über Formiat zu CO_2 werden sechs Elektronen auf Reduktionsäquivalente übertragen und somit Reduktionsenergie konserviert. Zwei Elektronen werden für die Spaltung von O_2 in der initialen Reaktion des Stoffwechselweges aufgewandt, die verbleibenden vier Elektronen stehen in der Atmungskette mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Gewinnung von ATP zur Verfügung. Gleichung 1 gibt die stöchiometrische Reaktion für die Oxidation von Methan zu CO_2 wieder (GEBER, 2004).

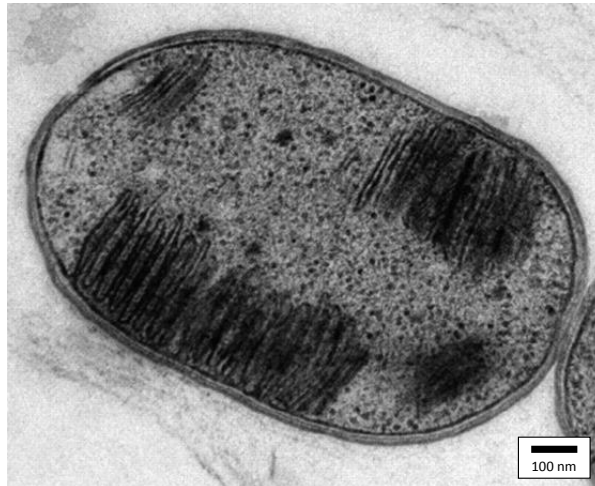


Das Formaldehyd kann alternativ zur Synthese von Zellmaterial assimiliert werden und verläuft je nach MOB-Gruppe (Abschnitt 2.5.3) über den Ribulosemonophosphat (RuMP)- (Typ I) oder Serin-Weg (Typ II). Befindet sich eine MOB-Kultur im Wachstum, werden nach KIGHTLEY et al. (1995) 25 - 38 % des Formaldehyds zum Zellaufbau genutzt und stehen dementsprechend nicht mehr zur Oxidation zu CO_2 zur Verfügung.

2.5.3 Gliederung methanotropher Bakterien in Typ I, Typ II und Typ X

Methanabbauende Bakterien werden anhand spezifischer Merkmale in Typ I, Typ II und Typ X eingeteilt. Tab. 3 gibt die wesentlichen Charakteristika wieder. So gehören Typ I MOB der Gruppe der γ -Proteobacteria an und nutzen den RuMP-Weg zur Kohlenstoffassimilation, im Gegensatz zu Typ II MOB, welche α -Proteobacteria darstellen und den Serin-Weg nutzen. Ein weiteres Charakteristikum ist die Anordnung der intracytoplasmatischen Membranen (ICM), dem Träger der pMMO, welche bei Typ I in vesikulären Bündeln vorliegen, bei Typ II MOB dagegen parallel zur Zellmembran liegen (Abb. 6).

A Typ I



B Typ II

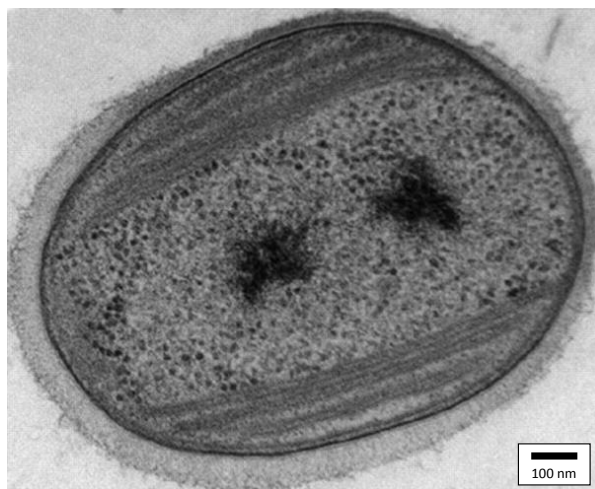


Abb. 6: Anordnung intracytoplasmatischer Membranen von A: MOB Typ I und B: MOB Typ II. Quelle: KIP et al. (2011).

Weitere Unterscheidungsmerkmale stellen das zelluläre Fettsäuremuster oder die Fähigkeit zur Stickstofffixierung dar. Typische Vertreter von Typ I sind *Methyломicrobium*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylothermus* oder *Methyломonas*. *Methylocystis* und *Methylosinus* werden Typ II zugeordnet. Typ X MOB weisen Eigenschaften sowohl von Typ I wie auch Typ II MOB auf. Zu diesem Typ zählen *Methylococcus* und *Methylobacter*. Nach GRAHAM et al. (1993) und WISE et al. (1999) dominieren bei nährstoffärmeren Bedingungen Typ II MOB, während bei nährstoffreichen Bedingungen Typ I MOB vorherrschen.

Tab. 3: Charakteristika der Typen I, II und X von MOB

Charakteristikum	Typ I	Typ II	Typ X
GC-Gehalt [mol%]	49-60	62-67	59-65
Intracytoplasmatische Membranen	vesikuläre Bündel	parallel entlang Zellperipherie	vesikuläre Bündel
N ₂ -Fixierung	nein	ja	ja
Exosporen	nein	manche	nein
Cysten	manche	manche	manche
C-Assimilation	RuMP-Weg	Serin-Weg	RuMP-Weg, selten Serin-Weg
Dominierende Fettsäuren	14:0; 16:1 ω 7c; 16:1 ω 5t	18:1 ω 8c	16:0; 16:1 ω 7c
Gruppe Proteobacteria	γ	α	γ

2.6 Termiten als natürliche Methanquelle

Termiten sind für die Freisetzung von etwa 20 Tg Methan pro Jahr verantwortlich und stellen somit die zweitgrößte natürliche Methanquelle dar (GRAEDEL und CRUTZEN, 1994). Dies, sowie die reiche und komplexe mikrobielle Flora des Termitendarms, mit jährlich neuen Entdeckungen (PAUL et al., 2012; ROSENTHAL et al., 2013) zeigen die Wahrscheinlichkeit der Existenz von methanotrophen Bakterien im Termitendarm auf.

2.6.1 Systematische Einordnung von Termiten

Termiten bilden die ältesten sozial lebenden Insekten. Die frühesten Termitenfossilien stammen aus der Kreidezeit vor ca. 140 Millionen Jahren, doch wird ihr Ursprung in

der Zeit des Paläozoikums vor ca. 300 Millionen Jahren vermutet (ENGEL et al., 2007), wobei sich Termiten aus holzfressenden Schaben entwickelten (LO et al., 2000). Sie sind hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen der Erde vertreten, doch sind wenige Arten wie *Kaloterme flavicollis* in Teilen Südeuropas oder *Reticulitermes lucifugus* bis La Rochelle in Frankreich verbreitet. Termiten sind systematisch der Ordnung Isoptera (Gleichflügler) zugeordnet und umfassen derzeit 283 Gattungen mit rund 2700 Arten (KÖNIG et al., 2011a). Die Termiten lassen sich generell in zwei Gruppen einteilen, die sog. niederen und höheren Termiten. Die höheren Termiten umfassen die Familie Termitidae mit einer großen Anzahl an Unterfamilien und stellen etwa 75 % aller Termitenarten. Sie nutzen eine Vielzahl unterschiedlicher Nahrungsquellen wie beispielsweise Gräser oder Humus (FRÖHLICH, 1999). Die evolutionär älteren niederen Termiten nutzen vorrangig Holz als Nahrungsquelle, wobei sie zu dessen Verdauung eine komplexe symbiontische mikrobielle Gemeinschaft aus Bakterien, Protozoen, Archaeen und Hefen aufweisen, die ein Drittel bis zur Hälfte des Lebensgewicht einer Termitenart beiträgt (KÖNIG et al., 2002).

2.6.2 Der Abbau von Holz durch Termiten

Der Abbau des Holzes, welches vorrangig aus den Polymeren Cellulose, Hemicellulose und Lignin aufgebaut ist, verläuft grundsätzlich in drei Stufen. Zunächst erfolgt eine Hydrolyse der Polymere und der Abbau in ihre monomeren bzw. oligomeren Komponenten. Diese werden im nächsten Schritt entweder oxidativ oder fermentativ zu niedermolekularen Säuren, Alkoholen, CO_2 und H_2 abgebaut. Im letzten Schritt werden diese wiederum zu Acetat, CO_2 und Methan verstoffwechselt (KÖNIG et al., 2002). Durch den Abbau von organischem Material, bei dem die Termiten eine unentbehrliche Rolle einnehmen, werden große Mengen an Gasen erzeugt (KÖNIG und BREUNIG, 1997). So werden jedes Jahr etwa $2 \cdot 10^8$ T H_2 , $1\text{-}6 \cdot 10^7$ T CO_2 und $1,5 \cdot 10^8$ bis $5 \cdot 10^{10}$ T CH_4 gebildet (GRAEDEL und CRUTZEN, 1994; KÖNIG et al., 2011a). Weltweit gehen somit etwa 3 % der Methanemission auf die Freisetzung durch Termiten zurück, die hierdurch eine hohe Relevanz hinsichtlich dieses Treibhausgases haben (SUGIMOTO et al., 2000). Um die große Anzahl an Symbionten zur Holzverdauung aufnehmen zu können, weist der Darm der niederen Termiten morphologische Besonderheiten auf.

2.6.3 Der Termitendarm und dessen mikrobielle Flora

Der Termitendarm wird grob in Vorderdarm mit Kropf und Kaumagen, Mitteldarm, an dem die Malpighischen Gefäße angeheftet sind und Hinterdarm mit der Gärkammer, einem stark vergrößerten Abschnitt, sowie Colon und Rectum unterschieden (Abb. 7) (NOIROT, 1995).

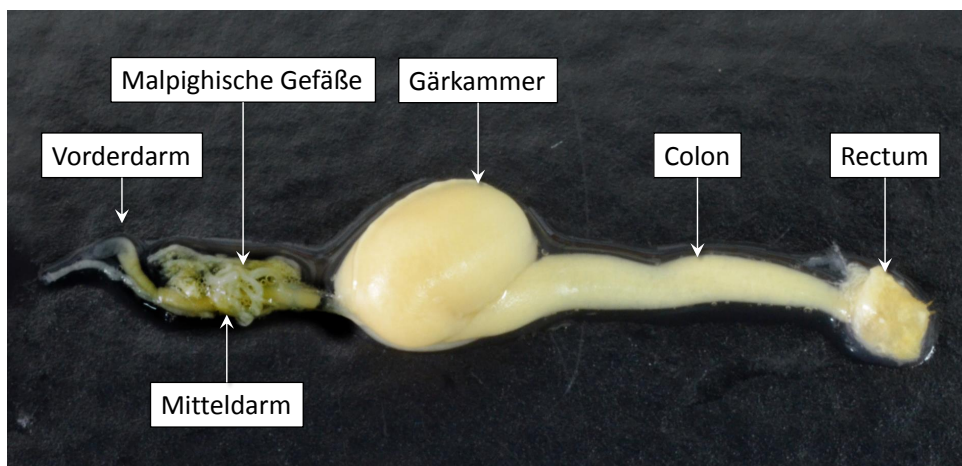
A**B**

Abb. 7: Die Termiten *Incisitermes marginipennis* (Soldat) und das Präparat ihres Intestinaltrakts. Der Darm setzt sich aus den Abschnitten Vorderdarm, Mitteldarm und Hinterdarm zusammen, welcher aus der Gärkammer und dem Colon besteht. Die Malpighischen Gefäße sind um den Mitteldarm geschlungen.

Die Nahrung wird zunächst von den Mandibeln grob zerkleinert und im Kaumagen durch dort befindliche Chitinzähne mechanisch zerrieben. Im Mitteldarm werden den Nahrungspartikeln Verdauungsenzyme zugesetzt bis sie schließlich die Gärkammer mit den symbiontischen Mikroorganismen erreichen. Dieser Hinterdarmabschnitt ist am Epithelbereich durch Diffusion aus den Tracheen mit Sauerstoff versorgt. Durch die große Anzahl an O₂-verbrauchenden Mikroorganismen nimmt der Sauerstoffgehalt in diesem Bereich des Darms zum Zentrum hin stark ab, wodurch ca. 60 % des Darms anoxisch sind (Abb. 8) (BERCHTOLD et al., 1999; FUCHS, 2007).

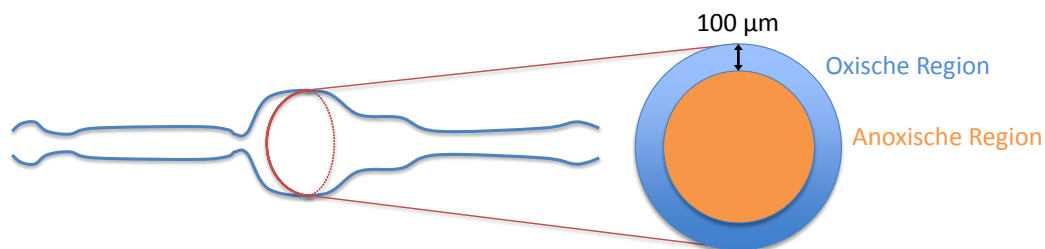


Abb. 8: Querschnitt eines schematischen Termitendarms mit oxischer und anoxischer Zone der Gärkammer. Der oxische Abschnitt beträgt bei *Mastotermes darwiniensis* ca. 100 µm.

Es wurden etwa 100 verschiedene Bakterien und Archaeen aus 14 unterschiedlichen Gattungen isoliert (KÖNIG et al., 2002), wobei durch die üblichen Isolierungstechniken bei weitem nicht alle Mikroorganismen erfasst werden können. Durch molekulare Untersuchungen konnte die bakterielle Mikroflora unabhängig ihrer Kultivierbarkeit analysiert werden. Der überwiegende Teil der Bakterien wird demgemäß von Proteobakterien, Bacteroidacea, Flavobacteriaceae und Spirochaeten gestellt (HONGO et al., 2003). Es wurden überwiegend Archaeen der Gattung *Methanobrevibacter* gefunden (TOKURA et al., 2000). Die Gesamtzellzahl aller Prokaryoten wurde auf 10^9 - 10^{10} Zellen/ml Darminhalt bestimmt (BERCHTOLD et al., 1999). Im Gegensatz zu höheren Termiten weisen niedere Termiten eine hohe Anzahl an Flagellaten auf (KÖNIG et al., 2002). Daneben wurden in *Mastotermes darwiniensis* Hefen der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces* und *Pichia* gefunden (PRILLINGER et al., 1996). Die Analyse der außerordentlich komplexen Beziehung zwischen Termiten als Wirt und ihren Symbionten ist ein gegenwärtiges Forschungsgebiet, auf dem jährlich neue Entdeckungen gemeldet werden (PAUL et al., 2012; ROSENTHAL et al., 2013; REUSS et al., 2013, 2014).

2.7 Ziele der Arbeit

Fossile Brennstoffe wie Erdöl, Kohle und Erdgas, aber auch Kernbrennstoffe wie Uran stehen nur begrenzt zur Verfügung. Zudem wirkt sich ihre Nutzung durch die Bildung von Treibhausgasen negativ auf die Umwelt aus. Kernenergie birgt hohe Risiken für Mensch und Umwelt und verzeichnet eine schwindende Akzeptanz in der Bevölkerung. Diese Energieträger werden daher zunehmend durch erneuerbare Energien wie Wind- und Wasserkraft, Solarenergie, Geothermie und Biomasse ersetzt. Mit einem Anteil über 50 % ist die Nutzung von Biomasse die wichtigste Quelle regenerativer Energien in Deutschland (FNR, 2014c). Sie wird in Biogasanlagen mikrobiell zu Biogas umgesetzt, das bisher zur Strom- und Wärmeerzeugung genutzt wird, zukünftig aber aus ökonomischen und politischen Gründen in bestehende Netze eingespeist werden und Erdgas ersetzen soll. Hierfür ist die Aufbereitung des Biogases in Biogasaufbereitungsanlagen nötig, bei der ein Verlust von Methan, dem sogenannten Methanschlupf, auftritt, und der 1 - 2 % des Abgases ausmacht. Da dieser laut Gesetzgeber jedoch nur 0,5 % betragen darf (EEG, 2009), wird der Methanschlupf bisher durch aufwendige thermische oder katalytische Verfahren reduziert, was die wirtschaftliche und ökologische Bilanz der Anlage herabsetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine wirtschaftlichere Alternative zur Entfernung des Methans aus dem Abgas unter Einsatz methanotropher Bakterien (MOB) entwickelt werden. MOB sind in der Lage, Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können (DUNFIELD et al., 2003). Ein Fokus des Projekts liegt auf der erstmaligen Isolierung von MOB aus der komplexen Mikroflora des Termitendarms. Der Einsatz dieser Isolate in Gasaufbereitungsanlagen mit Hilfe eines neu entwickelten Pilotreaktors im Technikumsmaßstab soll demonstriert werden und dessen Betrieb für die Isolate optimiert werden. Formiat, ein Zwischenprodukt des Abbaus von Methan zu Kohlendioxid, soll gewonnen und als Substrat in die Biogasanlagen zurückgeführt werden um den ökologischen und ökonomischen Betrieb von Gasaufbereitungsanlagen zu gewährleisten.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen

Die in Tabelle 4 aufgeführten Bakterienstämme aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW, Mainz), der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig), des Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences (RAS, Moskau, Russland) sowie der National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB, Aberdeen, Schottland) wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre individuelle Methanabbaurate hin untersucht bzw. als Referenzorganismen herangezogen.

Tab. 4: Verwendete Organismen. DSMZ: Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; NCIMB: National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, Schottland; Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Russland.

Organismus	Stamm- / Sammlungsnummer	Herkunft	Medium
<i>Methylocapsa acidiphila</i>	13967	DSMZ	NMS 131
<i>Methylocystis rosea</i>	17261	DSMZ	NMS 131
<i>Methylocystis heyeri</i>	16984	DSMZ	NMS 131
<i>Methylocystis hirsuta</i>	18500	DSMZ	NMS 131
<i>Methylosinus sporium</i>	17706	DSMZ	NMS 131
<i>Methylococcus capsulatus</i>	11853	NCIMB	NMS 131
<i>Methylobacter luteus</i>	11914	NCIMB	NMS 131
<i>Methylomonas methanica</i>	11130	NCIMB	NMS 131
<i>Methylocaldum gracile</i>	11912	NCIMB	NMS 131
<i>Methylocystis parvus</i>	11129	NCIMB	NMS 131
<i>Methylocystis echinoides</i>	IMET 10491	RAS	NMS 131
<i>Methylocystis bryophila</i>	H2s	RAS	NMS M2
Unbekanntes Termitenisolat	B1/1-46 MX 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/1-47 MX 3	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/1-51 NX 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/1-56 RA 3	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-53 MX 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-54 MX 3	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-58 NX 1	IMW	NMS 131

Organismus	Stamm- / Sammlungsnummer	Herkunft	Medium
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-63 RA 3	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-76 KD 16	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-79 KMC 11	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/2-81 KRC 8	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/1-7 KRC 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-14 KRC 8	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-18 KMX 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-20 KMX 8	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-21 KMX 6	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-27 KNX 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-33 KZC 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-34 KZC 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-35 KRC 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-45 KRC 5	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-46 KMX 6	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-56 KNX 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-60 KRC 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-66 KMX 11	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-68 KZC 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-70 KNX 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-71 KZC 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-72 KMX 8	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/3-77 KMX 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-2 KRC 5	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-7 KNX 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-18 KHC 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-24 KSCc 7	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-26 KHC 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-41 KSCc 7	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-47 KMN 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-48 KF 11	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-53 KRS 11	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-61 KB 6	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/4-74 KB 6	IMW	NMS 131

3 Material und Methoden

Organismus	Stamm- / Sammlungsnummer	Herkunft	Medium
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-1 KMN 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-3 KMD 4	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-16 KDd 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-19 KOo 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-22 KMFI 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-25 Koo 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-27 KOd 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-35 KMX 8	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-51 KScC 5	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-57 KRC 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-68 KH 4	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-72 KH 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-78 KRC 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/5-80 KMFI 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-2 KH 4	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-6 KMD 4	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-15 KDX 8	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-16 KDC 15	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-17 KOC 2	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-18 KDC 14	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-19 KDC 17	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-20 KDX 20	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-21 KKC 9	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-22 KKC 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-23 KOC 12	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-24 KOC 6	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B1/6-25 KRX 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B3/4-21 C 81	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B3/4-27 K 94	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B3/5-57 HM 1	IMW	NMS 131
Unbekanntes Termitenisolat	B3/4-58 HM 3	IMW	NMS 131
<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG 1655	IMW	LB

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Nährmedien und Kulturbedingungen

Die aufgelisteten Nährmedien wurden in der vorliegenden Arbeit zur Anzucht, Isolierung und Stammhaltung verwendet. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich alle Angaben auf 1 l Gesamtvolumen. Bei festen Nährmedien wurden 10 g/l PhytigelTM und 10 mg/l Cycloheximid zugefügt. Alle Medien wurden zunächst bei 115 °C und 1 bar Überdruck für 21 min autoklaviert. Alle methanotrophen Mikroorganismen wurden bei 30 °C (*Methylococcus capsulatus*: 45 °C) und 250 Umdrehungen pro Minute (UpM) in einer Gasphase aus synthetischer Luft und Methan im Verhältnis 4:1 mit 1 bar Überdruck inkubiert.

Nitratmineralsalz (NMS) 131-Medium

Lösung 1: 10x NMS-Salzlösung	KNO ₃	10 g
	MgSO ₄ x 6 H ₂ O	10 g
	CaCl ₂	2 g
Lösung 2: Eisen-EDTA	FeEDTA	38 g
Lösung 3: Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,26 g
Lösung 4: Spurenelemente	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,20 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,40 g
	H ₃ BO ₃	0,02 g
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,05 g
	EDTA-diNatriumsalz	0,25 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,02 g
Lösung 5: Phosphatpuffer	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,01 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	71,6 g
	KH ₂ PO ₄	26 g

Auf pH 6,8 einstellen mit 1 N HCl.

Herstellung des NMS 131-Mediums:

- 100 ml von Lösung 1 (10x Salz) auf 1 l verdünnen.
- 1 ml von Lösung 3 (Na-Molybdat) und 1 ml von Lösung 4 (Spurenelemente) zugeben.
- 0.1 ml von Lösung 2 (Fe EDTA) zugeben.
- 10 ml der Lösung 5 (Phosphatpuffer) separat autoklavieren.
- Nach Abkühlung des Mediums auf ca. 40 °C: sterile Zugabe des Phosphatpuffers.

Nitratmineralsalz (NMS) M2-Medium für *Methylocystis bryophila*

KNO ₃	0,25 g	
MgSO ₄ x 6 H ₂ O	0,05 g	
CaCl ₂	0,01 g	
KH ₂ PO ₄	0,10 g	
NaCl	0,02 g	
Spurenelementlösung	1,00 ml	
Spurenelementlösung	CuCl ₂ x 5 H ₂ O	0,10 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,00 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20 g
	EDTA-diNatriumsalz	5,81 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g
	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,04 g

Auf pH 5,5 einstellen mit 1 N HCl.

Lysogeny broth (LB)-Medium für *Escherichia coli*

Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Agar	15 g

Auf pH 7 einstellen mit 1 N HCl.

3.2.2 Isolierung von methanoxidierenden Bakterien

Proben, die auf die Anwesenheit von MOB hin untersucht werden sollten, wurden mit einem Inokulationsvolumen von 2,5 % in NMS 131-Medium überführt. Als Kulturgefäße wurden gasdicht verschließbare Hungate-Kulturröhrchen oder Bormioli-Glasgefäße verwendet. Es wurde steril eine Gasphase von 75 % synthetischer Luft und 25 % Methan mit einem Druck von 1 bar auf die beimpften Medien gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 250 UpM. Nach 2 Wochen wurden die bewachsenen Kulturen in frisches NMS 131-Medium überführt. Nach 5 solcher Überführungen wurden die Kulturen auf festes NMS-Medium ausgestrichen und einzelne Kolonien auf diesen Platten nach 3 Wochen Wachstum wiederum in flüssiges NMS 131-Medium überführt. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte zum einen durch lichtmikroskopische Untersuchungen, zum anderen durch Ausstreichen der Isolate auf komplexes LB-Medium. Da MOB

nur C₁-Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können, ist bei Reinkulturen auf komplexen Medien kein Wachstum zu verzeichnen. Zur abschließenden Sicherstellung der Reinheit wurde eine denaturierende Gelelektrophorese (DGGE) wie unter Abschnitt 3.9.4 beschrieben durchgeführt.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung des bakteriellen Zelltiters der Reinkulturen und Referenzstämme wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe (D) von 0,02 mm verwendet. Diese Kammer weist im Zählfeld 16 Großquadrate (GQ) auf, die in 16 Kleinquadrate (KQ) mit einer Fläche von je 0,0025 mm² unterteilt sind. Es wurden pro Probe mindestens 5 GQ ausgezählt und der Zelltiter T aus dem Mittelwert (MW) der gezählten Zellen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktor F nach Gleichung 2 bestimmt, wobei A die Fläche der ausgezählten GQ bestimmt.

$$\text{Zelltiter} = \frac{\text{Mittelwert} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Fläche der Grossquadrate} \cdot \text{Kammertiefe}} \cdot 1000 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \quad (2)$$

3.2.4 Überprüfung des Wachstums anhand der optischen Dichte

Um das Wachstum der Kulturen zu überprüfen, wurde die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines Reagenzglasphotometers (Shimadzu UV-120) bei 620 nm bestimmt. Die Messungen wurden nach der Beimpfung zum Zeitpunkt t₀, nach 14 Tagen zum Zeitpunkt t₁₄, sowie nach Bedarf durchgeführt. Eine OD von 0 - 0,14 wurde als kein, eine OD von 0,15 - 0,5 als mäßiges und über 0,5 als starkes Wachstum gewertet.

3.2.5 Medienoptimierung

Um die Methanabbaurate zu steigern, wurde die Zusammensetzung des NMS 131-Mediums variiert. Ein Fokus wurde hierbei auf Komponenten gelegt, die eine wichtige Rolle für den Hauptstoffwechsel der Methanoxidation zu CO₂ spielen. Tab. 5 gibt die Molaritäten des NMS 131-Mediums der Originalrezeptur der untersuchten Komponenten an.

3 Material und Methoden

Dieser Wert wurde als 100 % gesetzt. Die Komponente wurde in einer Versuchsreihe weggelassen (also 0 %), in der 2. Versuchsreihe zu 10 % zugesetzt, in einem weiteren Ansatz wurde die Menge auf 200 % verdoppelt und schließlich auf 1000 % verzehnfacht. Die Methanumsatzrate wurde wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, gaschromatographisch ermittelt.

Tab. 5: Molaritäten ausgewählter Medienkomponenten zur Optimierung der Methanabbauraten.

Medienkomponente	Molarität
Eisen	12,8 μM
Kupfer	0,8 μM
Sulfat	4,4 mM
Natrium	4,0 mM
Magnesium	4,4 mM
Nitrat	0,1 μM
Kalium	11,8 mM
Calcium	1,8 mM

3.3 Umweltproben

Es wurden Umweltproben aus Entnahmestellen, die alle einen Anteil an Methan aufwiesen, auf die Anwesenheit von MOB hin untersucht. So wurden Proben aus den Faultürmen des Mainzer Klärwerks, aus Kuhpansen, aus dem Laacher See und Termiten entnommen. Die Inokulation im NMS 131-Medium erfolgte bei Klärwerk-, Termiten- und Pansenproben 2,5 %ig, die Inkubation verlief wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben bei 30 °C. 100 ml der Proben aus der oberen Sedimentschicht des Laacher Sees wurden vor der Beimpfung über einen 0,2 μm Filter durch Anlegen eines Vakuums aufkonzentriert. Der Filter wurde mit 1 ml NMS 131-Medium gespült und das Waschwasser als Inokulum verwendet. Die Isolierung von Reinkulturen wurde wie in Abschnitt 3.2.2 beschreiben durch seriell Verdünnen in flüssigem NMS 131-Medium und Ausstreichen auf Phytageplatten verwirklicht.

3.4 Termiten

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Isolierung von MOB aus Termiten gelegt. Es wurde der Darminhalt der Termiten *Neotermes castaneus*, *Reticulitermes flavipes*, *Kaloterme flavicollis*, *Mastotermes darwiniensis*, *Incistitermes marginipennis* und *Capotermes formosanus* auf Anwesenheit von MOB hin untersucht. Alle Termiten wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung (BAM, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Termiten wurden bei 30 °C in Glasgefäßen auf feuchtem Vermiculit gehalten. Als Nahrung diente Pappelholz.

3.4.1 Präparation von Termitendärmen

Zur Präparation der Termitendärme wurden die Termiten in einer Lösung aus 70 % Ethanol und 1 % Peressigsäure abgetötet und anschließend mit sterilem dH₂O abgespült. Mit Hilfe steriler Pinzetten wurde der Darm posterior unter sterilen Arbeitsbedingungen aus dem Abdomen gezogen und in NMS 131-Medium suspendiert.

3.4.2 Bestimmung von Körper- und Darmgewicht sowie Darmvolumen

Das Körper- und Darmgewicht jeder Termitenart wurde durch Wiegen ermittelt. Das Darmvolumen [μ l] wurde mit einer Hamilton-Pipette gemessen. Es wurden jeweils 12 Termiten untersucht und der Mittelwert gebildet.

3.5 Chemikalien und Gase

Die Gase zur Kultivierung (Synthetische Luft, Methan) wurden von der Firma Linde bezogen. Die verwendeten Chemikalien sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Gase.

Substanz	Hersteller & Sitz
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar	Marcor, New Jersey, USA
Ammoniumeisen-III-citrat	Roth, Karlsruhe

3 Material und Methoden

Substanz	Hersteller & Sitz
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Benzoessäure	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform (Trichlormethan)	Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Cycloheximid	Sigma Aldrich, Steinheim
Dichlorethan (DCE)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dinatriummolybdat	Merck, Darmstadt
Eisen(II)-Sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Seva,
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Marcor, New Jersey, USA
3-Hydroxybuttersäure Sigma	Aldrich, Steinheim
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	Alfa Aesar, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumnitrat	Roth, Karlsruhe
Kupferchlorid-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylbenzoat (Benzoessäuremethylester)	Sigma Aldrich, Steinheim
Methylhexanoat (Capronsäuremethylester)	SAFC, Missouri, USA
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Peressigsäure	Roth, Karlsruhe
Phytigel	Sigma Aldrich, Steinheim
Poly-[(R)-3-Hydroxybuttersäure]	Sigma Aldrich, Steinheim
Propanol	Roth, Karlsruhe
Propylbenzoat	Sigma Aldrich, Steinheim

Substanz	Hersteller & Sitz
Propylbutyrat	Sigma Aldrich, Steinheim
(R)-(-)-3-Hydroxy-n-Buttersäuremethylester	ABCR, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 80	Merck, Darmstadt
Xylose	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt

3.6 Enzyme, Biochemikalien und Kits

Tab. 7: Verwendete Enzyme und Biochemikalien.

Substanz	Hersteller & Sitz
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleotidmix (je 2,5 mM)	PEQLAB, Erlangen
DNA-Ladepuffer, 6 X	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot
DNA-Größenstandard GeneRuler™	Thermo Fisher Scientific, St-Leon-Rot
Reaktionspuffer Y	PEQLAB, Erlangen
Restriktionsendonuklease <i>Hinf</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsendonuklease <i>Hae</i> III	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionspuffer Tango	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rinderserumalbumin	Roth, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA-Polymerase Gold	PEQLAB, Erlangen
Tetramethylethyldiamin	Sigma Aldrich, Steinheim
Universal-Agarose peqGold	PEQLAB, Erlangen

Tab. 8: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller & Sitz
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher, St-Leon-Rot
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
UV-Test zur Bestimmung von Formiat	r-biopharm, Mannheim

3.7 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 9: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.

Gerät / Hilfsmittel	Hersteller & Sitz
Autoklav Certoclav	CertoClav Sterilizer, Traun, Österreich
Autoklav Systec VE40	Systec, Wettenberg
Brutschrank Köttermann	Köttermann, Uetze/Hänigsen
DGGE-System: D Gene System	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Geldoku.einheit Biovision CN3000	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler S1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg; Starlab, Hamburg
Mikroskop SM Lux	Leitz, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter CG840	Schott, Mainz
Reinstwasseranlage Milli-Q Plus 185	Millipore, Eschborn
Reinstwasseranlage Millipore RiOs 30	Millipore, Eschborn
Schüttler	Brunswick Scientific, Edison, USA
Spannungsgerät 250V Power Supply	VWR, Darmstadt
UV-Transilluminator FLX-20M	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Vortex-Gerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico	Heraeus Christ, Osterode
Zentrifuge Cryofuge 5000	Heraeus Christ, Osterode
Zentrifuge Sigma 2-16K	SIGMA, Osterode
Gaschromatograph mit Massenspektrometer GCMS-QP 2010 S	Shimadzu, Kyoto, Japan
Gefriertrocknungsanlage LYOVAC GT 2	LD Didactic GmbH, Hürth
Hamilton-Spritzen	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Photometer UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ8000	Keyence, Neu-Isenburg
Hybridisierungsöfen Shel Lab 1012	Sheldon, Cornelius, USA
FISH-Objektträger	Erie Scientific Company, Portsmouth, USA

3.8 Analytische Methoden

3.8.1 Methanbestimmung durch Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) stellt ein auf Verteilung und/oder Adsorption basierendes chromatographisches Verfahren zur Separation eines Gemischs dar. Die Kulturen wurden in Bormioli-Glasgefäßen mit 30 ml NMS 131-Medium auf ihr Vermögen zum Methanabbau hin untersucht. Die auf die Kulturen gegebene Gasphase wies ein Volumen von 80 ml auf und bestand zu 75 % aus synthetischer Luft und zu 25 % aus Methan. Die Methanmessung erfolgte gaschromatographisch mit dem dem Modell GC-2014 von Shimadzu, Japan. Es wurde eine gepackte 100/120 Carbosieve S II-Säule 1 (Länge: 3 m, Innendurchmesser: 3 mm) verwendet, als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 20 ml/min. Die Ofentemperatur betrug 170 °C. Der Methangehalt wurde mit Hilfe eines WLF-Detektors mit einer Detektortemperatur von 200 °C quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit der Software GC Solution Version 2.32.00 (Shimadzu, Japan). Das Injektionsvolumen der Probe betrug stets 500 µl. Die Analyse einer Probe betrug 15 min (Abb. 9).

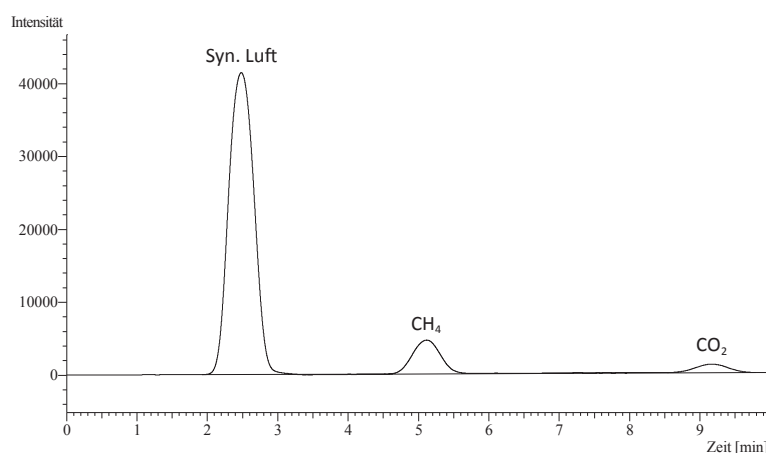


Abb. 9: Trennung eines Gasgemisches aus synthetischer Luft, Methan und CO₂ mittels GC mit isothermem Programm bei 170 °C.

Bei Notwendigkeit einer Peaktrennung von Sauerstoff und Stickstoff wurde ein Temperaturgradient verwendet. Die Ofentemperatur wird so zunächst für 5 min auf 35 °C gehalten und anschließend mit einer Rate von 15 °C pro Minute auf 200 °C geheizt (Abb. 10).

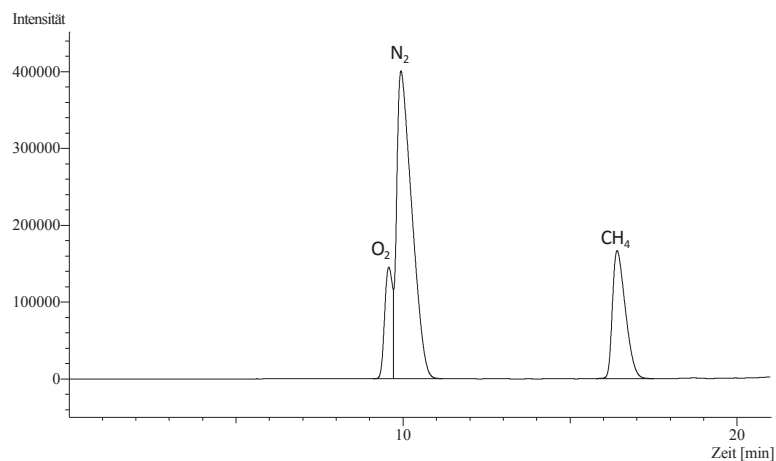


Abb. 10: Trennung eines Gasgemisches aus synthetischer Luft (O₂, N₂) und Methan mittels GC mit Temperaturgradient von 35 °C auf 200 °C.

Proben von Reinkulturen wurden mit 10^9 Zellen versetzt. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt der Methanmessung gezählt und die Methanreduktion in pmol pro Zelle bestimmt, um die tatsächliche Fähigkeit zum Methanabbau zu messen. Umweltproben wurden mit einem Volumen 1 % beimpft. Die Methanabbauraten sind hier in % angegeben.

3.8.2 Bestimmung des Gehalts an Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB) durch Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Vor der gaschromatographischen Bestimmung von Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB), wurde ein Screening auf dessen Bildung mit Hilfe der Färbung von lipophilen Substanzen durchgeführt. Hierfür wurden die hitzefixierten Bakterien auf Objektträgern mit 0,03 % Sudanswarz B übergossen und die Farbe 15 min einwirken gelassen. Restfarbe wurde mit Elthyllactat entfernt und die Zellen mit 0,5 % Safraninlösung für 10 s gegengefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit Wasser abgespült.

Die gaschromatographische Detektion von PHB erfolgte nach der Methode von (RIIS und MAI, 1988). Um die MOB zur PHB-Bildung anzuregen, wurde dem NMS 131-Medium kein Phosphat zugesetzt (HELM, 2002).

3.8.2.1 Isolierung von PHB aus Zellen methanotropher Bakterien

100 ml des NMS 131-Mediums wurden mit einem Inokulum von 1 % beimpft und mit 75 % synthetischer Luft und 25 % Methan mit einem Überdruck von 1 bar begast. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 250 UpM 7 Tage inkubiert. Nach erfolgreichem Wachstum wurden 40 ml steril entnommen und in ein Falcongefäß definierten Gewichts gegeben. Die Zellen wurden bei 7320 x g zentrifugiert und das Pellet zweimal mit dH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet über 2 Tage gefriergetrocknet. Das Gewicht der gefriergetrockneten Zellen wurde gravimetrisch bestimmt und 20 mg hiervon in 1,8 ml DCE in einem Kulturröhrchen mit Schraubdeckelverschluss gelöst. Zu dieser Suspension wurden 1 ml angesäuertes Propanol (80 % Propanol mit 20 % HCl) und 0,2 ml interner Standard (3,46 g/l Benzoessäuremethylester) gegeben und mit 2 ml dH₂O aufgefüllt. Die Hydrolyse erfolgte bei 100 °C über einen Zeitraum von 2 h wobei die Proben alle 30 min geschüttelt wurden. Die Proben wurden anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 2 ml dH₂O versetzt und für 10 min geschüttelt. Es erfolgte eine Phasentrennung, wobei in der unteren organischen Phase der 3-Hydroxybuttersäure-Propylester enthalten ist. 0,5 µl hiervon wurden auf das GC/MS-Modul gegeben und analysiert.

3.8.2.2 Bestimmung des PHB-Gehalts

Zur Analyse des PHB-Gehalts in MOB wurde eine gaschromatographische Analyse mit Massenspektrometrie-Kopplung angewandt. Das System setzte sich aus einem Shimadzu Gaschromatograph GC-14A mit FID (Shimadzu, Kyoto, Japan) und der Kapillarsäule Zebron ZB-Wax (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg) mit dem Integrator C-R6A Chromatopac (Shimadzu, Kyoto, Japan) zusammen. Auch hier diente Helium als Trägergas mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. Die Analyse von PHB erfolgte mit Hilfe eines Temperaturprogramms. Zunächst wurden 40 °C für 1 Minute gehalten mit einem folgenden Temperaturanstieg von 8 °C pro Minute bis zu einer finalen Temperatur von 230 °C, die für 10 min gehalten wurde. Die PHB-Konzentration konnte anhand der Gleichungen 3 - 6 berechnet.

$$\text{Zellkonzentration } \left[\frac{g}{l}\right] = \frac{\text{Zellmasse}}{\text{Volumen organische Phase}} \quad (3)$$

3 Material und Methoden

Zur Berechnung des PHB-Gehalts pro eingesetzte Zellmasse wurde der durch die GC ermittelten Wert durch die Zellkonzentration geteilt und mit 100 % multipliziert.

$$\text{Poly-}\beta\text{-Hydroxybuttersäure (PHB) [\%]} = \frac{\text{PHB Gehalt GC}}{\text{Zellkonzentration}} \quad (4)$$

Das Zelltrockengewicht errechnete sich aus dem gewonnen Trockengewicht im Verhältnis zu dem Volumen der entnommenen Zellkultur

$$\text{Zelltrockengewicht } \left[\frac{\text{g}}{\text{l}}\right] = \frac{\text{Trockengewicht}}{\text{Volumen Zellkultur}} \quad (5)$$

Dadurch konnte die absolute PHB-Konzentration in g/l ermittelt werden.

$$\text{Poly-}\beta\text{-Hydroxybuttersäure (PHB) } \left[\frac{\text{g}}{\text{l}}\right] = \frac{\text{Zelltrockengewicht}}{\text{Zellkonzentration}} \cdot \text{PHB Gehalt GC} \quad (6)$$

3.8.3 MALDI-TOF-MS

Die nähere taxonomische Zuordnung der Termitenisolate erfolgte durch Matrix-Assisted-Laser-Desorption / Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry (MALDI-TOF-MS). Diese wurde an der Amtlichen Materialprüfungsanstalt (MPA, Bremen) durch Dr. Andreas Rabenstein der AG Küver durchgeführt. Es wurden die Referenzstämme *Methylocystis parvus*, *Methylocystis bryophila*, *Methylocystis echinoides*, *Methylocystis hirsuta* und *Methylocystis rosea* sowie die Termitenisolate 610, 613, 626, 639 und 640 auf NMS 131-Festmedium für 3 Wochen inkubiert und die bewachsenen Platten an die MPA zur MALDI-TOF-MS-Analyse geschickt.

Zunächst wurden die Kolonien einer jeden Kultur in 50 μl 70 %-iger Ameisensäure und 50 μl Acetonitril suspendiert und anschließend für 5 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Das Probenfeld einer Probenplatte wurde mit 1 μl des Überstands jeder Probe bestückt

und mit 1 μ l einer Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxymizsäure-Lösung in 50 % Acetonitril und 2,5 % Trifluoressigsäure) überzogen. Die Analyse erfolgte nach der Trocknung der Probe in einem Microflex LT Spektrometer. Die Auswertung wurde mit der Software flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) realisiert. Die Spektren wurden in einem Bereich von 2000 - 20000 m/z und einer Laserfrequenz von 20 Hz aufgenommen und mit Hilfe des Programms MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) mit der Biotyper-Datenbank abgeglichen.

3.8.4 Analyse der zellulären Fettsäuren

Die Analyse der zellulären Fettsäuren wurde mit Kooperation des Instituts für Angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen nach dem Protokoll von KUYKENDALL et al. (1988) unter der Leitung von Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer durchgeführt. Hierfür wurden 40 mg Zellen von der Oberfläche von festen NMS 131-Platten abgewogen und mit 1 ml 1,2 N NaOH in 50 % Methanol versetzt. Die Suspension wurde für 30 min in kochendes Wasser gelegt und anschließend auf Raumtemperatur herabgekühlt. 2 ml einer 6 N HCl-Lösung mit Methanol (325:275, vol/vol) wurden zugegeben und die Zellen für 10 min in 80 °C heißen Wassers gelegt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Zellen mit 1,25 ml Hexanmethyltertbutylether versetzt und für 10 min geschüttelt. Die wässrige Phase wurde verworfen und 3 ml 0,3 N NaOH zugesetzt und erneut für 5 min geschüttelt. Die organische Phase wurde chromatographisch über das Agilent Model 6890N untersucht, wobei eine 5 % Phenyl-methyl-Silikon-Kapillarsäule zum Einsatz kam. Als Detektor wurde ein Flammenionisator, als Trägergas Wasserstoff verwendet.

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 DNA-Extraktion

Zur Isolierung bakterieller DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) herangezogen. Als Ausgangsmaterial diente entweder 1 ml Flüssigkultur mit 10^8 - 10^9 Zellen bzw. 1 ml zweifach mit dH₂O gewaschene Umweltproben aus Pansen und Klärwerk. Hierfür wurden die Umweltproben bei 8000 x g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml dH₂O aufgenommen. Dieser Schritt wurde zwei mal wiederholt. Zur

3 Material und Methoden

DNA-Isolierung aus dem Termitendarm wurden 5 Inhalte von Termitendärmen vereinigt und ebenfalls zwei mal gewaschen. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgt aufgrund der selektiven Bindung der DNA, nach deren Freisetzung durch Zellyse, an eine Silica-Membran. Durch spezifische Waschschriffe werden Proteine und zweiwertige Kationen, welche bei späteren Sequenzierungsschritten stören würden, mit ethanolhaltigen Puffern entfernt. Die DNA wird anschließend mit 150 μ l Elutionspuffer von der Säule gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.9.2 PCR-Methoden

3.9.2.1 Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA

Der Sequenzvergleich auf Grundlage der 16S rDNA ist eine Standardmethode zur Einteilung von Bakterienisolaten hinsichtlich ihrer Taxonomie. Um die 16S rDNA-Sequenz der reinen Isolate zu erhalten wurden die Primerpaare PurEubak5 und PurEubak3 verwendet. Um die komplette Sequenz zu erhalten wurden die Primerpaare 16Sf1 und 16Sr1 sowie 16Sf2 und 16Sr3 erstellt (Tab. 10, Abb. 11). Tab. 11 gibt die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes wieder, Tab. 12 die Reaktionsbedingungen.

Tab. 10: Verwendete Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C]
PurEubak3 (R)	AGA AAG GAG GTG ATC C	16	50	54,1
PurEubak5 (F)	AGA GTT TGA TCM TGG CT	17	44	53,5
16Sf1 (F)	GAG CGG TCG ATG AGA C	16	62,5	57,6
16Sr1 (R)	TCC CTG GCG AAA GAG C	16	62,5	62,9
16Sf2 (F)	ACA GGC TGG GCT ACA C	16	62,5	57,0
16Sr3 (R)	ACG AAG ACG GCG GCT G	16	68,7	66,7

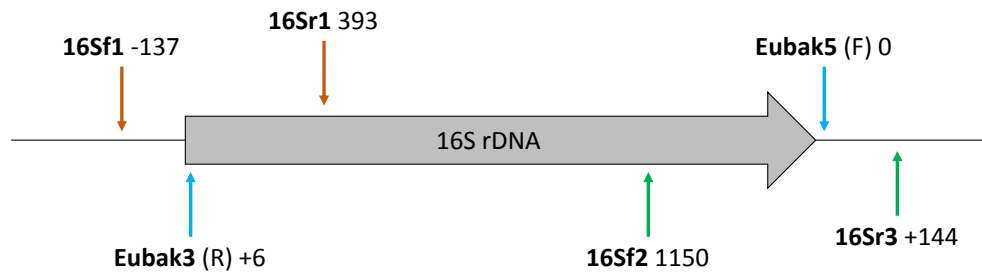


Abb. 11: Primer zur kompletten 16S rDNA-Sequenzierung (vgl. Tab. 10)

Tab. 11: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μl]	Bezogen auf 50 μl
Forward Primer (10 μM)	1	0,2 μM
Reverse Primer (10 μM)	1	0,2 μM
dNTP (40 mM)	1	800 μM
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM*
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Wasser	31	
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/ μl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

* Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 4 mM

Tab. 12: Bedingungen für die PCR-Amplifikation der 16S rDNA.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	56	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

3.9.2.2 Amplifikation der für methanotrophe Bakterien spezifischen *pmoA*-Gensequenz

Die membrangebundene Methanmonooxygenase (pMMO) stellt einen Multiproteinkomplex mit einer Molekülmasse von 300 kDa dar und katalysiert die Oxidation von Methan zu Methanol (HANSON und HANSON, 1996). Da dieses Enzym spezifisch in MOB vorkommt ist es ein Standardmarker zum Nachweis von MOB (CHENG et al., 1999). Der Nachweis von MOB in Umweltproben erfolgte durch die Gensequenz von *pmoA*, welche die spezifische Untereinheit A kodiert. Für die Amplifizierung dieses 330 bp großen Abschnitts wurden die Primer pmof1 und pmor verwendet (Tab. 13, CHENG et al. (1999)). Die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes ist in Tab. 14 wiedergegeben, die PCR-Bedingungen in Tab. 15. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen und nach Amplifikationsgröße aufgetrennt (Abschnitt 3.9.5). Um Sicherzustellen, dass es sich bei dem 330 bp-Amplifikat tatsächlich um die *pmoA*-Gensequenz handelte, wurde die DNA der entsprechende Bande mit Hilfe des Gelextraktionskits QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Quiagen GmbH, Hilden) extrahiert und als Template für eine weitere PCR mit den Primern pmof2 und pmor (Tab. 13, CHENG et al. (1999)) herangezogen. Die Verifizierung erfolgte durch die Amplifizierung einer 178 bp großen Gensequenz. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes sowie die Reaktionsbedingungen entsprachen denen für die Primer pmof1/pmor (Tab. 14 und 15).

Tab. 13: Verwendete Primer zur Identifizierung methanotropher Bakterien (CHENG et al., 1999). F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C]
pmof1 (F)	GGG GGA ACT TCT GGG GIT GGA C	22	63,6	71,5
pmof2 (F)	TTC TAY CCD RRC AAC TGG CC	20	56,3	59,0
pmor (R)	GGG GGR CIA CGT CIT TAC CGA A	22	54,5	62,2

Tab. 14: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des *pmoA*-Gens. Der *pmoA*-Genabschnitt kodiert für eine Untereinheit der für methanotrophe Bakterien charakteristischen partikulären Methanmonooxygenase.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μl]	Bezogen auf 50 μl
Forward Primer (10 μM)	1	0,2 μM
Reverse Primer (10 μM)	1	0,2 μM
dNTP (40 mM)	1	800 μM
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl_2)	5	1 x
Wasser	39,5	
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μl)	0,5	2,5 U
Template-DNA (20 ng/ μl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

Tab. 15: Bedingungen für die PCR-Amplifikation der *pmoA*-Gens.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	45	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

3.9.2.3 Amplifikation der *nifH*-Gensequenz

Die Fähigkeit zur Stickstofffixierung wurde über den Nachweis des Nitrogenase-Reduktase-Gens (C) durch PCR nach WARTIAINEN et al. (2006) erbracht. Hierfür wurden die Primer *nifH1* und *nifH2* verwendet (Tab. 16), welche einen 350 bp großen Genbereich der *nifH*-Sequenz amplifizieren. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen sind Tab. 17 bzw. Tab. 18 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch wie in Abschnitt 3.9.5 beschrieben, untersucht.

3 Material und Methoden

Tab. 16: Verwendete Primer zum Nachweis des Nitrogenase-Reduktase-Gens *nifH*. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C]
nifH1 (F)	TGYGAYCCNAARGCNGA	17	54	61
nifH2 (R)	ADNGCCATCATYTCNCC	17	50	60

Tab. 17: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des Nitrogenase-Reduktase-Gens *nifH*.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μ l]	Bezogen auf 50 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1	0,2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1	0,2 μ M
dNTP (40 mM)	1	800 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM*
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Wasser	31	
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/ μ l)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

* Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 4 mM

Tab. 18: Bedingungen für die PCR zum Nachweis des Nitrogenase-Reduktase-Gens *nifH*.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	94	0,5
2	Denaturierung	92	1
3	Annealing	60	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	5

3.9.2.4 Amplifikation der *sMMO*-Gensequenz

Die Expressierung der *sMMO*, die lösliche Form der Methanmonooxygenase, welche manche Methanotrophe bei Kupfermangel bilden (GROSSE et al., 1999), wurde durch PCR-Analysen nach AUMAN et al. (2000) unter Zuhilfenahme der Primer mmoXA und mmoXD (Tab. 19), welche einen etwa 1230 bp großen DNA-Bereich amplifizieren, nachgewiesen. Die Reaktionsansätze und -bedingungen sind den Tab. 20 und 21 zu entnehmen.

Tab. 19: Verwendete Primer zum Nachweis des *sMMO*-Gens. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C]
mmoXA (F)	ACCAAGGARCARTTCAAG	18	45	50,0
mmoXD (R)	CCGATCCAGATDCCRCCCCA	20	64	60,0

Tab. 20: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des *sMMO*-Gens.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μ l]	Bezogen auf 50 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1	0,2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1	0,2 μ M
dNTP (40 mM)	1	800 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM*
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Wasser	31	
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/ μ l)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

* Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 4 mM

3 Material und Methoden

Tab. 21: Bedingungen für die PCR-Amplifikation des *sMMO*-Gens.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	56	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

3.9.2.5 (Nested) Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR

Zur Klärung verwandtschaftlicher Verhältnisse wurde eine Specifically Amplified Polymorphic DNA (SAPD)-PCR sowie auf deren Grundlage eine Nested Specifically Amplified Polymorphic DNA (nSAPD)-PCR durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können unbekannte Organismen auf Art- und Stammniveau bestimmt werden (PFANNEBECKER, 2008; FRÖHLICH und PFANNEBECKER, 2006). Die spezifischen Eigenschaften der getesteten Primer sind in Tab. 22, die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für eine SAPD-PCR in Tab. 23 und die Reaktionsbedingungen in Tab. 24 angegeben.

Tab. 22: Verwendete Primer zur SAPD-PCR.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C]
A-Not	AGC GGC CGC A	10	80	47,6
C-Not	AGC GGC CGC C	10	90	51,8
G-Not	AGC GGC CGC G	10	90	51,8
T-Not	AGC GGC CGC T	10	80	47,6

Tab. 23: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes der SAPD-PCR.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μl]	Bezogen auf 50 μl
Primer (50 μM)	1	12 μM
dNTP (40 mM)	1	2 μM
MgCl ₂ (20 mM)	2	2 mM*
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	2,5	1 x
Wasser	12,5	
Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μl)	1	1 U
Template-DNA (20 ng/ μl)	5	100 ng
Gesamtvolumen	25	

* Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 4 mM

Tab. 24: Bedingungen für PCR-Amplifikation durch SAPD.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing	35	1 min
4	Temperaturanstieg	35 (+0,5)	12 s
5	15 Zyklen beginnend bei Nr. 4		
6	Annealing	42,5	1 min
7	Temperaturanstieg	42,5 (+1,5)	12 s
8	19 Zyklen beginnend bei Nr. 7		
9	Elongation	72	5 min
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
11	Finale Extension	72	10 min

Die verwendeten Primer der SAPD-PCR binden an komplementäre Stellen der palindromen Erkennungssequenz der *NotI*-Restriktionsendonuklease (5'-GCGGCCGC-3') und unterschieden sich lediglich durch ein an diese Sequenz an das 3'-Ende angefügtes Nukleotid (Tab. 25). Zur differenzierteren Unterscheidung der Isolate wurde eine nested SAPD-PCR (nSAPD-PCR) durchgeführt. Hierbei werden schwächere, jedoch unter Umständen wichtige Banden zur Art- und sogar Stammidentifizierung der SAPD-PCR an die Intensität der anderen Amplifikate angeglichen. Dazu wird der PCR-Reaktion ein sogenannter Enhancer zur Beschleunigung der PCR-Reaktion beigelegt und auf den

3 Material und Methoden

Einsatz einer Rampe verzichtet. Durch die Verwendung dieser nested Primer wie z.B. G-Not-G bei Einsatz von G-Not in der ersten SAPD-Reaktion wird die Einwirkung nichtreproduzierbarer Amplifikate eliminiert oder zumindest stark herabgesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionen von 25 μl glichen prinzipiell denen der SAPD-PCR (Tab. 23) mit dem Zusatz von 2,5 μl 5 x Enhancer Solution P (Peqlap, Erlangen). Darüber hinaus diente als Template-DNA 1 μl SAPD-PCR-Produkt. Der Annealing-Schritt wurde bei 39 °C für die A-Not-Primer bzw. bei 41 °C für die C- und G-Not-Primern durchgeführt (Tab. 26).

Tab. 25: Verwendete Primer bei nSAPD-PCR.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T_m [°C]
A-Not-A	AGC GGC CGC AA	11	72	49,2
A-Not-C	AGC GGC CGC AC	11	81	52,9
A-Not-G	AGC GGC CGC AG	11	81	52,9
A-Not-T	AGC GGC CGC AT	11	72	49,2
C-Not-A	AGC GGC CGC CA	11	81	52,9
C-Not-C	AGC GGC CGC CC	11	90	56,7
C-Not-G	AGC GGC CGC CG	11	90	56,7
C-Not-T	AGC GGC CGC CT	11	81	52,9
G-Not-C	AGC GGC CGC GC	11	90	56,7
G-Not-G	AGC GGC CGC GG	11	90	56,7
G-Not-T	AGC GGC CGC GT	11	81	52,9

Tab. 26: Bedingungen für PCR-Amplifikation durch nSAPD.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing		
	Primer: A-Not-A, -C, -G, -T	39	1 min
	Primer: C-Not-A/-C/-G/-T, G-Not-C/-G/-T	41	1 min
4	Elongation	72	5 min
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	10 min

3.9.2.6 Real-Time-quantitative-PCR

Die quantitative Real-Time-quantitative-PCR (qPCR) ist eine PCR-Methode, mit der neben der Amplifizierung von DNA auch deren Quantifizierung in Echtzeit gemessen werden kann. Bei der qPCR wurde das Fluorophor SYBR Green eingesetzt, welches an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Dadurch kommt es zur Zunahme der Fluoreszenzemission. Mit zunehmenden Amplifikaten der PCR wird also eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz erreicht. Mit Hilfe der qPCR wurde zum einen die bakterielle Zusammensetzung, zum anderen der Titer an MOB im Termitendarm untersucht wie auch die Existenz von MOB im Termitendarm nachgewiesen. Für den MOB-Nachweis wurde das Protokoll von YU et al. (2005) angewandt. Auch hier zielten die Primer auf die Gensequenz von *pmoA*. Es wurden die MOB-spezifischen qPCR-Primer A189 und mb661 verwendet (Tab. 27). Die Reaktionen von 25 μ l wurden in einem Realplex2 ep Gradient Mastercycler durchgeführt. Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen GmbH, Hilden) isoliert. Reaktionszusammensetzungen und Bedingungen der qPCR sind Tab. 28 und Tab. 29 zu entnehmen. Um die Gesamt-Bakterienanzahl zu bestimmen, wurden die Primer BAC338F und BAC805R angewandt (Tab. 27). Der Reaktionsansatz entsprach dem bei Verwendung der Primer A189 und mb661 und ist Tab. 28 zu entnehmen, die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 29 angegeben.

Tab. 27: Verwendete Primer zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft innerhalb des Termitendarms mittel qPCR. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T_m [°C]
BAC338F (F)	ACTCCTACGGGAGGCAG	17	65	72
BAC805R (R)	GACTACCAGGGTATCTAATCC	21	58	72
A189 (F)	GGNGACTGGGACTTCTGG	17	63	55
mb661 (R)	CCGGMGCAACGTCYTTACC	19	65	52

3 Material und Methoden

Tab. 28: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes bei qPCR zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μ l]
Mastermix	12,5
PCR-Wasser	9,48
forward Primer (10 pmol)	1
reverse Primer (10 pmol)	1
Template-DNA	1
BSA	0,02
Gesamtmenge	25

Tab. 29: Bedingungen für die qPCR-Amplifikation bei qPCR zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	10
2	Denaturierung	94	0,1
3	Annealing		
	BAC338F, BAC805R	60	1
	A189, mb661	56	1
4	40 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
5	Schmelzkurve	60 \rightarrow 95*	30

* kontinuierliche Erhöhung der Temperatur über 30 min in 20-s-Schritten

3.9.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methode zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren. Eine synthetische Sonde, die komplementär zur DNA-Zielsequenz ist, wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In diesem Fall wurden die Oligonukleotide M γ 84 und M γ 750 als für Typ I-spezifisches Sondengemisch am 5'-Ende mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff Cy3 markiert. Die Sonde M α 450 wurde ebenfalls derart markiert und wurde für den Typ II-Nachweis eingesetzt (Tab. 30, ELLER et al. (2001)). Zur Durchführung der FISH wurde das Protokoll nach HIRSCHHÄUSER et al. (2005) angewandt. Der Darminhalt einer Termiten bzw. 500 μ l von Klärwerk-, Pansen- oder aufkonzentrierten Mofetten-Proben

wurden in 2 ml NMS 131-Medium überführt und die Zellen bei 10000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal in 0,9 % NaCl (w/v) gewaschen und je 5 μ l der gewaschenen Zellen wurden auf eine Vertiefung eines diagnostischen Objektträgers gegeben. Nach der Lufttrocknung bei Raumtemperatur für 1 h wurden die Objektträger für 10 min bei 90 °C inkubiert und anschließend in 50, 70 und zweimal in 96 % Ethanol für je 5 min gewaschen. 2 μ l der M α 450-Sonde wurden mit 58 μ l Hybridisierungspuffer (20 mM Tris, 900 mM NaCl, 0,01 % SDS, 10 % Dextransulfat) gemischt. Für eine Typ I-spezifische Hybridisierung wurden je 2 μ l von M γ 84 und M γ 705 mit 56 μ l Hybridisierungspuffer gemischt. Die Sondenpuffer wurden auf die Objektträger gegeben und diese anschließend bei 72 °C für 10 min inkubiert. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 46 °C in einer wassergesättigten Kammer durchgeführt. Die Objektträger wurden in Waschpuffer (20 mM Tris, 900 mM NaCl, 0,01 % SDS) für 20 min bei 48 °C inkubiert, um ungebundene Sonden zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger im Dunkeln für 20 min mit 0,2 % (w/v) 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt, und nachfolgend mit dH₂O gespült. Die Objektträger wurden mit Antibleichlösung (80 % (v/v) Glycerin, 2,34 % (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan) bedeckt und die Proben mit einem Texas Red-chromatischen Filter ($\lambda_{Absorption,max} = 550$ nm, $\lambda_{Emission,max} = 570$ nm) untersucht. MOB erschienen durch den Farbstoff Cy3 rot. DAPI bindet in der kleinen Furche der DNA bevorzugt an AT-reiche Regionen und fluoresziert blau. Durch Überlagerung der blauen DAPI- und roten Cy3-Färbung erschienen MOB rosa.

Tab. 30: Verwendete Sonden zur spezifischen Detektion von Methanotrophen durch Ganzzellhybridisierung.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	T_m [°C]	GC [%]	Modifikation
M α 450	ATC CAG GTA CCG TCA TTA TC	55,3	45	5'-Cy3
M γ 705	CTG GTG TTC CTT CAG ATC	53,7	50	5'-Cy3
M γ 84	CCA CTC GTC AGC GCC CGA	62,8	72	5'-Cy3

3.9.4 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Die DGGE stellt hier ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Sequenzen anhand ihres GC-Gehalts dar. Die Auftrennung erfolgt aufgrund eines ansteigenden Gradienten der denaturierenden Substanzen Harnstoff und Formamid in einem Polyacrylamidgel.

3 Material und Methoden

Durchlaufen die DNA-Moleküle das Gel, so werden mit zunehmendem Gradienten die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. Zunächst werden die beiden Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin gelöst, die drei Bindungen zwischen Guanin und Cytosin werden erst bei höheren Konzentrationen an Harnstoff und Formamid aufgebrochen. Je nach Sequenz werden die DNA-Doppelstränge also unterschiedlich aufgeschmolzen und durchlaufen so differierend schnell das Gel. Die Reinheit eines Isolats kann so mit Hilfe dieser Methode überprüft werden. Um das komplette Aufspalten in zwei Einzelstränge zu verhindern, wird eine sog. GC-Klammer aus etwa 30 - 40 Cytosin- und Guaninbasen an das 5'-Ende des forward Primers gebunden. Die DNA wird nur bis zu dieser Klammer aufgetrennt und kommt an einer sequenzspezifischen Stelle im Gel zum liegen. Die DNA wurde aus den Isolaten mit Hilfe des Blood & Tissue Kits (Quiagen, Hilden) extrahiert und die 16S rDNA mit Hilfe der universellen Bakterienprimer EubakGC519for (5'-[CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCGCGCCGCC]AGCAGCCGCGGTAATA-3') und Eubak1070rev (5'-AGCTGACGACAGCCAT-3') mittels PCR amplifiziert. Die DGGE wurde nach STANTSCHIEFF et al. (2014) mit einem denaturierenden Gradienten in den Polyacrylamidgelen von 30 bis 70 % durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Gels ist Tab. 31 zu entnehmen. Der Lauf erfolgte in der Elektrophoresekammer D GENETM System in 1x TAE-Puffer (Tab. 32) bei 60 °C. Es wurden jeweils 40 µl des PCR-Produkts aufgetragen, wobei eine Auftrennung über 12 h bei 50 V erfolgte.

Tab. 31: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die DGGE.

Reagenz	Grenzkonzentration 30 %	Grenzkonzentration 70 %
Harnstoff	1,9	4,3
Formamid	1,8	4,2
dH ₂ O	8,5	4,5
40 % Bisacrylamid	3,0	3,0
50x TAE-Puffer	0,3	0,3
Glycerin	0,3	0,3
APS 1M	0,1	0,1
TEMED 1M	0,0045	0,0045

Tab. 32: TAE-Pufferzusammensetzung bei DGGE.

Substanz	50 x TAE-Puffer
Tris	242 g
Na ₂ EDTA (0,5M)	100 ml
Eisessig	57,1 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml

Der Puffer wurde auf pH 8,3 eingestellt.

3.9.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Dazu wurde Agarose in TBE-Puffer (Tris 10,8 g/l, Borsäure 5,5 g/l, Na₂EDTA 0,82 g/l) durch Aufkochen gelöst und in einen Gelträger gegeben. Nach der Auspolymerisierung wurde der Taschenformer entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt. Zur Überprüfung von PCR-Produkten wurden 1 %ige Agarosegele verwendet und 6 μ l Probe mit 1 μ l 6 x-Ladepuffer (Tab. 33) aufgetragen. Als Größenstandard dienen 6 μ l GeneRuler DNA Ladder Mix. Die Auftrennung erfolgte bei 100 - 120 V für 1,5 h. Zur Auswertung der Bandenmuster von (n)SAPD-PCR-Produkten wurde das Agarosegel nach dem Aufkochen mit 0,035 % Natronwasserglas versetzt, 7 μ l PCR-Produkt auf das Gel aufgetragen und bei 55 V über ca. 3 h aufgetrennt. Die DNA wurde mit Hilfe einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) sichtbar gemacht und in einer photographisch dokumentiert.

Tab. 33: Zusammensetzung des DNA-Ladepuffers.

Substanz	Menge
Tris/HCl, pH 8 (1M)	3,2 ml
Glycerin (100 %)	3,5 ml
dH ₂ O	2,5 ml
Bromphenolblau	2,5 mg

3.9.6 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen und PCR-Aufreinigung

Durch die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmente können einzelne DNA-Abschnitte spezifisch isoliert werden. Diese können nun mit einem Skalpell unter schwachem UV-Licht herausgeschnitten werden und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert werden.

Um PCR-Produkte von z.B. für die Sequenzierung eventuell störenden Rückständen wie Primern oder Nukleotiden zu befreien, wurde der PCR-Ansatz mit Hilfe des GeneJET PCR Purification Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.9.7 Klonierung

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Population im Termitendarm wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad) analysiert. Dieser Vektor pCRII-TOPO-Plasmid weist an der Multiple Cloning Site (MCS) einen Überhang an 3'-Thymidin auf. Die Taq-Polymerase der zuvor durchgeführten PCR mit den Primern Eubak5for und Eubak3rev (siehe Abschnitt 3.9.2.1, PFANNEBECKER (2008)) fügt an das 5'-Ende des Amplifikats einen Adenin-Überhang an, wodurch eine Ligatation des PCR-Inserts in die MCS des Plasmids erfolgt. Das verwendete Kit bedient sich hierbei statt einer DNA-Ligase einer Typ-I-DNA-Topoisomerase, welche kovalent an das 5'-Ende des linearisierten Vektors angeheftet ist. Die Topoisomerase spaltet an der spezifischen Sequenz 5'-CCCTT-3', wobei Energie freigesetzt wird, welche genutzt wird um eine kovalenten Bindung zwischen dem Phosphatrest des abgespaltenen Vektorstrangs und einem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase einzugehen (Abb. 12).

Diese Bindung wird wieder getrennt, wenn sich das 5'-OH-Ende des Insertes an die Phospho-Tyrosylbindung räumlich annähert und die Fremd-DNA wird in den Vektor integriert, wobei sich die Topoisomerase von der DNA trennt (INVITROGEN, 2012; MAY, 2012). Der Vektor weist eine Kanamycinresistenzkassette auf, mit der eine Selektion der erfolgreich transformierten Zellen auf entsprechendem Antibiotikum-haltigem LB-Festmedium erfolgen konnte.

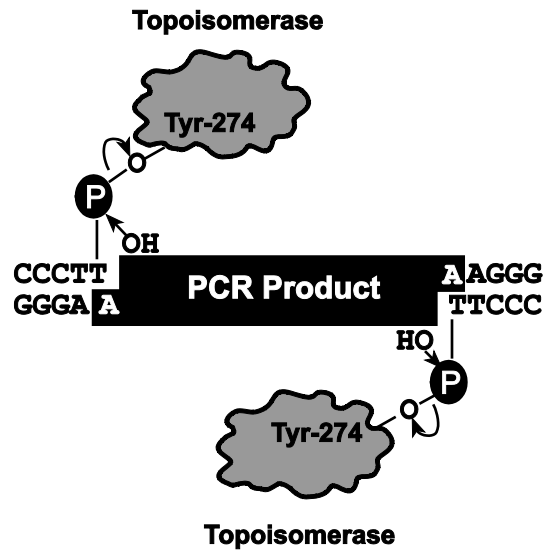


Abb. 12: Phosphotyrosyl-Bindung der Typ-I-Topoisomerase. Quelle: Invitrogen.

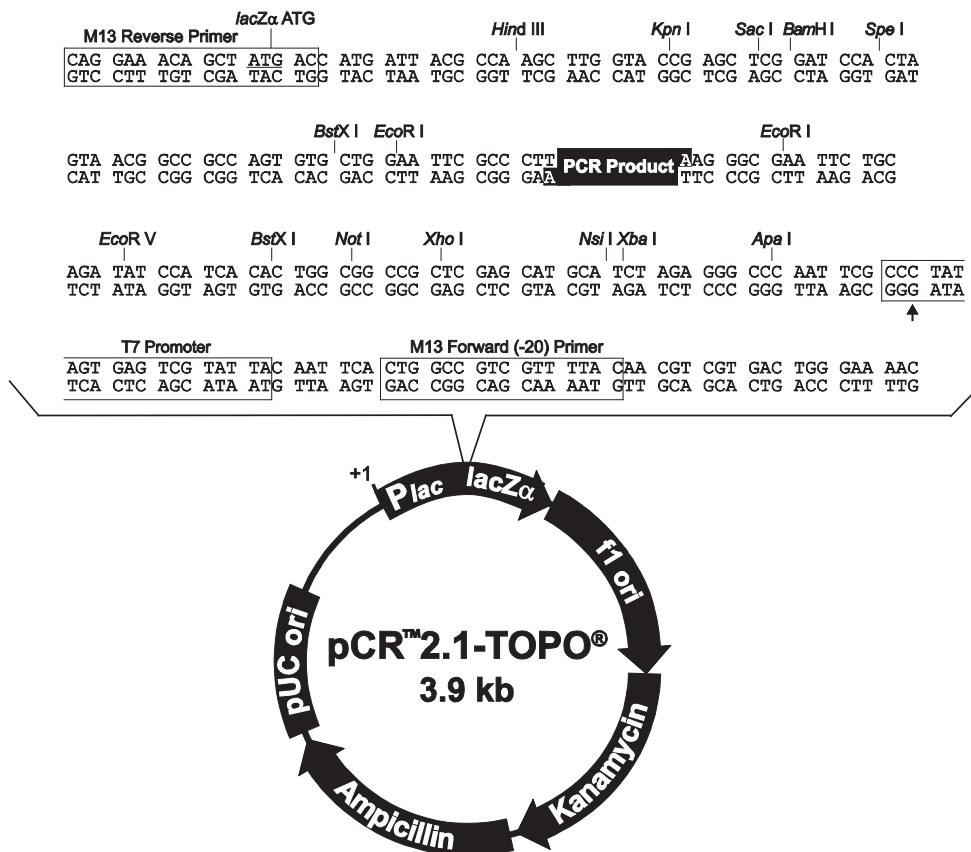


Abb. 13: Genmappe des verwendeten TOPO-Vektors. Quelle: Invitrogen.

3 Material und Methoden

Tab. 34: Verwendete Primer zur Amplifizierung eines Inserts aus der Termitendarmflora bei Klonierungsuntersuchungen. F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T _m [°C]
T3 (F)	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	20	40	48
T7 (R)	TAATACGACTCACTATAGGG	20	40	48

Tab. 35: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung eines Inserts aus der Termitendarmflora bei Klonierungsuntersuchungen.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [μ l]	Bezogen auf 50 μ l
Forward Primer (100 μ M)	0,6	0,2 μ M
Reverse Primer (100 μ M)	0,6	0,2 μ M
dNTP (40 mM)	1	800 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM*
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Wasser	38,8	
Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	2	2 U
Kolonie als Template-DNA		
Gesamtvolumen	50	

* Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 4 mM

Tab. 36: Bedingungen für die PCR zur Amplifizierung eines Inserts aus der Termitendarmflora bei Klonierungsuntersuchungen.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	94	10
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	45	1
4	Elongation	72	2
5	25 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

Die Transformation erfolgte chemisch nach Anleitung des Herstellers in kompetente *E. coli*-Zellen. Die Inserts wurden mit Hilfe der im Kit enthaltenen Primern T7 und T3 (Tab. 34 - 36) amplifiziert und mittels Gelelektrophorese auf Größen zwischen 150 bis

1500 bp determiniert. Nur Klone, die ein Insert von mind. 1200 bp auswiesen wurden sequenziert. Die Daten wurden mit Sequenzen der NCBI-GenBank abgeglichen.

3.9.8 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Sequenzierungen wurde von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) als Auftragsarbeit durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden mit hinterlegten Sequenzen aus der NCBI Datenbank GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen (BLAST-Suche).

3.10 Physiologische Untersuchungen

Die physiologischen Untersuchungen wurden zur näheren Charakterisierung der methanotrophen Isolate durchgeführt.

3.10.1 Nachweis der Ausbildung der sMMO

Neben dem Nachweis der sMMO-Gensequenz mittels PCR (Abschnitt 3.9.2.4) wurde die Exprimierung dieses Enzyms durch einen kolorimetrischen Naphtalin-Oxidationsassay nach BOWMAN et al. (1993) untersucht. Hierfür wurden die Kulturen in kupferfreiem Medium bis zur späten exponentiellen Phase angezogen und die Zellen mittels Ultraschall aufgebrochen. Diese Zellen wurden mit sterilem, kupferfreiem Medium auf OD_{600nm} 0,3 verdünnt. Es wurden 1 ml der Zellsuspension und 1 ml einer 235 μ M Naphtalin-Lösung vermischt und bei 25 °C und 200 UpM über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l einer 0,2 % (w/v) Fast Blue BN-Lösung (Sigma) zugegeben und auf Farbumschlag hin bei 525 nm untersucht. Als Kontrolle dienten Isolate, die in kupferhaltigem NMS-Medium gezogen wurden, sowie hitzegetötete und in kupferfreiem Medium angezogene Isolate.

3.10.2 Zellwandstabilität gegenüber SDS

Die Zellstabilität gegenüber SDS wurde nach LINDNER et al. (2007) getestet. Hierbei wurden 195 μ l der zu untersuchenden Kultur mit 5 μ l einer SDS-Lösung versetzt und über 2 h inkubiert. Getestet wurden 1 - 10 %ige SDS-Lösungen (w/v). Neben einer

lichtmikroskopischen Überprüfung der Zellyse wurde eine eventuelle Abnahme der OD bei 620 nm gemessen.

3.10.3 Toleranz gegenüber NaCl

Die Toleranz gegenüber NaCl wurde durch Zusatz von 0,01 bis 10 % NaCl zum NMS 131-Flüssigmedium, welches mit der zu untersuchenden Kultur mit einem Inokulum von 2,5 % beimpft wurde, analysiert. Für den Referenzstamm *Methylocystis bryophila* wurde das NMS M2-Medium verwendet. Das Wachstum der Kulturen wurde nach 14 Tagen durch Bestimmung der OD bei 620 nm ermittelt (vgl. Abschnitt 3.2.4).

3.10.4 Temperaturoptimum und -toleranz

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums und -spektrums wurden 7 ml NMS 131-Flüssigmedium bzw. NMS M2-Medium für *Methylocystis bryophila*, mit 2,5 % der zu untersuchenden Kultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 °C. Das Wachstum wurde mittels Bestimmung der OD_{620nm} ermittelt.

3.10.5 pH-Optimum und -toleranz

Die Bestimmung des pH-Optimums sowie des pH-Spektrums erfolgte durch Einstellung des pH-Wertes von 7 ml NMS 131- bzw. NMS M2-Medium für *Methylocystis bryophila* auf die Werte 2, 4, 6, 8 und 10 mit Hilfe von 1 N HCl- bzw. KOH-Lösung. Die Medien wurden 2,5 % mit der entsprechenden Kultur beimpft und bei 30 °C für 14 Tage inkubiert. Die Zunahme der Zelldichte wurde photometrisch durch Determinierung der OD_{620nm} bestimmt.

3.10.6 Verwertbare Kohlenstoffquellen

Neben der Verwertung von Methan wurden auch andere Kohlenstoffquellen auf ihre Verwertbarkeit durch MOB hin untersucht. Methan wurde hierfür durch Glucose, Methylamin, Methanol und DMSO in einer Konzentration von 0,2 % ersetzt. Das Flüssigmedium wurde mit 2,5 % Inokulum beimpft und die eventuelle Zunahme der Zelldichte photometrisch bei OD_{620nm} zum Zeitpunkt der Beimpfung sowie nach 14 Tagen bestimmt.

3.10.7 Verwertbare Stickstoffquellen

Als mögliche verwertbare Stickstoffquellen wurde KNO_3 durch 0,1 % L-Aspartat, L-Asparagin, L-Lysin, L-Glutamin und L-Ornithin ersetzt. Das Flüssigmedium wurde mit 2,5 % Inokulum beimpft und die eventuelle Zunahme der Zelldichte photometrisch bei OD_{620nm} zum Zeitpunkt der Beimpfung sowie nach 14 Tagen bestimmt.

3.10.8 Hitzeresistenz

Die Isolate und Referenzstämme wurden auf eine mögliche Resistenz gegenüber Hitze untersucht, indem die untersuchten Stämme 5 Tage lang bei 30 °C in Flüssigmedium kultiviert und anschließend über einen Zeitraum von 20 min 80 °C ausgesetzt wurden. Die so behandelten Methanotrophen wurden auf NMS-Festmedium ausplattiert. Konnte hier eine Koloniebildung festgestellt werden, so kann auf Hitzeresistenz durch Cystenbildung rückgeschlossen werden.

3.11 Untersuchungen zur Formiatausscheidung von methanotrophen Bakterien

3.11.1 Formiatnachweis

Die Bestimmung des Stoffwechselzwischenprodukts Formiat erfolgte enzymatisch mit Hilfe des UV-Tests zur Bestimmung von Ameisensäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien von r-biopharm (Darmstadt). Eine Analyse mittels GC war aufgrund eines fehlenden Kaltaufgabesystems bei der sehr flüchtigen Ameisensäure nicht möglich. Die Bestimmung mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) war aufgrund der theoretisch errechneten geringen Mengen an Formiat aufgrund der relativ niedrigen Empfindlichkeit nicht möglich. Die Berechnung der theoretisch gebildeten Ameisensäure ergibt sich aus dem durchschnittlichen Methanverbrauch der Kulturen von ca. 0,1 g/l. Würde das Methan nicht zur Kohlenstoffassimilation verwendet werden, sondern ausschließlich weiter zu Formiat oxidiert werden, können also theoretisch maximal 0,1 g/l Formiat entstehen.

3.11.2 Zusatz von Formiatanaloga

Durch Zugabe von 0,1 g/l der Formiatanaloga Methylchlorformiat, Ethylchlorformiat, 2-Ethylhexylchlorformiat, Isopropylchlorformiat oder Butylchlorformiat wurde untersucht, ob diese Substanzen in der Lage waren, die Formiatdehydrogenase (FDH) zu blockieren und ob dies zu einer vermehrten Freisetzung von Formiat führt. Nach Zugabe der Analoga wurde der pH-Wert der Medien auf 6,8 eingestellt und diese mit 2,5 % des zu untersuchenden Organismus beimpft.

3.11.3 Einsatz von artifiziellen Elektronenakzeptoren

Durch den Einsatz von artifiziellen Elektronenakzeptoren mit einem gleichwertigen Redoxpotential wie die FDH wird eine mögliche Unterbrechung der Oxidation von Formiat zu CO₂ untersucht, was zu einer gesteigerten Formiatfreisetzung führen kann. Es wurden NAD⁺, TTC und Benzylviologen mit 0,1 g/l zum Medium zugefügt. Der pH wurde anschließend auf 6,8 eingestellt und das Medium mit 2,5 % des zu untersuchenden Organismus beimpft.

4 Ergebnisse

4.1 Verbreitung von methanoxidierenden Bakterien in verschiedenen Habitaten

Es wurde in folgenden Umweltproben nach der Präsenz von MOB gesucht: in der obersten Sedimentschicht des Laacher Sees, den Faultürmen des Mombacher Klärwerks in Mainz, Kuhpansen und Termitendärmen. Der Laacher See wurde ausgewählt, da dieser u.a. für die aufsteigenden Methanquellen bekannt ist. Methanquellen sind ein erstes Indiz für ein mögliches Vorkommen von methanoxidierenden Bakterien. In den Faultürmen des Klärwerks wird ebenfalls Methan durch die dort befindlichen Methanogenen gebildet. Aus dem gleichen Grund wurde zum einen der Inhalt eines Kuhpansens sowie die bakterielle Mikroflora an dessen Zoten auf MOB hin untersucht. Termiten tragen mit ihrer Methanproduktion zu 2 - 4 % der weltweiten CH_4 -Emission (SUGIMOTO et al., 2000) bei und stellen hierdurch ebenfalls ein interessantes Untersuchungsfeld dar. Zudem wurden noch nicht näher untersuchte Termitenisolate der Stammsammlung des IMW daraufhin untersucht, ob es sich hierbei möglicherweise um MOB handelte. Die Proben wurden in NMS Medium 131 aufgenommen und aufsteigend durchnummeriert. Die Proben wurden gaschromatographisch auf ihr Vermögen zur Methanreduktion über einen Zeitraum von 14 Tagen hin untersucht, wobei keine Probe aus dem Kuhpansen eine Abnahme des Methangehalts aufwies, sondern im Gegensatz eine leichte Zunahme. Alle Proben, die in der Lage waren den Methangehalt zu reduzieren sind in Tab. 37 angegeben. Als Vergleich ist ebenfalls der Methanverbrauch von MOB-Referenzstämmen angegeben. Die Proben des Laacher Sees zeigten ein sehr unterschiedliches Verhalten im CH_4 -Abbau mit einer hohen Reduktion von 29 % bei Probe 570 oder auch sehr schwachem Abbau von < 1 % bei Probe 569. Dagegen zeigten fast alle Proben des Klärwerks eine eindeutige Reduktion der Methanrate. Insbesondere Probe 571 zeigte eine starke Reduktion von 31 %. Die Kulturen aus der Stammsammlung des IMWs wiesen insgesamt nur einen schwachen Methanabbau auf, die höchste Abnahme war bei Probe 270 mit 14 % zu verzeichnen. Unter den Proben aus den Termitendärmen zeigten diejenigen aus *Neotermes castaneus* insgesamt den schwächsten Abbau, wie bspw. Probe 403 mit 0,89 %. Eine Ausnahme bildete hier Probe 613, welche den Methangehalt um 20 % reduzierte. Die Termitenproben erzielten teilweise hohe Abbauraten von beispielsweise 45 % von Probe 640 aus *Incisitermes marginipennis* oder Probe 639 mit 38 % aus *Mastotermes darwiniensis*. Die Referenzstämme reduzierten das Methan in

4 Ergebnisse

unterschiedlichem Maß. Eine schwache Abnahme von 3 % wurde etwa für *Methylosinus sporium* beobachtet. Die höchste Abbaurate zeigte hier *Methylocystis echinoides* mit 31 %, gefolgt von *Methylomonas methanica* mit 29 % und *Methylocystis bryophila* mit einer Reduzierung um 26 %.

Tab. 37: Abnahme der Methankonzentration von Umweltproben aus dem Laacher See, dem Faulturm des Mombacher Klärwerks, Termitendärmen und aus der Stammsammlung des IMW in % innerhalb von 14 Tagen.

Entnahmeort	Probe	Abnahme CH ₄ -Gehalt [%]
Laacher See	5	7,03
	10	6,36
	13	27,94
	20	18,89
	25	13,34
	306	14,42
	397	4,79
	569	0,78
	570	28,55
	Klärwerk	103
107		10,49
108		10,79
122		0,21
199		34,91
288		10,6
478		15,4
482		14,58
487		6,89
488		0,73
503		28,18
503		28,18
571		30,36
572		0,56
Termitendarm	301	3,67
	400	24,76
	403	0,89
	407	18,83
	495	8,76
	502	7,29

Entnahmeort	Probe	Abnahme CH ₄ -Gehalt [%]
IMW	579	24,9
	580	1,96
	595	2,05
	610	35,78
	613	19,63
	626	31,25
	634	21,82
	638	35,36
	639	37,45
	640	44,67
	204	4,23
	208	12,06
	213	1,16
	218	1,67
	245	1,03
	250	7,69
	257	5,04
	264	4,08
	269	5,88
	270	13,42
Referenzstämme	506	5,13
	508	9,38
	<i>Methylocystis luteus</i>	13,6
	<i>Methylocystis parvus</i>	10,53
	<i>Methylocaldum gracile</i>	7,66
	<i>Methylocapsa acidophila</i>	6,49
	<i>Methylomonas methanica</i>	29,31
	<i>Methylosinus sporium</i>	2,57
<i>Methylocystis bryophila</i>	26,23	
<i>Methylocystis echinoides</i>	31,25	

Abb. 14 zeigt den durchschnittlichen Methanverbrauch der Proben aus den verschiedenen Entnahmestellen. Die Proben der Stammsammlung des IMW wiesen die insgesamt niedrigste Abbaurate mit 6 % auf. Die Proben des Laacher Sees wie auch des Klärwerks zeigten durchschnittlich sehr ähnliche Abnahmen von 14 %. Die höchsten Abbauraten aller Entnahmeorte wiesen die Proben des Termitendarms mit 20 % auf. Die Referenzstämme zeigten eine durchschnittliche Abnahme um 16 %.

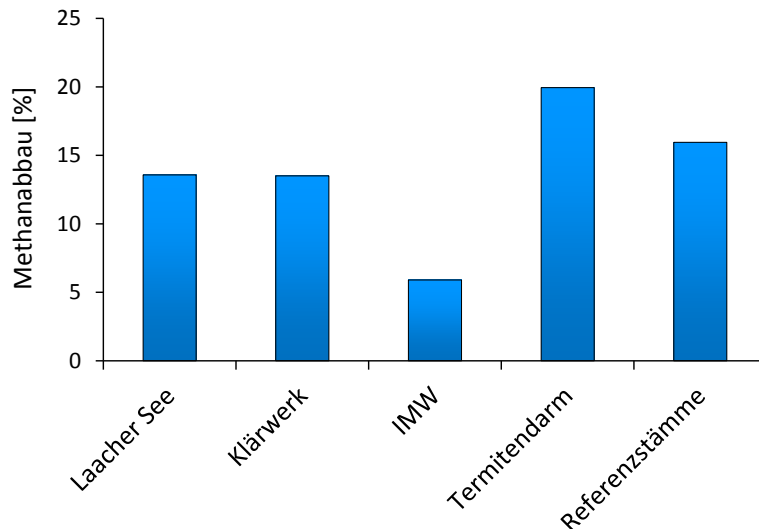


Abb. 14: Durchschnittliche Methanabnahme der Proben aus den jeweiligen Entnahmestellen über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Die Termitenproben wurden aufgrund ihrer hohen Methanabbauraten für nähere Analysen herangezogen.

4.2 Inhomogene Verteilung der bakteriellen Mikroflora im Termitendarm

Bevor die Isolierung von methanabbauenden Bakterien aus dem Termitendarm erfolgte, wurde die Gesamtheit der bakteriellen Mikroflora analysiert. Hierfür wurde das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad) herangezogen. Die durch die Klonierung in kompetenten *E. coli*-Zellen gewonnenen Inserts wurden sequenziert und mit der *in silico*-Datenbank GenBank (NCBI, MEGABLAST) abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 38 dargestellt. 26 % der Bakteriensequenzen konnten keiner bekannten Gattung eindeutig zugeordnet werden. Am häufigsten traten die Ordnung Spirochaetales sowie die Proteobacteria mit einer Häufigkeit von je 29 % auf. 60 % hiervon nehmen die α -Proteobacteria ein, denen auch MOB zugeordnet werden. Die restlichen 15 % der Sequenzen konnten Firmicutes und Planctomycetales zugeordnet werden.

Tab. 38: Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora im Darm von *Incisitermes marginipennis*. Prokaryotische 16S rDNA-Genfragmente wurden mittels Klonierung in *E. coli* voneinander getrennt und durch BLAST-Analyse identifiziert.

Bakteriengruppe	Anteil [%]
Spirochaetales	29,4
β -Proteobacteria	17,6
α -Proteobacteria	11,7
Firmicutes	9,3
Planctomycetales	5,9
Unbekannt	26,1

4.3 Methanotrophe Bakterien im Intestinaltrakt verschiedener Termiten

Ein erster Hinweis auf MOB im Intestinaltrakt von Termiten erfolgte durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden, die spezifisch auf die 16S rDNA der Typ I- und Typ II-MOB zielten. Darüber hinaus wurde die DNA des Termitendarminhalts auf die Existenz des Gens der partikulären Methanmonooxygenase (pMMO) hin untersucht. Die pMMO ist das Schlüsselenzym der Methanoxidation zu CO₂ und wird von allen bekannten MOB ausgebildet. Zur Detektion der pMMO wird das Gen *pmoA*, welches die α -Untereinheit der pMMO kodiert, herangezogen. *pmoA* wurde zum einen zur reinen Überprüfung der Existenz von MOB im Termitendarm mittels PCR verwendet, aber auch zur quantitativen MOB-Zellbestimmung mit Hilfe der qPCR genutzt.

4.3.1 Nachweis durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Der Nachweis von MOB im Termitendarm erfolgte über die Typ I- und Typ II-spezifischen Primer M γ 84 und M γ 705 bzw. M α 450. Es wurden in keiner Termitenart Typ I-MOB nachgewiesen. Typ II-MOB wurden innerhalb der reichen und komplexen Mikroflora des Termitendarms in Akkumulationen gefunden (Abb. 15 A). Abb. 15 B zeigt die gleiche Probe mit einer Verdünnung von 10³. Bei der Untersuchung von einzelnen Abschnitten des Darms (Vorderdarm, Mitteldarm und Hinterdarm) wurde eine deutliche Ungleichverteilung der MOB in allen Termiten erkennbar, wobei im Ösophagus überhaupt keine MOB nachgewiesen wurden (siehe auch Abb. 18).

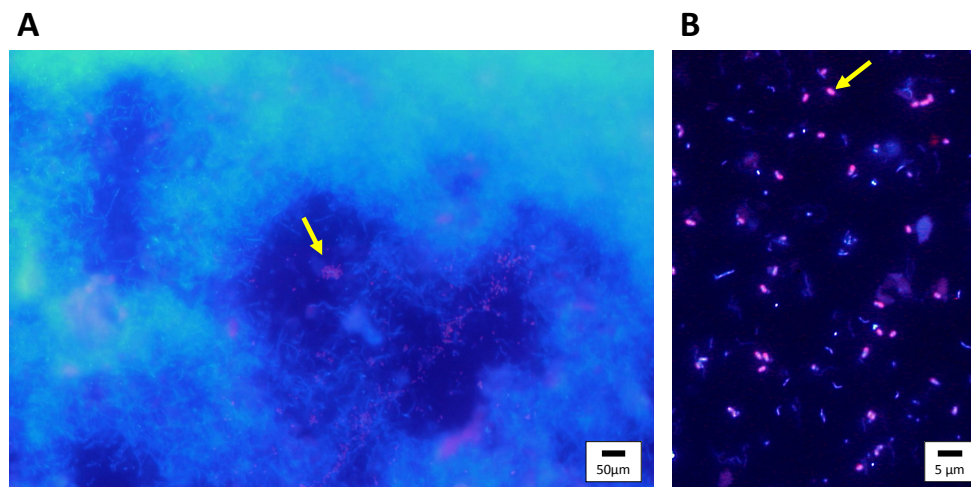


Abb. 15: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit MOB-Typ II-spezifischen, mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff Cy3 markierten Sonden. Ein Overlay der roten MOB mit DAPI-gefärbten Zellen resultiert in rosa gefärbten Zellen. A: innerhalb der komplexen Mikrofloren des Termitendarms liegen die MOB in Clustern vor. B: 10³-Verdünnung der Probe von A. Der Gelbe Pfeil zeigt exemplarisch ein MOB auf.

4.3.2 Nachweis durch *pmoA*-spezifische Primer

Die DNA des Termiteninhalts wurde mit spezifischen Primern für das Gen der α -Untereinheit der pMMO, *pmoA*, hin untersucht. Für einen exakten Nachweis wird zunächst eine PCR mit den Primern pmof1 und pmor durchgeführt. Die spezifischen PCR-Amplifikate weisen eine Größe von 330 bp auf und wurden in allen verwendeten Referenzstämmen (*Methylococcus capsulatus*, *Methylobacter luteus*, *Methylomonas methanica*, *Methylocystis parvus*, *Methylosinus sporium*, *Methylocystis hirsuta*, *Methylocystis bryophila* und *Methylocystis echinoides*) lokalisiert. Es konnte kein Amplifikat in der Negativkontrolle *Escherichia coli* gefunden werden. Die Ergebnisse für *Incisitermes marginipennis*, *Mastotermes darwiniensis*, *Neotermes castaneus* sowie den Referenzen *Methylocystis echinoides* als Typ II und *Methylobacter luteus* als Typ I MOB sind in Abb. 16 wiedergegeben.

Die Identität des PCR-Amplifikats von 330 bp wurde mit einer nested PCR mit den Primern pmof2 und pmor durch die Generierung eines Amplifikats von 178 bp bestätigt (Abb. 17).

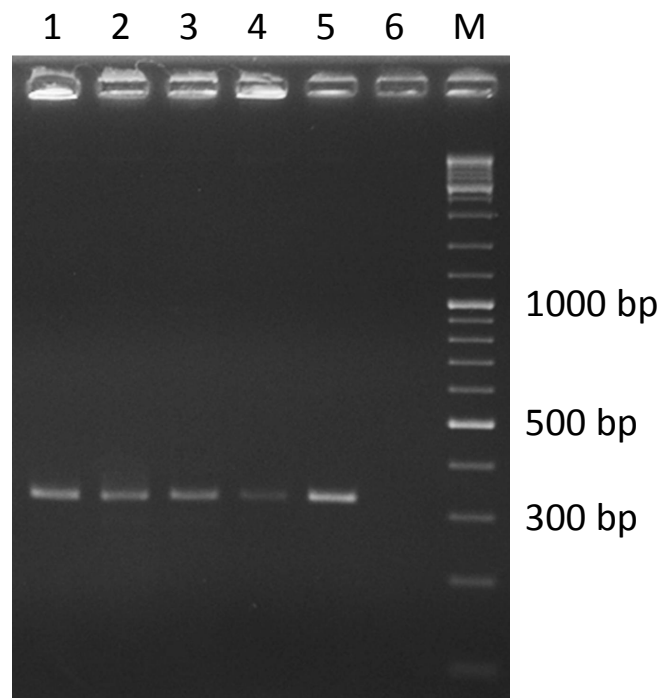


Abb. 16: Detektion des mit dem Primerpaar pmof1-pmor amplifizierten *pmoA*-Gens. Die DNA wurde gewonnen aus dem Darminhalt von 1: *Incistitermes marginipennis*, 2: *Mastotermes darwiniensis*, 3: *Neotermes castaneus*, 4: *Methylocystis echinooides*, 5: *Methylobacter luteus* und 6: *Escherichia coli*. Ein PCR-Produkt von 330 bp wurde in Spur 1 - 5 ermittelt. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

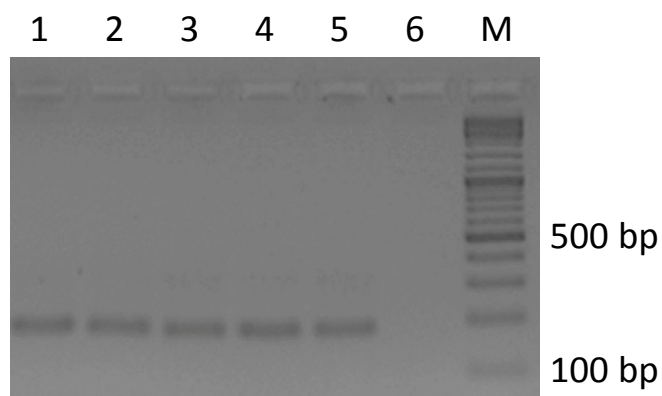


Abb. 17: Detektion des mit dem Primerpaar pmof2-pmor amplifizierten *pmoA*-Gens. Das 330 bp PCR-Produkt, welches mit den Primern pmof1 und pmor aus der DNA von Darminhalten verschiedener Termiten gewonnen wurde (Abb. 16), diente als Template in einer PCR mit den Primern pmof2 und pmor. DNA aus 1: *Incistitermes marginipennis*, 2: *Mastotermes darwiniensis*, 3: *Neotermes castaneus*, 4: *Methylocystis echinooides* und 5: *Methylobacter luteus*. 6: DNA welche direkt aus *Escherichia coli* isoliert wurde. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). PCR-Produkte mit einer Größe von 178 bp wurden in Spur 1 - 5 detektiert.

4.3.3 Nachweis mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) bietet diese Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der MOB-Zellzahl. Um die Zellzahl in Relation zur Termitengröße und dem dazugehörigen spezifischen Darmvolumen sowie in Relation zur Gesamtzellzahl zu bestimmen, wurden vorab diese Parameter ermittelt.

4.3.3.1 Gewichtsbestimmung der verwendeten Termiten

Das Gewicht der Termiten wurde durch Wiegen ermittelt. Der Darm wurde aus der Termiten präpariert und das Gewicht samt Darminhalt durch Wiegen bestimmt. Das Darmvolumen wurde mittels einer Hamilton-Pipette abgemessen. Die Daten sind in Tab. 39 zusammengefasst.

Das absolut größte Darmgewicht zeigte *Mastotermes darwiniensis* als größte untersuchte Termitenart auf. Der prozentuale Anteil des Darmgewichts zum Körpergewicht liegt bei 22 %. *Captotermes formasanus* weist einen sehr ähnlichen Anteil auf. Den größten Anteil des Darmgewichts am Körpergewicht mit 30 % besitzt jedoch *Neotermes castaneus*. Der geringste Gewichtsanteil wurde mit 10 % bei *Kalotermes flavicollis* ermittelt. *Reticulitermes flavipes* und *Incisitermes marginipennis* weisen Anteile von 12 % bzw. 15 % auf.

Tab. 39: Termitengewicht, Darmgewicht und Darmvolumen der verwendeten Termiten.

Termitenart	Körpergewicht [g]	Darmgewicht [g]	Anteil Darmgewicht	Darmvolumen [μ l]
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	0,065 ± 0,008	0,014 ± 0,005	22 %	10,00 ± 3,00
<i>Neotermes castaneus</i>	0,01 ± 0,002	0,003 ± 0,002	30 %	2,00 ± 1,50
<i>Incisiterma marginipennis</i>	0,02 ± 0,007	0,003 ± 0,002	15 %	1,50 ± 0,50
<i>Reticulitermes flavipes</i>	0,0042 ± 0,002	0,0005 ± 0,0002	12 %	0,50 ± 0,50
<i>Kalotermes flavicollis</i>	0,006 ± 0,003	0,0006 ± 0,0002	10 %	0,50 ± 0,50
<i>Captotermes formasanus</i>	0,004 ± 0,001	0,0009 ± 0,0004	22 %	0,50 ± 0,50

4.3.3.2 Verteilung der Gesamtzellzahl und von MOB im Termitendarm

Abb. 18 zeigt die Anzahl und Verteilung aller Bakterien sowie der MOB im Termitendarm. Hierfür wurden die universellen Bakterien-Primer BAC338F und BAC805R bzw. die MOB spezifischen Primer A189 und mb661 verwendet. Im Durchschnitt wurden $1,2 \cdot 10^8$ Bakterien in einem ganzen Termitendarm gefunden. In allen Termitenarten wurde die dichteste Zellzahl von $1,2 \cdot 10^8$ im Hinterdarm ermittelt. Im Bereich des Vorderdarms konnte der Titer auf durchschnittlich $3,5 \cdot 10^4$ und im Mitteldarm auf im Schnitt $6 \cdot 10^4$ Zellen bestimmt werden. Durch die Verwendung der Typ I- und Typ II-spezifischen MOB-Primer A189 und mb661 konnte zum einen die Abwesenheit von Typ I MOB bestätigt werden. Typ II MOB wurden mit einem Titer von durchschnittlich $0,9 \cdot 10^3$ im Gesamtdarm gefunden. Hierbei wurden keine MOB im Vordarm detektiert, $0,6 \cdot 10^2$ Zellen im Mitteldarm und $0,8 \cdot 10^3$ Zellen im Hinterdarm, welcher somit den Darmabschnitt mit dem höchsten Titer an Bakterien und MOB darstellt.

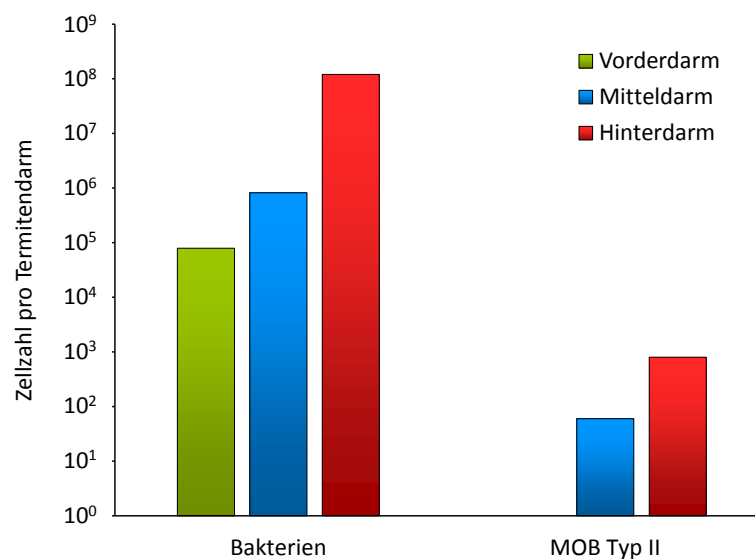


Abb. 18: Verteilung von Bakterien im Allgemeinen und MOB Typ II in den verschiedenen Sektionen des Termitendarms von *Incisitermes marginipennis*. Die Zellzahlen wurden mittels qPCR bestimmt.

Um zu lokalisieren, ob die MOB frei in der Termitendarmflüssigkeit vorliegen oder sich an der Epithelwand anheften, wurden verschiedene qPCR-Ansätze analysiert. Zum einen wurde der Termitendarminhalt als Template herangezogen, zum anderen wurde die zuvor sanft gespülte Epithelwand grob gewaschen und das Washwasser auf MOB

hin untersucht. Es konnte keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die MOB dem Epithel anhaften oder in der Termitendarmmatrix frei vorliegen. Die MOB-Verteilung in 1. und 2. Waschflüssigkeit wiesen mit jeweils rund $0,7 \cdot 10^3$ Zellen keinen signifikanten Unterschied untereinander auf.

4.4 Isolierung methanoxidierender Bakterien aus dem Termitendarm

Nach erfolgreichem Nachweis von MOB in den Därfen verschiedener Termiten wurden die methanotrophen Bakterien aus der komplexen Mikroflora isoliert und charakterisiert. Hierfür wurden die Termitenproben zunächst in flüssigem NMS-Medium seriell verdünnt und die Zellen durch einen Verdünnungssaustrich vereinzelt. Einzelne Kolonien wurden wieder flüssigem NMS-Medium zugeführt und die so gewonnenen Isolate nummeriert, darunter die Kulturen 610 (aus dem Darm von *Mastotermes darwiniensis*), 613 (*Neotermes castaneus*), 626 (*Mastotermes darwiniensis*), 639 (*Mastotermes darwiniensis*) und 640 (*Incistitermes marginipennis*). Die Methanabbauraten wurden in Relation zur Zellzahl bestimmt, um so den CH_4 -Verbrauch jeder einzelnen Zelle zu ermitteln und das Vermögen zum Methanabbau exakt bestimmen zu können (Abb. 19). Zum Vergleich sind mehrere Referenzstämme mit aufgeführt.

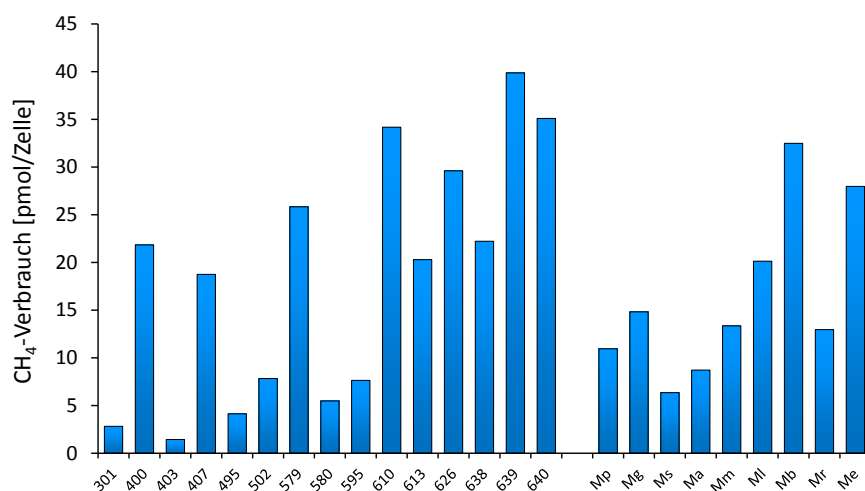


Abb. 19: Spezifischer Methanverbrauch [pmol/Zelle] ausgewählter Isolate und Referenzstämme über einen Zeitraum von 14 Tagen. Mp: *Methylocystis parvus*; Mg: *Methylocaldum gracile*; Ms: *Methylosinus sporium*; Ma: *Methylocapsa acidophila*; Mm: *Methylomonas methanica*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Mr: *Methylocystis rosea*; Me: *Methylocystis echinoides*.

Die Reinkulturen der Termitenisolate wiesen auch in Relation zur Zellzahl hohe Methanabbauraten auf, z.B. wurde im Isolat 639 Methan um 39,9 pmol/Zelle innerhalb von 14 Tagen reduziert. Viele Isolate übertrafen dabei die Abbauraten der Referenzstämme, unter denen *Methylocystis bryophila* mit 32,5 pmol/Zelle den höchsten Methankonsum aufwies.

4.4.1 Überprüfung der Reinheit der Isolate

Zur Überprüfung der Reinheit der Isolate, wurden diese auf komplexes LB-Medium ausgestrichen. Keines der Isolate zeigte hier Wachstum. MOB sind in der Lage, C₁-Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, nicht aber komplexere Verbindungen. Das Ausbleiben von Wachstum zeigt die Abwesenheit von Cokulturen an und bestätigt die Reinheit der methanotrophen Termitenisolate. Zusätzlich wurde die DNA mittels DGGE analysiert. Das Auftreten von lediglich einer einzigen Bande bezeugte die Reinheit der Kultur (Abb. 20).

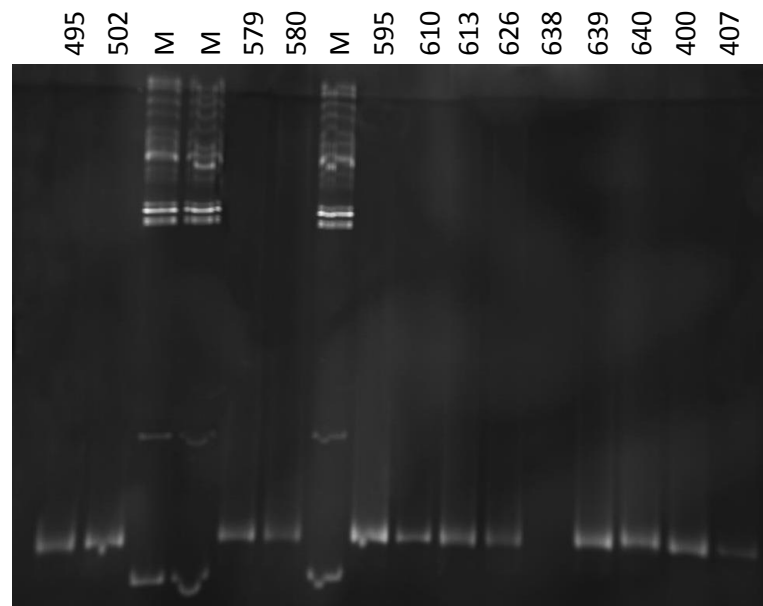


Abb. 20: Überprüfung der Reinheit gewonnener Isolate mittels degenerativer Gradientengelelektrophorese (DGGE). Die Generierung von lediglich einer Bande zeigt die Reinheit dieser Kultur an. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

4.5 Systematische Zuordnung der methanabbauenden Isolate

Zur Identifizierung der gewonnenen Isolate wurde die komplette 16S rDNA-Sequenz mit Hilfe der in Abschnitt 3.9.2.1 aufgeführten Primer erhalten.

4.5.1 16S rDNA-Gensequenzen der methanotrophen Termitenisolate

Durch Abgleich der 16S rDNA-Sequenzen mit der *in silico*-Datenbank GenBank (NCBI, MEGABLAST) konnten die Termitenisolate alle der Gattung *Methylocystis* zugeordnet und eindeutig untereinander unterschieden werden. Eine nähere Zuordnung zu einer bestimmten Art wurde jedoch nicht erreicht. Die verwandtschaftlich nächsten Treffer sind in Tab. 40 angegeben.

Tab. 40: Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenzvergleiche der Termitenisolate mit Hilfe der *in silico*-Datenbank GenBank von NCBI.

Termitenisolat	Identität	Trefferorganismus
610	99 %	<i>Methylocystis</i> sp. SC 2 Type II methanotroph AML-A3
	98 %	Uncultured bacterium HOICi39
613	99 %	<i>Methylocystis</i> sp. SC 2 <i>Methylocystis</i> sp. M261 <i>Methylocystis</i> sp. B3 <i>Methylocystis</i> rosea SV97
	99 %	Type II methanotroph AML-A6 <i>Methylocystis</i> sp. m231
		98 %
	639	99 %
98 %		<i>Methylocystis</i> parvus <i>Methylocystis</i> bryophila H2s
		99 %
640	99 %	<i>Methylocystis</i> sp. m261 <i>Methylocystis</i> sp. m231
	98 %	

4.5.2 Specifically amplified polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) und nested specifically amplified polymorphic DNA-PCR (nSAPD-PCR)

Der Nachweis von MOB im Termitendarm wurde mit den *pmoA*-spezifischen Primern pmof1, pmof2 und pmor (Abschnitt 3.9.2.2) erbracht. Durch die Analyse der 16S rDNA-Sequenz konnten alle Termitenisolate der Gattung *Methylocystis* zugeordnet werden, jedoch nicht eindeutig einer bestimmten Art. Um diesen Umstand zu klären, wurde zunächst eine SAPD- und nSAPD-PCR, bei der Proben auf Stammniveau unterschieden werden können, durchgeführt (Abb. 21 und 22). Die Bandenmuster der Isolate 610, 626, 639 und 640 stimmten bei der SAPD-PCR oberflächlich betrachtet überein, doch unterschieden sich bei genauerem Hinsehen eindeutig. Die Spuren von Isolate 610 und 639 bei der nSAPD-PCR zeigten grobe, aber dennoch eindeutig zu differenzierende Muster. Diese wiesen keine Übereinstimmung mit den Isolaten 639 oder 640 auf, welche sich untereinander ebenfalls bei näherer Betrachtung deutlich voneinander unterscheiden. Kein Bandenmuster der Isolate stimmt letztendlich mit dem eines *Methylocystis*-Referenzstamms überein, weshalb nach dieser Methode keines der Isolate zu einem der getesteten Referenzstämme identisch ist.

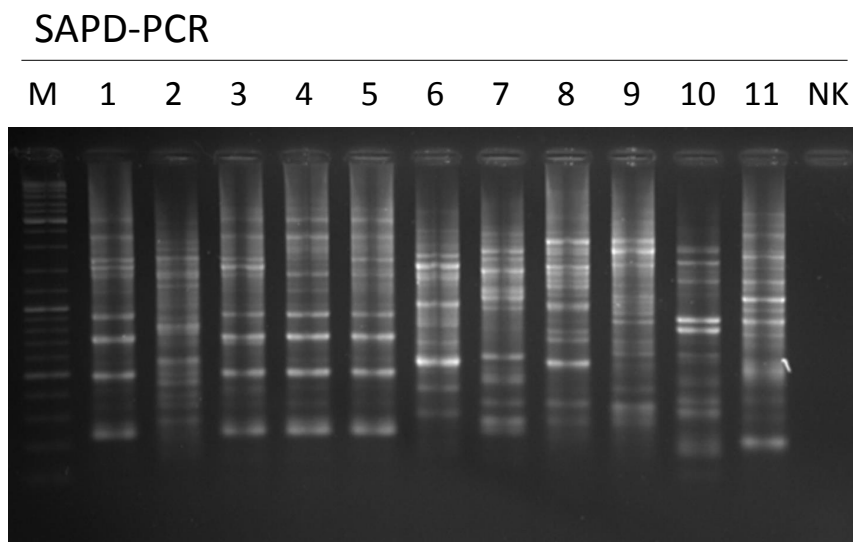


Abb. 21: DNA-Fragmentmuster der SAPD-PCR mit den Primern G-Not bzw. G-Not-G. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 1: Isolat 610; 2: Isolat 613; 3: Isolat 626; 4: Isolat 639; 5: Isolat 640; 6: *Methylocystis echinoides*; 7: *Methylocystis bryophila*; 8: *Methylocystis rosea*; 9: *Methylocystis hirsuta*; 10: *Methylocystis heyeri*; 11: *Methylocystis parvus*; NK: PCR-H₂O.

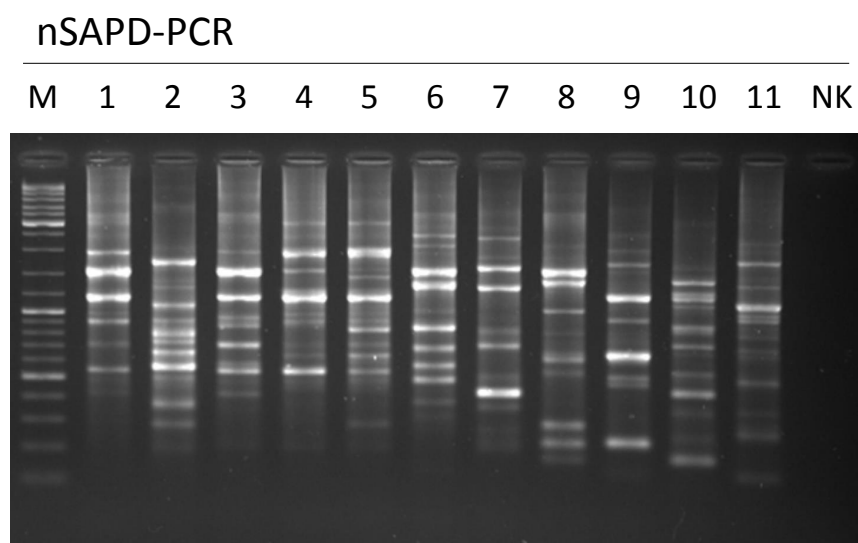


Abb. 22: DNA-Fragmentmuster der nSAPD- (B) PCR mit den Primern G-Not bzw. G-Not-G. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 1: Isolat 610; 2: Isolat 613; 3: Isolat 626; 4: Isolat 639; 5: Isolat 640; 6: *Methylocystis echinoides*; 7: *Methylocystis bryophila*; 8: *Methylocystis rosea*; 9: *Methylocystis hirsuta*; 10: *Methylocystis heyeri*; 11: *Methylocystis parvus*; NK: PCR-H₂O.

4.5.3 Fettsäuremuster der methanoxidierenden Termitenisolate

Zur weiteren Klassifizierung der Isolate wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Analyse der zellulären Fettsäuren durchgeführt. Die Ergebnisse sind Tab. 41 zu entnehmen. Die Fettsäuremuster der einzelnen Referenzstämme ließen sich gut voneinander unterscheiden. Die Termitenisolate 610 und 639 ähnelten sich in ihrem Fettsäuremuster, zeigten aber keine Übereinstimmung mit einem Referenzstamm. Das Isolat 613 zeigte ebenso keine Deckung mit einem Referenzstamm, ebenso wenig mit einem der anderen Isolate. Die Isolate 626 und 640 glichen sich mit Ausnahme der Fettsäure C_{18:1}ω7c sehr, die bei Isolat 640 zusätzlich mit einem Anteil von 2,2 % vorliegt. Diese beiden Isolate ähnelten mit Ausnahme von C_{17:0}cyclo, welches einen geringen Anteil von 0,8 % hat, dem Referenzstamm *Methylocystis echinoides*.

Tab. 41: Fettsäuremuster der Termitenisolate (610, 613, 626, 639, 640) und der MOB-Referenzstämme. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Mp: *Methylocystis parvus*; Me: *Methylocystis echinoides*; Mr: *Methylocystis rosea*; Ml: *Methylobacter luteus*. Die Werte geben den Prozentsatz an der vollständigen zellulären Fettsäurezusammensetzung an.

Fettsäure	Mh	Mb	Mp	Me	Mr	Ml	610	613	626	639	640
iso-C _{14:0}	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-
iso-C _{15:0}	-	-	-	-	-	3,5	-	5	-	-	-
anteiso-C _{15:0}	3,5	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-
iso-C _{16:0}	-	-	-	-	-	3,8	-	4,4	-	-	-
C _{16:0} ω7c	1,1	18,7	-	1,3	18,6	2,2	-	-	1,5	-	1,6
C _{16:0}	4,2	11,4	4,7	2,3	17,7	12,8	1,7	7,2	2	1	2
anteiso-C _{17:0}	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{17:0} cyclo	-	19,1	2,9	0,8	-	4,5	-	2,8	-	-	-
C _{18:3} ω6c	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{18:1} ω8c	43,5	17,1	44,2	93,7	63,7	58,1	95,2	55,1	93,6	94,7	84,2
C _{18:1} ω7c	36,8	22,1	42,3	-	-	-	-	-	-	-	2,2
C _{18:2} ω7,12c	3,8	11,5	5,9	1,8	-	14,7	2,7	22,2	2,2	2,8	-

4.5.4 Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-time of flight massenspektroskopische (MALDI-TOF-MS)-Analysen

Zur näheren Identifizierung der Isolate wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Rabenstein der Amtlichen Materialprüfungsanstalt (MPA, Bremen) eine MALDI-TOF-MS durchgeführt, eine Methode zur Untersuchung der ribosomalen Proteine. Anhand der so gewonnenen Daten wurde ein Dendrogramm erstellt (Abb. 23). Nach diesen Analysen liegt eine nahe Verwandtschaft des Isolats 613 mit *Methylocystis bryophila* vor. Die Isolate 610, 626, 639 und 640 bilden ein enges Cluster mit *Methylocystis parvus*.

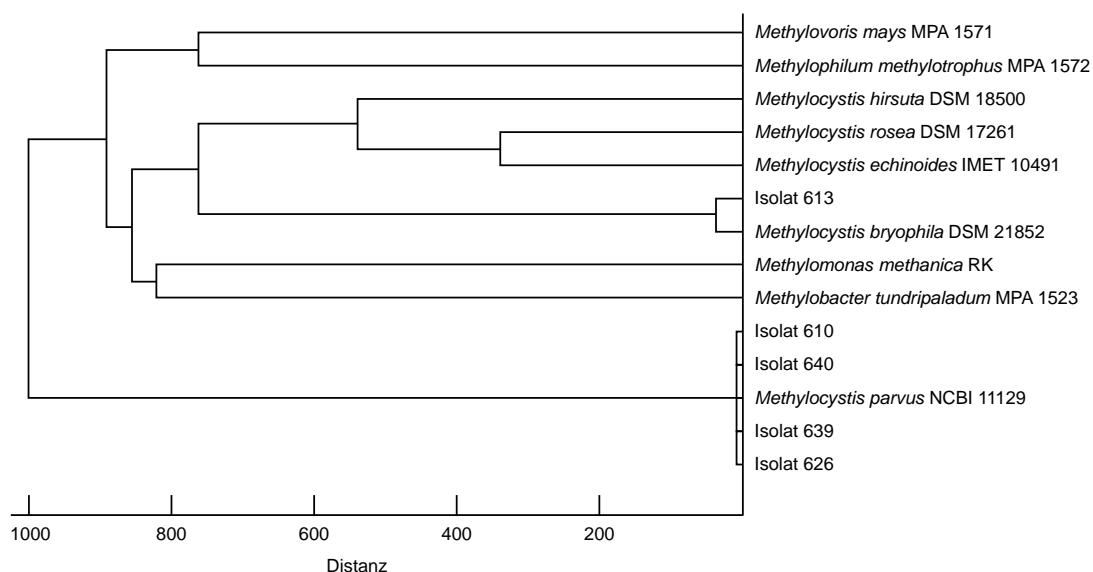


Abb. 23: Dendrogramm mit den Isolaten 610, 613, 626, 639, 640 und Referenzstämmen basierend auf der Analyse mittels MALDI-TOF-MS.

4.6 Morphologische und physiologische Merkmale methanoxidierender Isolate aus dem Termitendarm

Zur weiteren Charakterisierung und näheren Identifizierung wurden die *Methylocystis*-Referenzstämmen sowie die Termitenisolate zu morphologischen wie physiologischen Untersuchungen herangezogen. Die Ergebnisse sind Tab. 42 auf Seite 93 zu entnehmen.

4.6.1 Morphologische Untersuchungen

Die reinen Isolate wurden zunächst auf Ihre Koloniemorphologie hin auf NMS-Festmedium untersucht (Abb. 24 A). Die Kolonien aller Isolate waren weiß-beige eingefärbt und wiesen eine kreisrunde Morphologie mit glatten Rändern auf. Allgemein wachsen methanotrophe Bakterien langsam auf festen Medien und erreichen nur geringe Koloniengrößen. Nach 3 Wochen Inkubation lag die Ausdehnung der Kolonien bei 0,5 - 1 mm.

Abb. 24 B zeigt exemplarisch die phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des Termitenisolats 639. Alle Isolate zeigten die gleiche Zellmorphologie in Form von langgezogenen Kokken mit einer Ausmessung 0,5-1,3 x 0,6-2,7 μm . Insgesamt stellt Isolat 613 mit einer Größe von 0,5-1,0 x 0,6-1,3 μm die kleinste Zellausdehnung dar. Isolat 640 ist besonders länglich mit einer Ausmessung von 0,5-1,0 x 1,7-2,7 μm . Die größten Zellen wies Isolat 626 mit 0,8-1,3 x 1,1-2,3 μm auf (Tab. 42 auf Seite 93).

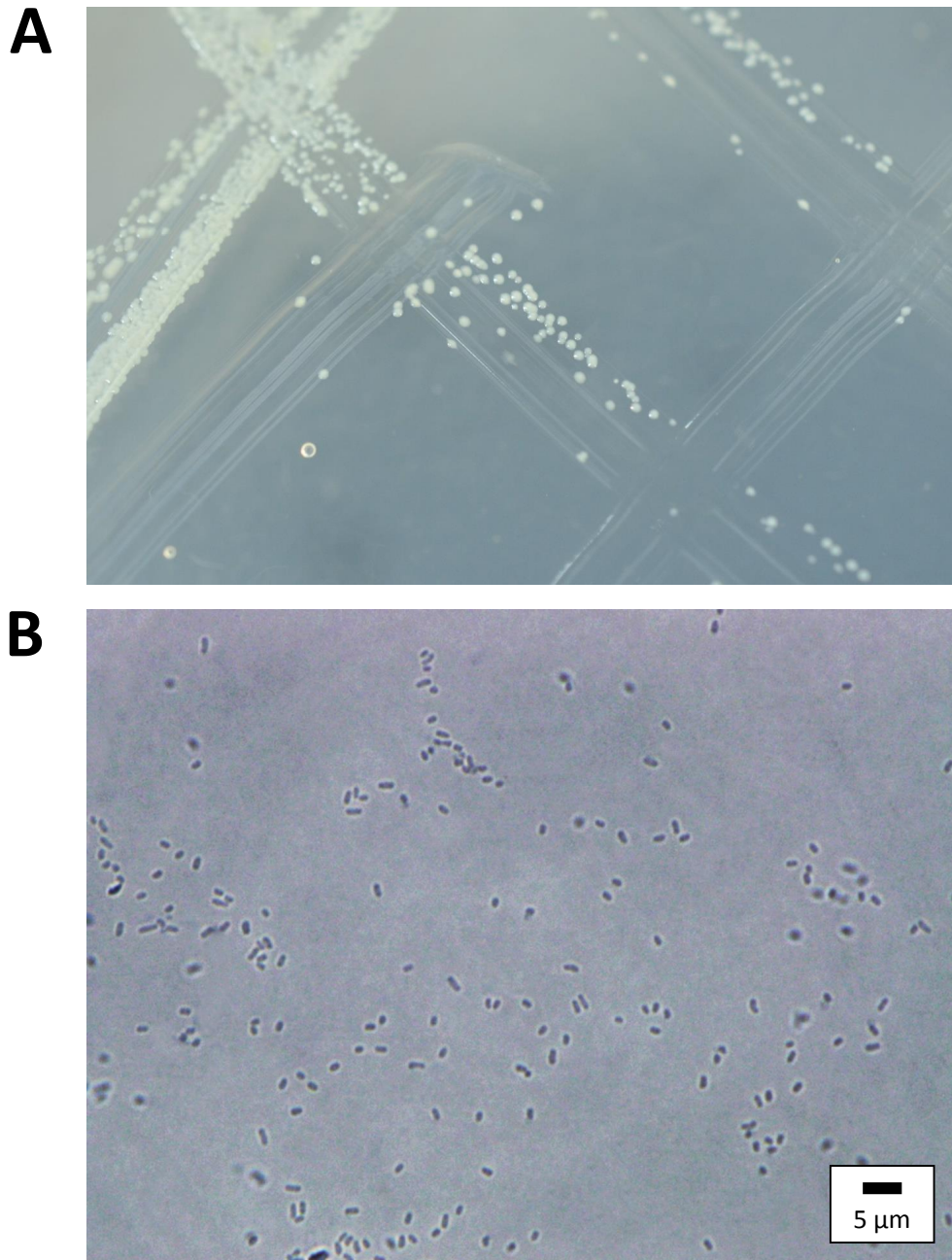


Abb. 24: Kolonie- und Zellmorphologie des Termitisolats 639. A: Die Kolonien sind beige-weiß gefärbt, kreisrund und haben glatte Ränder. B: Phasenkontrastaufnahme des Termitisolats 639 bei 1000-facher Vergrößerung. Die Zellen sind gut als langgezogene Kokken zu erkennen und liegen oft in Ketten zu zwei Zellen vor.

Transelectronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen mit gefriergeätzten Zellen des Isolats 639 zeigten die für Typ II MOB typische intracytoplasmatische Membrananordnung (Abb. 25 A). Ein S-Layer konnte nicht erkannt werden, allerdings konnte die mögliche Ausbildung eines Pili zwischen zwei Zellen beobachtet werden (Abb. 25 B).

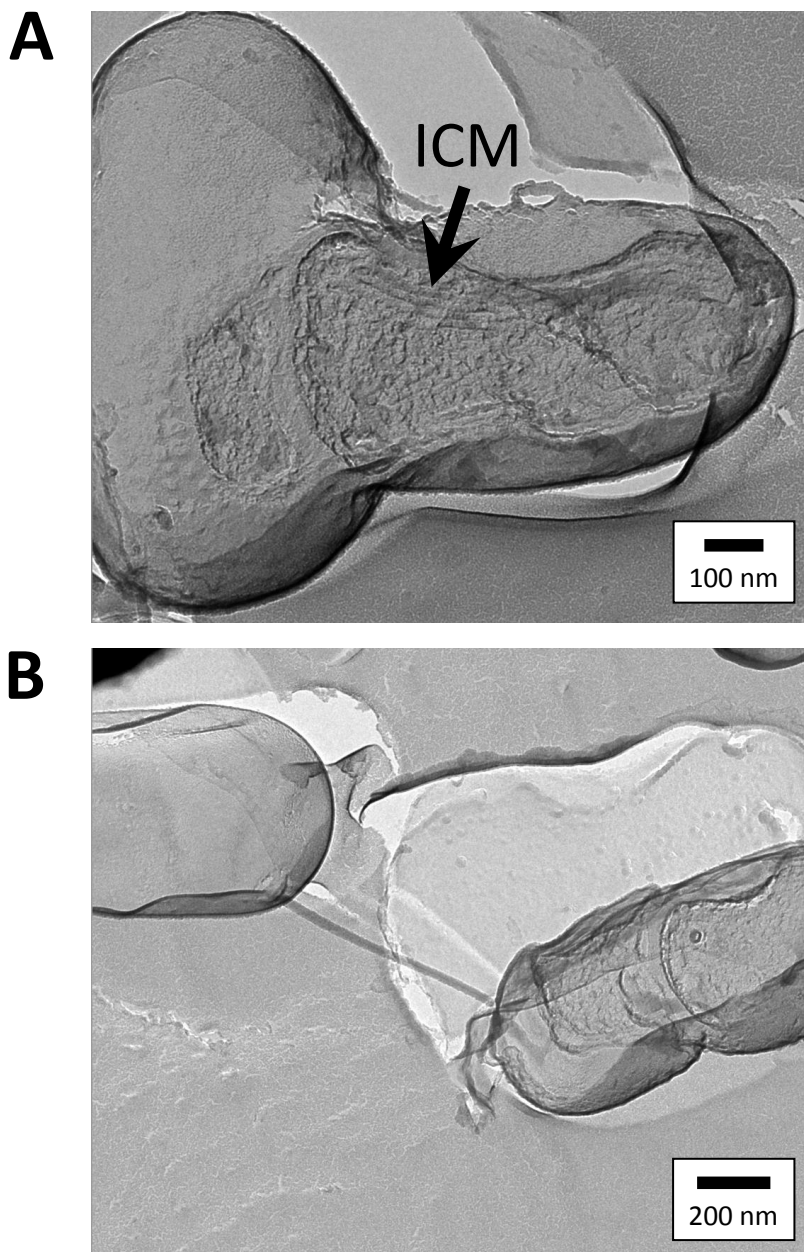


Abb. 25: TEM-Aufnahmen von gefriergeätzten Zellen des Termitenisolats 639. A: Die intracytoplasmatische Membranen liegen parallel entlang der Zellperipherie. B: Mögliche Ausbildung eines Pili zwischen zwei Zellen des Isolats 639.

4.6.2 Produktion von Poly- β -Hydroxybuttersäure

Die Bildung von PHB wurde in allen untersuchten Termitenisolaten durch Färbung mit Sudanschwarz (Abschnitt 3.8.2) nachgewiesen (Tab. 42 auf Seite 93). Durch GC-MS-Analysen konnte im Isolat 640 PHB in Form von Hydroxybuttersäurepropylester (HBPE) in detektierbaren Mengen von 0,75 % der Zelltrockenmasse nachgewiesen werden. HBPE wies eine Retentionszeit von 6,7 min auf (Abb. 26). Fragmente mit den Hauptmassenzahlen 45, 60, 71 und 87 entstanden (Abb. 27).

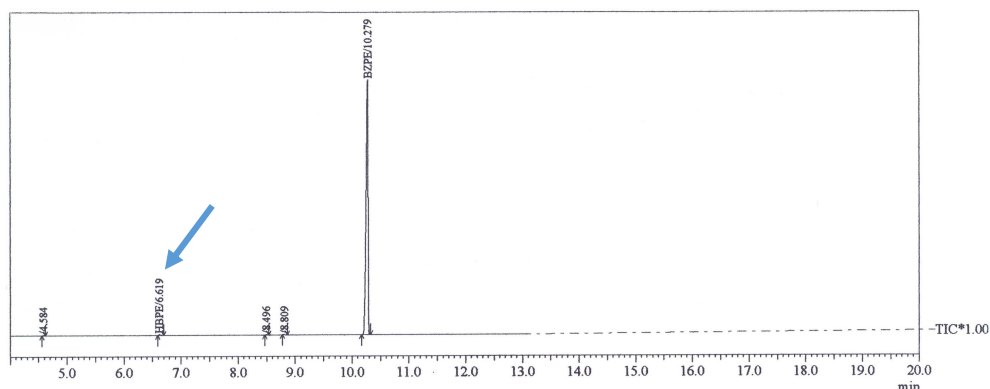


Abb. 26: Chromatogramm einer GC-MS-Analyse zum quantitativen PHB-Nachweis. Der blaue Pfeil zeigt den Hydroxybuttersäurepropylester- (HBPE) Peak an.

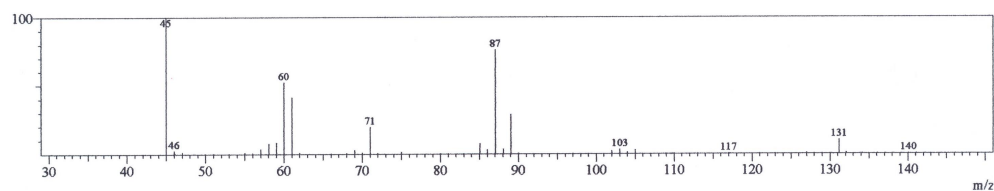


Abb. 27: Massenspektrum von HBPE mit den Massenzahlen der entsprechenden Fragmenten.

4.6.3 Temperatur-Toleranz und -Optimum

Es wurden die Termitenisolate 610, 613, 626, 639 und 640 sowie die Referenzstämme *Methylocystis echinoides*, *Methylocystis bryophila*, *Methylocystis parvus*, *Methylocystis rosea*, *Methylocystis parvus* sowie *Methylobacter luteus* als Typ I-Außengruppe auf ihr Wachstum hinsichtlich unterschiedlicher Temperaturen hin untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 28 - 32 und Tab. 42 auf Seite 93 wiedergegeben.

Insgesamt konnte bei keinem untersuchten Stamm ein Wachstum oberhalb von 50 °C

oder unterhalb von 20 °C beobachtet werden. Lediglich *Methylocystis hirsuta* zeigte schwaches Wachstum bei niedrigeren Temperaturen, mit einer Verdopplung der Anfangs-OD von 0,11 auf 0,24. Bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C konnte bei *Methylocystis bryophila*, *Methylocystis rosea* und dem Termitenisolat 639 Wachstum beobachtet werden. Während *Methylocystis bryophila* sehr schnell in die exponentielle Wachstumsphase eintrat und die maximale Zelldichte bereits nach 6 Tagen Inkubation erreichte, wuchs das Isolat 639 langsamer, erzielte dafür aber nach 9 Tagen Inkubation eine höhere OD. Bei 30 °C konnte die insgesamt höchste OD von 0,7 gemessen werden. Diese wurde von dem Termitenisolat 640 nach 6 Tagen, vom Isolat 639 nach 7 Tagen und vom Isolat 610 nach 9 Tagen erreicht werden. Bei dieser Temperatur trat *Methylocystis hirsuta* bereits nach 2 Tagen Inkubation in die exponentielle Phase und nach weiteren 4 Tagen in die Absterbephase ein. Ab 35 °C reduzierte sich das Wachstum bei *Methylocystis rosea* und *Methylocystis hirsuta* und es kam zu einem schnellen Eintreten in die Absterbephase. Bei höheren Inkubationstemperaturen war insgesamt ein früherer Eintritt in die exponentielle Phase zu beobachten, allerdings war die stationäre Phase verkürzt und die Absterbephase wurde schneller erreicht. Ab 45 °C wiesen die Referenzstämme *Methylocystis rosea*, *Methylocystis parvus* und *Methylocystis hirsuta* sowie die Isolate 610, 613, 626 und 639 kein Wachstum mehr auf. Lediglich das Isolat 640 war im Vergleich zu anderen Isolaten temperaturtoleranter und erreichte auch bei 45 °C noch eine höhere OD.

Es lässt sich zusammenfassen, dass hinsichtlich des Temperaturoptimums die größten Ähnlichkeiten zwischen den Isolaten 639 und 640 sowie den Referenzstämmen *Methylocystis bryophila* und *Methylocystis echinoides* bestehen. Bei 30 °C wurden ähnliche Wachstumskurven untereinander für die Isolate 613, 639 und 640 sowie den Referenzstamm *Methylocystis parvus* beobachtet. Bei 45 °C sind hingegen die Wachstumskurven des Isolats 640 und von *Methylocystis echinoides* vergleichbar, wobei das Isolat allerdings eine deutlich höhere Zelldichte erreichte. Entsprechend des temperaturabhängigen Wachstums könnte es sich beim Isolat 640 um *Methylocystis echinoides* und beim Isolat 639 um *Methylocystis parvus* handeln.

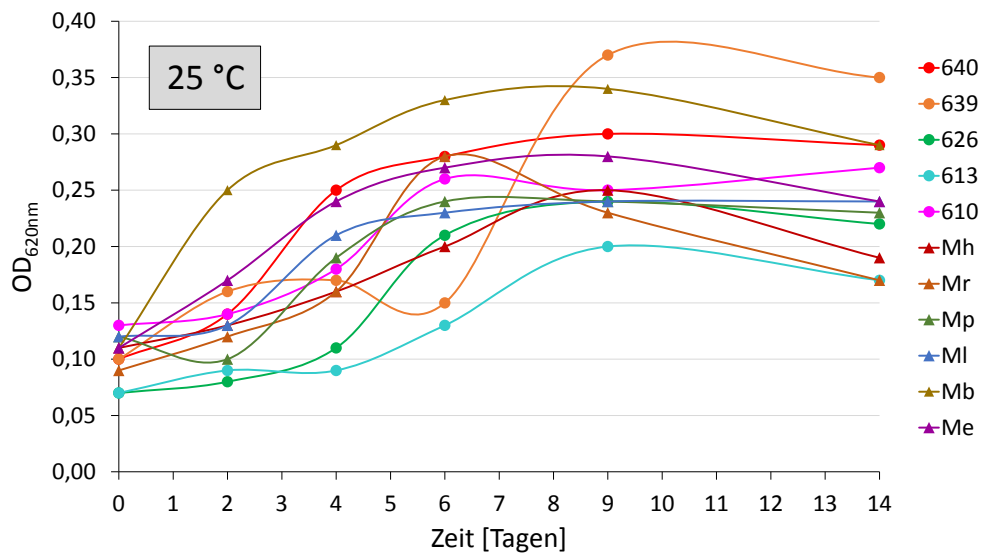


Abb. 28: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei 25 °C. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

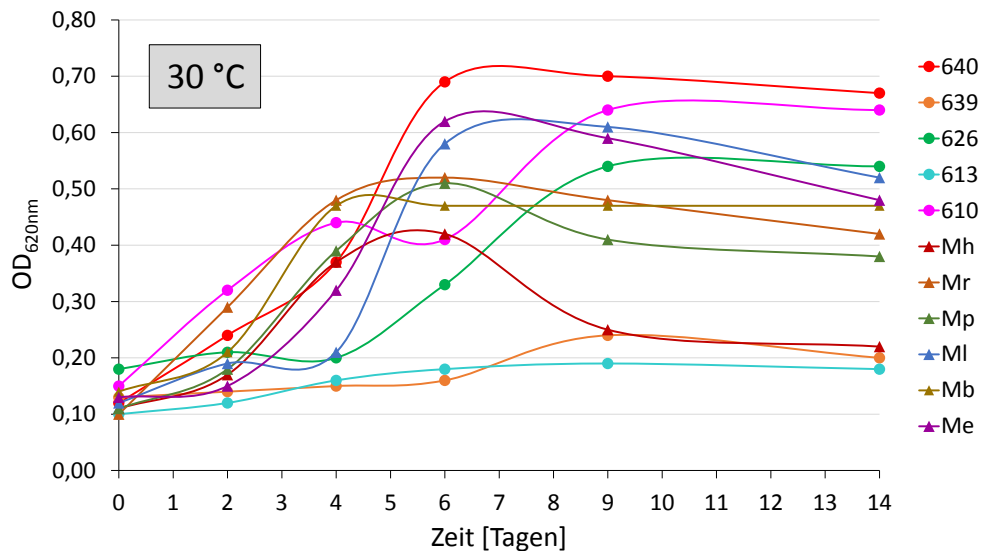


Abb. 29: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei 30 °C. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

4 Ergebnisse

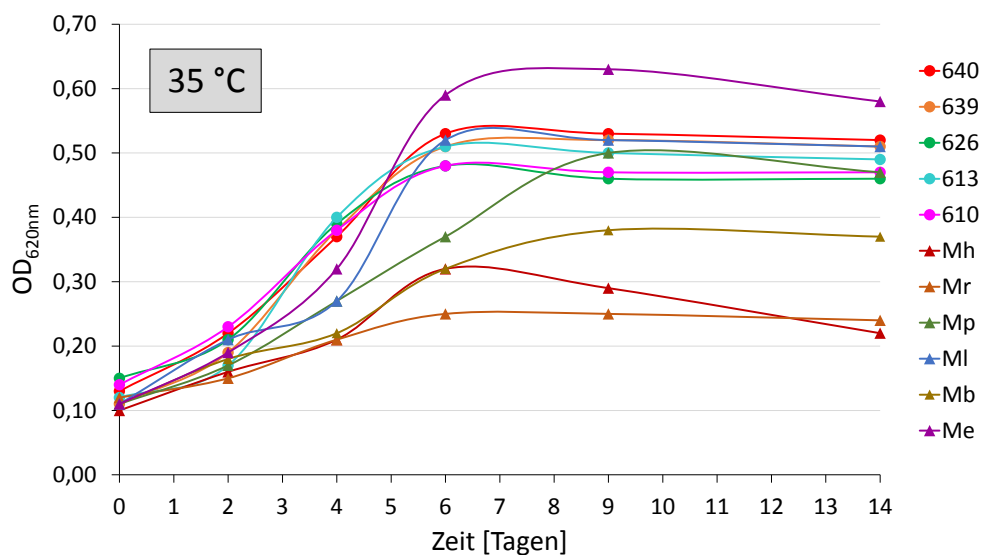


Abb. 30: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei 35 °C. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

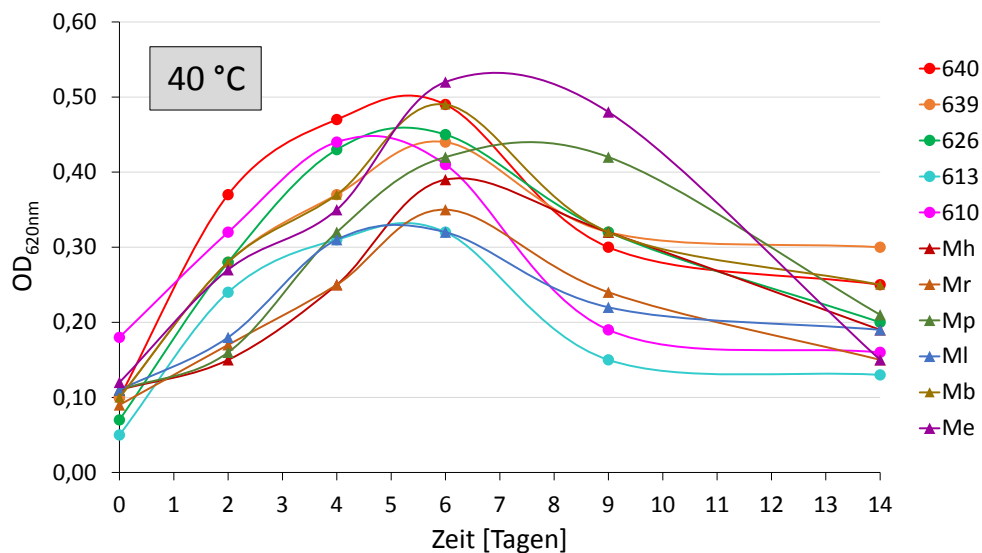


Abb. 31: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei 40 °C. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

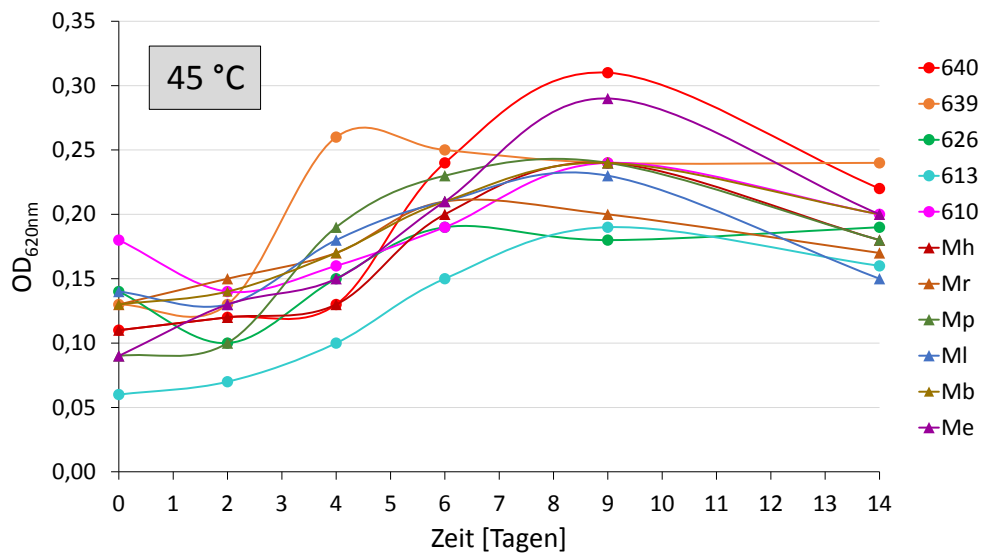


Abb. 32: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei 45 °C. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

Das Isolat 610 wurde aufgrund seines schnellen und zuverlässigen Wachstums für weitere Tests hinzugezogen. So wurde der Einfluss der Temperatur auf den Methanabbau untersucht. Wie in Abb. 33 ersichtlich erfolgt die Reduktion des Methangehalts bei 35 °C am effektivsten.

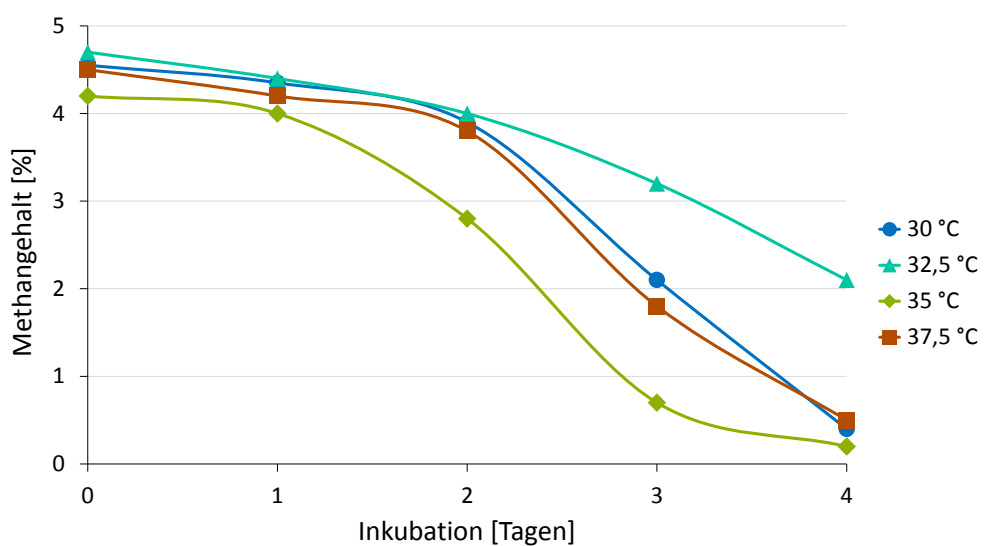


Abb. 33: Abhängigkeit des Methanabbaus von der Temperatur.

4.6.4 pH-Toleranz und -Optimum

Die Ergebnisse der Versuche zu pH-Toleranz und -Optimum sind Abb. 34 bis 36 sowie Tab. 42 auf Seite 93 zu entnehmen. Allgemein lässt sich sagen, dass weder die Referenzstämme noch die Termitenisolate im sauren pH-Bereich unterhalb von 6 wuchsen, einzig *Methylocystis rosea* zeigte bei pH 4 schwaches Wachstum. Die anderen Stämme favorisierten neutrale pH-Bereiche von 6 - 8, lediglich das Isolat 613 bevorzugte einen etwas alkalischeren pH-Bereiche von 8 - 10 und zeigte bei pH 6 nur schwaches Wachstum. Das insgesamt beste Wachstum wurde für das Isolat 640 sowohl bei pH 6 als auch bei pH 8 beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Wachstumskurven des Isolats 640 und des Referenzstamms *Methylocystis echinoides* stark ähnelten und bei pH 6 nach 9 Tagen die maximale Zelldichte erreichten. Diese Ergebnisse liefern also einen Hinweis auf die mögliche Verwandtschaft von Isolat 640 mit *Methylocystis echinoides*. Alle anderen Isolate können aufgrund des sehr ähnlichen Wachstumsverlaufs nicht eindeutig einem Referenzstamm zugeordnet werden.

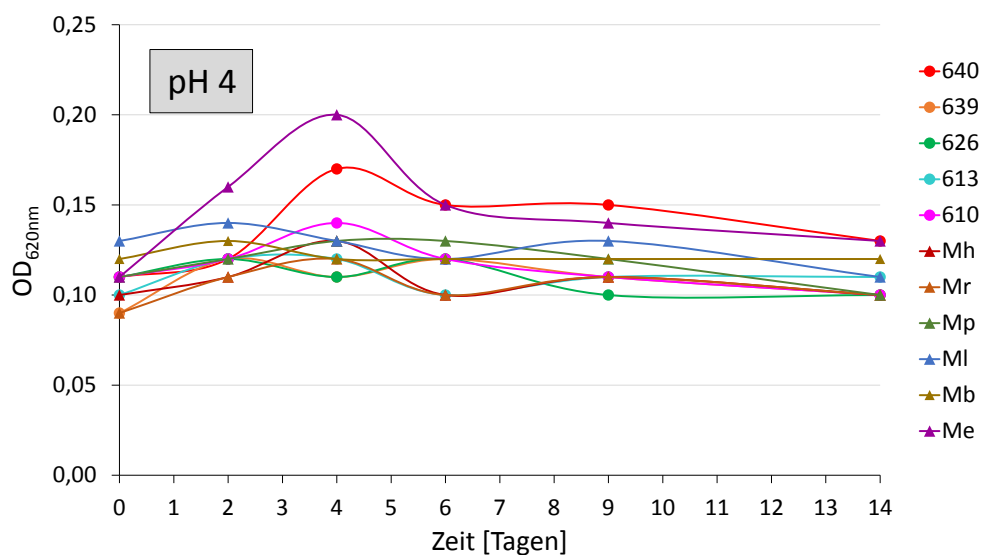


Abb. 34: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämme bei pH 4. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

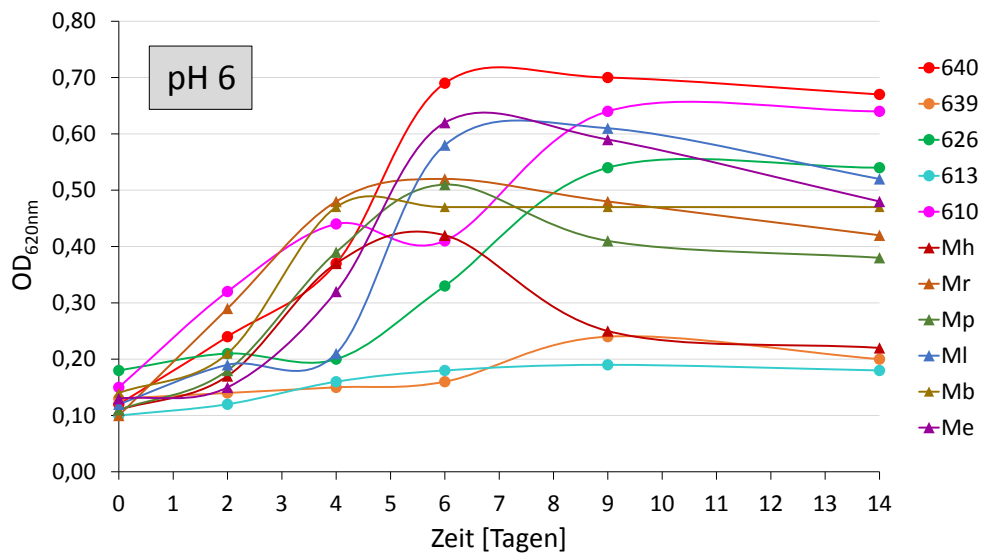


Abb. 35: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei pH 6. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

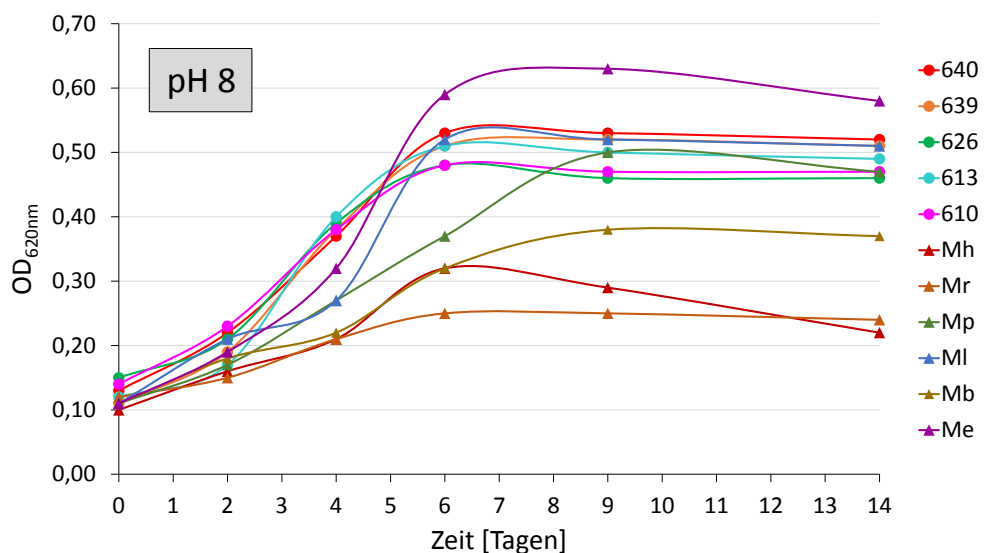


Abb. 36: Wachstum der Termitenisolate und der Referenzstämmen bei pH 8. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mr: *Methylocystis rosea*; Mp: *Methylocystis parvus*; Ml: *Methylobacter luteus*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Me: *Methylocystis echinoides*. Die Kulturen 640, 639, 626, 613 und 610 stellen Termitenisolate dar.

4.6.5 Ausbildung der sMMO

Es konnte bei den Termitenisolaten keine sMMO-Aktivitäten mit Hilfe des Naphtalin-Oxidations-Assays gezeigt werden, es wurde kein Farbumschlag beobachtet (siehe Abschnitt 3.10.1). Ebenso wenig konnte durch PCR die Sequenz des für die sMMO kodierenden Gens in den Isolaten nachgewiesen werden. Bei den Referenzstämmen wurden lediglich für *Methylocystis hirsuta*, *Methylocystis bryophila* und *Methylocystis echinoides* das Gen der sMMO nachgewiesen (siehe Abb. 37).

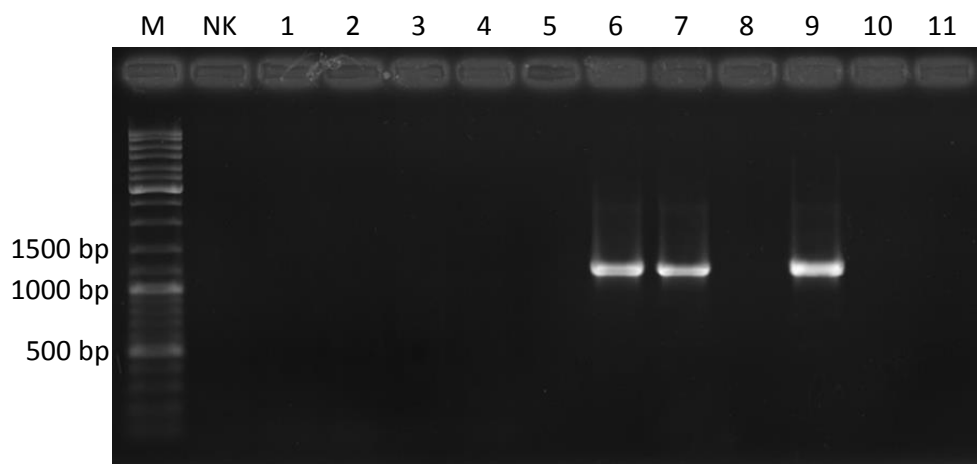


Abb. 37: Detektion des für die sMMO kodierenden Gens. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); NK: *E. coli* 1: Isolat 610; 2: Isolat 613; 3: Isolat 626; 4: Isolat 639; 5: Isolat 640; 6: *Methylocystis echinoides*; 7: *Methylocystis bryophila*; 8: *Methylocystis rosea*; 9: *Methylocystis hirsuta*; 10: *Methylocystis heyeri*; 11: *Methylocystis parvus*.

4.6.6 Stickstofffixierung

Die Gensequenz für die Stickstoffreduktase wurde mit Hilfe einer PCR nach WARTIAINEN et al. (2006) nachgewiesen. Bei jedem Termitenisolat sowie jedem Referenzstamm konnte das spezifische *nifH*-Amplifikat mit 360 bp nachgewiesen werden (Abb. 38).

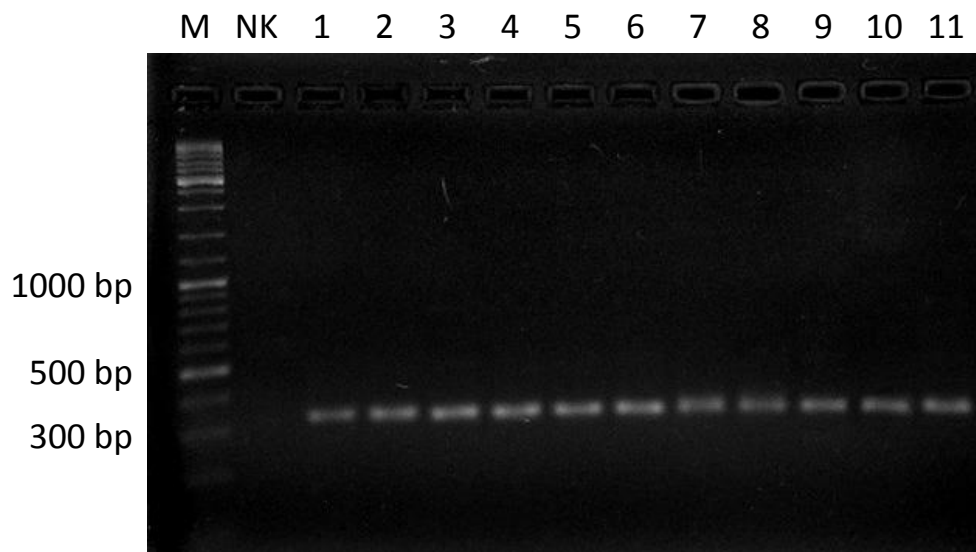


Abb. 38: Detektion des mit dem Primerpaar nifH1-nifH2 amplifizierten *nifH*-Gens. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); NK: *E. coli* 1: Isolat 610; 2: Isolat 613; 3: Isolat 626; 4: Isolat 639; 5: Isolat 640; 6: *Methylocystis echinoides*; 7: *Methylocystis bryophila*; 8: *Methylocystis rosea*; 9: *Methylocystis hirsuta*; 10: *Methylocystis heyeri*; 11: *Methylocystis parvus*

4.6.7 Verwertung von Stickstoffquellen

Das Isolat 613 zeigte auf keiner der alternativen Stickstoffquellen (L-Aspartat, L-Asparagin, L-Lysin, L-Glutamin und L-Ornithin) Wachstum (vgl. Abschnitt 3.2.4. Keines der Isolate zeigte Wachstum auf Lysin als alleiniger Kohlenstoffquelle und nur schwaches Wachstum wurde bei Inkubation auf Aspartat für die Isolate 640, 639, 626 und 610 erreicht. Auf Lysin wies der Referenzstamm *Methylocystis bryophila* gutes, *Methylocystis parvus* hingegen eingeschränktes Wachstum auf. Bei allen Referenzstämmen konnte mäßiges Wachstum auf Aspartat beobachtet werden. Allgemein gutes Wachstum zeigte sich auf den Medien, die Asparagin oder Ornithin enthielten. Lediglich *Methylocystis echinoides* konnte diese alternative Stickstoffquelle nicht verwerten. Glutamin konnte von den Isolaten 640 und 626 sowie dem Referenzstamm *Methylocystis bryophila* gut verwertet werden und nur mäßig von den Isolaten 639 und 610 sowie den restlichen Referenzstämmen. Die Ergebnisse sind in Tab. 42 auf Seite 93 zusammengefasst.

4.6.8 Verwertung von Kohlenstoffquellen

Keines der Termitenisolate und keiner der Referenzstämmen wuchs auf DMSO, Glucose oder Formiat. Auf Methylamin konnte lediglich bei Stamm 610 schwaches Wachstum beobachtet werden. Methanol wurde hingegen von allen Isolaten und Stämmen verwertet. Alle Ergebnisse können Tab. 42 auf Seite 93 entnommen werden.

4.6.9 Toleranz gegenüber NaCl

Die schwächste NaCl-Toleranz mit einer Obergrenze von unter 2,5 % wies der Referenzstamm *Methylocystis echinoides* auf. *Methylocystis bryophila* folgte mit einer Toleranzgrenze von unter 3 %, *Methylocystis parvus* und Isolat 639 tolerierten unter 3,5 %. Die restlichen Isolate und Referenzstämmen zeigten Wachstum bis unter 4 % (Tab. 42 auf Seite 93).

4.6.10 Zellwandstabilität gegenüber SDS

Alle untersuchten Stämme wiesen eine Zellwandstabilität gegenüber SDS in Konzentrationen bis 8 % auf (Tab. 42 auf Seite 93).

Tab. 42: Physiologische und phänotypische Charakterisierung von methanotrophen Isolaten und Referenzstämmen. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Mp: *Methylocystis parvus*; Me: *Methylocystis echinoides*; Mr: *Methylocystis rosea*; Ml: *Methylobacter luteus*, sowie die Isolate 610, 613, 626, 639, 640. Zellform: hf, hantelförmig. kS, kurze Stäbchen. KS, Kokkoide Stäbchen. gKS, gebogene KS. N-Quellen: Asp, Aspartat. Lys, Lysin. Orn, Ornithin. Asn, Asparagin. Gln, Glutamin. C-Quellen: Methanol. MeN, Methylamin. CH₄: Methan.

Charakteristikum	Mh	Mb	Mp	Me	Mr	Ml	610	613	626	639	640
Koloniefärbung	weiß/ beige	weiß	weiß/ beige	weiß	rosa	beige/ gelb	weiß/ beige	weiß/ beige	weiß/ beige	weiß/ beige	weiß/ beige
Zellgröße [μm]	0,3-0,8 x 0,6-0,9	0,8-1,2 x 1,2-3,0	0,5-0,9 x 0,8-1,9	0,7-0,9 x 1,0-1,9	0,8-1,3 x 0,9-2,1	0,6-1,1 x 0,8-1,7	0,6-0,8 x 0,7-1,7	0,5-1,0 x 0,6-1,3	0,8-1,3 x 1,1-2,3	0,6-1,2 x 1,5-2,0	0,5-1,0 x 1,7-2,7
Zellform	hf, kS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	gKS	KS
PHB-Produktion	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hitzeresistenz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sMMO	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>nifH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH-Toleranz	5-8	5-10	5-10	4-10	5-10	5-10	5-8	5-10	5-10	5-10	5-10
pH-Optimum	6	6	6	8	6	6	6	8	6	8	6

Charakteristikum	Mh	Mb	Mp	Me	Mr	Ml	610	613	626	639	640
Temperatur-Toleranz [°C]	20-40	25-40	30-40	30-45	25-40	30-45	30-40	35-40	30-40	25-40	30-45
Temperatur-Optimum	35	30	30	30	30	30	30	35	30	35	30
Verwertbare N-Quellen	Asp, Orn, Asn, Gln	Asp, Lys, Orn, Asn, Gln	Asp, Lys, Orn, Asn, Gln	Asp, Asn, Gln	Asp, Orn, Asn, Gln	Asp, Lys, Orn, Asn, Gln	Asp, Orn, Asn, Gln	-	Asp, Orn, Asn, Gln	Asp, Orn, Asn, Gln	Asp, Orn, Asn, Gln
Verwertbare C-Quellen	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, MeN, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄	MeOH, CH ₄
NaCl-Toleranz bis unterhalb	3%	4 %	3,5 %	2,5 %	4 %	4%	4 %	4 %	4 %	3,5 %	4 %
SDS-Stabilität bis unterhalb	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %	8 %

4.7 Einsatz der Isolate in Biogasaufbereitungsanlagen

Dieses Projekt sollte dazu dienen, ein alternatives biologisches Verfahren zur Reduktion des Methanschlupfes aus Biogasaufbereitungsanlagen zu entwickeln. Zur Zeit beträgt die Höhe des Methanschlupfes im Abgas der Aufbereitungsanlagen etwa 2 % und ist nach neusten Auflagen des Erneuerbare-Energien-Gesetzes auf 0,5 % zu begrenzen. Die Entmethanisierung soll mit Hilfe der methanotrophen Termitenisolate realisiert werden. Das methanhaltige Abgas wird über einen Reaktor geleitet, in dem die Isolate angesiedelt werden. Diese Kulturen sind in der Lage, das im Abgas befindliche Methan als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen und reduzieren so durch ihr Wachstum den CH₄-Gehalt. Aufgrund der hohen Methanabbauraten (Abschnitt 4.4) und seines schnellen und zuverlässigen Wachstums (Abschnitte 4.6.3 und 4.6.4) wurde das Termitenisolat 610 für weitere Optimierungsanalysen herangezogen.

4.7.1 Reaktorkonstruktion

Abb. 39 A zeigt die technische Zeichnung des Reaktors und Abb. 39 B dessen praktische Konstruktion am PFI Pirmasens unter der Leitung von Dr. Stefan Dröge. Dieser Reaktor wird mit MOB beimpft, über die der methanhaltige Abgasstrom der Biogasaufbereitungsanlagen geleitet wird. Die methanotrophen Bakterien nutzen das im Abgas befindliche Methan als Energie- und Kohlenstoffquelle und reduziert so dessen Gehalt im Abgas.

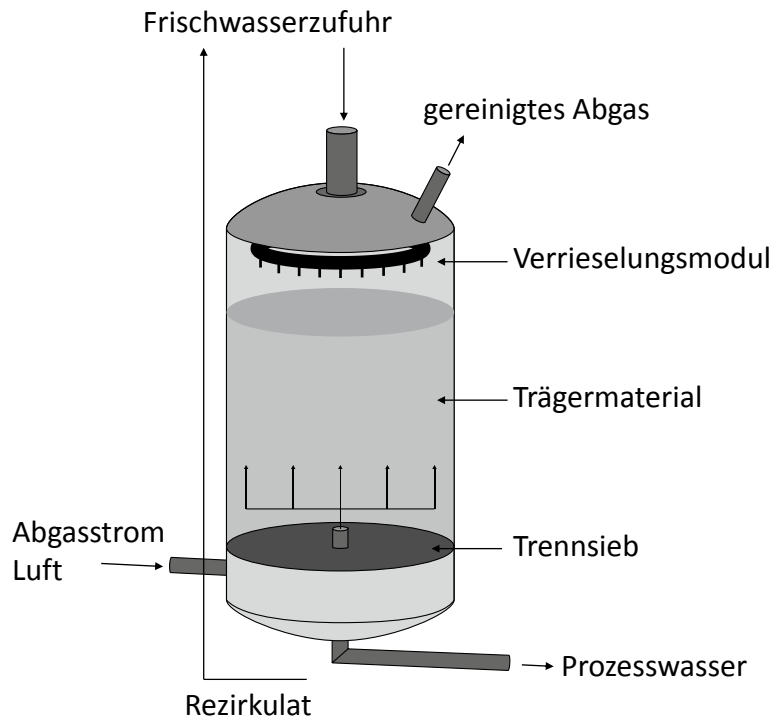


Abb. 39: Aufbau des Reaktor zur Reduktion des Methanschlupfes in Biogasaufbereitungsanlagen.

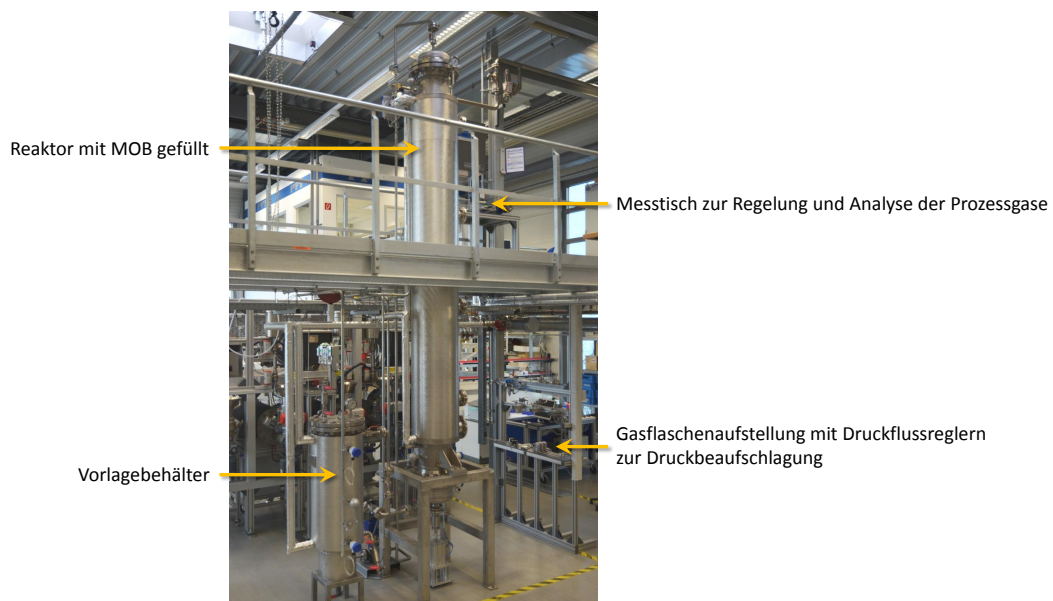


Abb. 40: Reaktorkonstruktion zur Reduzierung des Methanschlupfes in Biogasaufbereitungsanlagen.

Der Reaktor wurde mit methanotrophen Termitenisolaten beimpft. Dem Medium wurden die synthetischen Aufwuchskörper HFX17KLL (Fa. Christian Stöhr, Marktrodach-Zeyern) aus Polyethylen mit hoher Dichte, dem sog. high density Polyethylen (HDPE) zugesetzt. Diese Kunststoffkörper dienten den MOB als Ansiedelungsfläche, wodurch eine höhere Zelldichte und somit eine verstärkte Methanreduktion erfolgen konnte. So erreichte das Isolat 610 ohne den Einsatz von Aufwuchskörpern eine Methanreduktion von 27 % nach 7 Tagen, wurden Aufwuchskörper zugesetzt konnte diese Rate auf 58 % im selben Zeitraum gesteigert werden.

Die Aufwuchskörper werden jedoch nicht von allen MOB gleich gut angenommen, so führte die Besiedlung derselben Aufwuchskörper mit *Methylocystis hirsuta* zu einer Abnahme der Methanreduktion von 63 % auf 39 % innerhalb von einer Woche (Abb. 41).

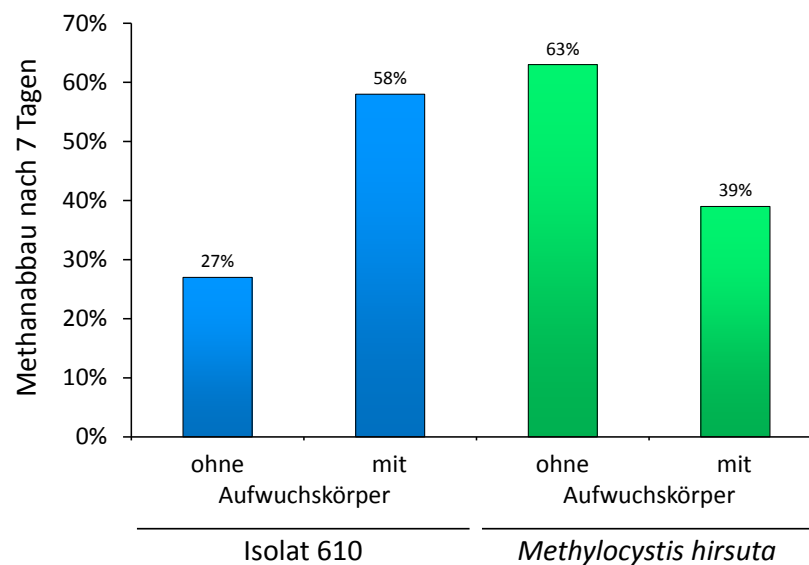


Abb. 41: Einfluss der synthetischen Aufwuchskörper aus HDPE auf den Methanabbau durch das Termitenisolat 610 und den Referenzstamm *Methylocystis hirsuta*.

Abb. 42 zeigt exemplarisch die Reduktion von Methan innerhalb dieses Reaktors mit dem Isolat 610 bei einer Befüllung des Reaktorvolumens von 298 l mit 40 l NMS-Medium und 40 l der Aufwuchskörper aus HDPE. Der Druck wurde auf 3,5 bar eingestellt. Der gegebene Methangehalt von 4,1 % wurde von dem Isolat innerhalb von 30 h bei einer Reaktortemperatur von 35 °C um 68 % reduziert.

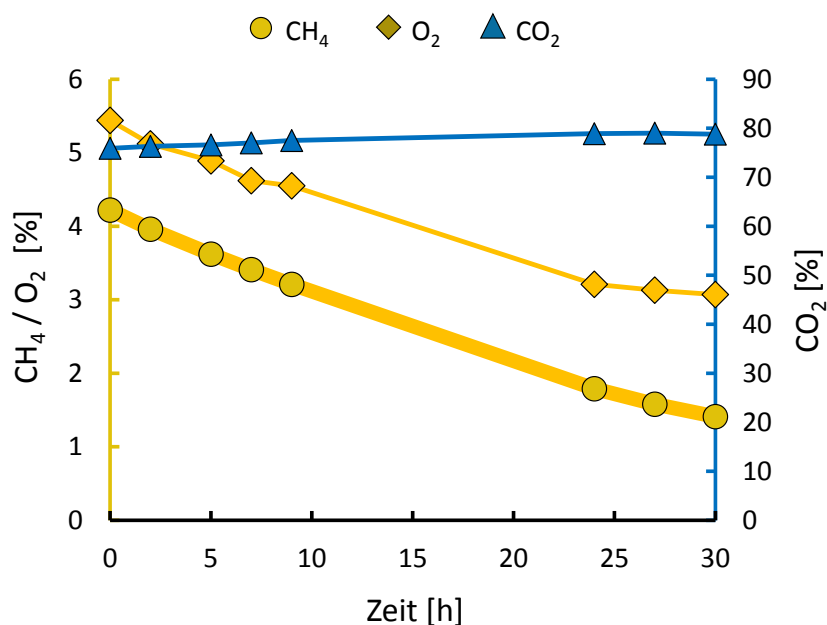


Abb. 42: Abnahme des CH₄-Gehalts [%] im Versuchsreaktor durch das Termitenisolat 610.

4.7.2 Medienoptimierung zum erhöhten Methanabbau

Um die Methanreduktion im Reaktor weiter zu erhöhen, wurde die Zusammensetzung des NMS 131-Mediums sukzessiv verändert. Hierbei wurde der Fokus auf die Änderung von Komponenten des Mediums gelegt, welche am Hauptstoffwechselweg der Methanoxidation zu CO₂ für dessen Enzyme eine wichtige Bedeutung haben. Die Ergebnisse sind Abb. 43 zu entnehmen. Bei der Verdopplung des Kupfergehalts konnte eine deutliche Steigerung der Methanreduktion um das 4-fache erreicht werden. Bei einer Verzehnfachung des Kupfergehalts konnte allerdings kein Wachstum mehr detektiert werden, ebensowenig bei einer Reduktion. Eine Verringerung des Sulfats bzw. des Nitrats im Medium verursachte ebenfalls eine deutlich erhöhte Methanreduktion um das bis zu 2,6- bzw. 3,5-fache. Der Gehalt an Natrium, Magnesium, Calcium und Eisen im NMS-Medium scheint optimal, da sich weder eine Reduktion noch eine Erhöhung positiv auf den Methanabbau auswirkten.

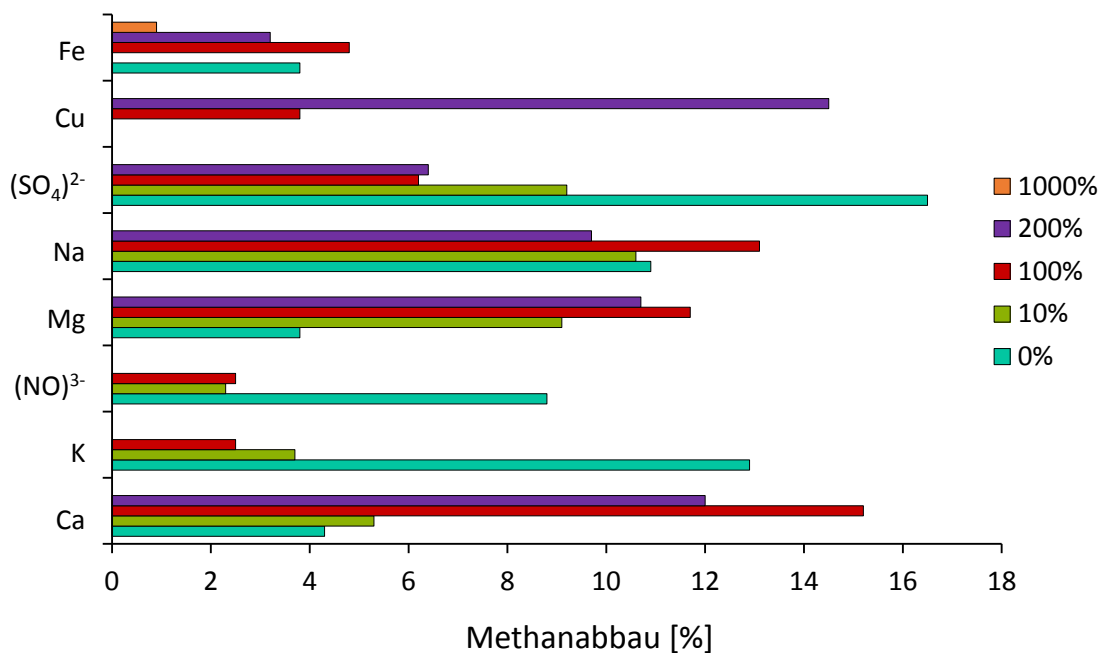


Abb. 43: Veränderung des Methanabbaus durch das Isolat 610 bei Modifizierung des Mediums. Es wurde pro Versuch jeweils nur eine Komponente verändert.

4.8 Rückgewinnung des Intermediats Formiat als energiereiches Substrat

Das Methan wird von den MOB zum einen zur Kohlenstoffassimilation und zum Zellaufbau, zum anderen aber auch zum Energiegewinn durch die Oxidation zu CO₂ genutzt. Stoppt man die Teilreaktion von Formiat zu CO₂ ab, kann theoretisch Formiat angehäuft und gesammelt werden, um es schließlich wieder als energiereiches Substrat zurück in die Biogasanlagen zu führen.

Durch die leichte Flüchtigkeit des Formiats eignet sich ein Nachweis mit HPLC oder GC ohne Kaltaufgabesystem nur bedingt. Zum Nachweis von Formiat wurde deswegen auf eine enzymatische und quantitative Detektionsmethode zurückgegriffen. Die Isolate und Referenzstämme wurden zunächst auf natürliche Formiatbildung ohne äußerliche Zusätze oder Veränderungen hin untersucht. Lediglich bei dem Referenzstamm *Methylomonas methanica* konnte eine geringe Formiatausscheidung von 0,04 g/l absolut nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.8.2).

Der Einsatz von künstlichen Elektronenakzeptoren mit einem gleichwertigen Redoxpotential wie die FDH sollte zu einer Unterbrechung der Oxidation von Formiat zu CO₂ führen und so eine gesteigerten Formiatfreisetzung hervorrufen. Die Zugabe von NAD⁺

ermöglichte bei den getesteten Isolaten 610 und 640 sowie *Methylobacter luteus* als Typ I und *Methylocystis echinoides* als Typ II-MOB zwar Wachstum, eine Formiatausscheidung wurde jedoch nicht nachgewiesen. Die Zugabe von TTC führte ebenfalls zu keiner Formiatfreisetzung und verhinderte darüberhinaus das Wachstum von *Methylobacter luteus*. Bei Zugabe von Benzylviologen unterblieb jegliches Wachstum bei allen getesteten Kulturen.

Die Zugabe der Formiatanaloga Methylchlorformiat, Ethylchlorformiat, 2-Ethylhexylchlorformiat, Isopropylchlorformiat oder Butylchlorformiat führte nicht zur gewünschten Blockierung der Formiatdehydrogenase. Eine erhöhte Freisetzung von Formiat unterblieb.

5 Diskussion

5.1 Methanquellen und die Präsenz von methanoxidierenden Bakterien

Die Quellen von Methan werden in natürliche und anthropogene Herkünfte unterschieden. Den größten Beitrag zur natürlichen Freisetzung von Methan in die Atmosphäre bilden Feuchtgebiete mit etwa 120 Tg/Jahr, gefolgt von Termiten mit 20 Tg/Jahr. Anthropogene Quellen sind erster Linie die Förderung von Kohle und Gas (100 Tg/Jahr), aber auch die massiv gestiegene Tierhaltung von Wiederkäuern (80 Tg/Jahr), Emissionen bei der Behandlung von Müll (80 Tg/Jahr), Reisfelder (60 Tg/Jahr) sowie die Verbrennung von Biomasse (40 Tg/Jahr). Dem gegenüber steht die Reaktion von Methan mit Hydroxylradikalen als bedeutendste CH_4 -Senke mit 430 Tg/Jahr, aber auch die mikrobiologische Oxidation von Methan mit 30 Tg/Jahr (GRAEDEL und CRUTZEN, 1994). Die für diese Oxidation verantwortlichen aeroben methanoxidierenden Bakterien (MOB) sind ubiquitär verbreitet und in Lebensräumen zu finden, die Methan und Sauerstoff bieten (HEYER et al., 2002). Aus diesem Grund wurden zur Isolierung neuer methanotropher Bakterien Habitate mit ebensolchen Bedingungen ausgesucht.

Schon TROTSSENKO und KHMELENINA (2005) und BOURNE et al. (2000) konnten MOB aus Seesedimenten bzw. aus dem Grundwasser isolieren. Der Laacher See bietet eine Vielzahl natürlicher Methanquellen, welche auf das bis vor rund 11000 Jahren aktive Vulkangebiet zurückzuführen sind (LITT et al., 2007), und stellt somit optimale Bedingungen für das Wachstum von Methanotrophen dar. Der Nachweis von MOB wurde mittels spezifischer *pmoA*-Primer (CHENG et al., 1999) erbracht. Analysen mit Typ I und Typ II spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden zeigten eine Dominanz von Typ I. CARINI et al. (2005) und SCHUBERT et al. (2006) beschrieben ebenfalls eine Überzahl an Typ I MOB in der obersten Sedimentschicht des Schwarzen Meeres bzw. in marinen Biotopen. Generell werden an der Grenze von oxischer Wasser- zur anoxischen Sedimentschicht hohe bakterielle Zellzahlen gemessen, weshalb diese Schauplatz vieler biogeochemischer Umsetzungsprozesse ist (SCHUBERT et al., 2006), wie z.B. der biologische Abbau von Methan. Die Abnahme von Methan (Tab. 37) schwankte unter den verschiedenen Proben stark zwischen rund 1 - 30 %, wobei hierbei beachtet werden muss, dass es sich um Absolutwerte handelt und nicht um einen auf eine Zelle normierten Methanabbau. Die Zahl an MOB kann an den unterschiedlichen Entnahmeorten im Laacher See ebenfalls schwanken.

Wie eingangs erwähnt trägt die Behandlung von Müll stark zum Methaneintrag in die Atmosphäre bei (GRAEDEL und CRUTZEN, 1994). So werden etwa 3 % dieses Eintrags in Mülldeponien gebildet und abgegeben (GEBER, 2004) und auch bei der Aufbereitung von Abwässern in Kläranlagen werden bis zu 4 % des jährlichen Methanausstoßes emittiert (CONRAD, 2009). Etwa 80 % des entstehenden Methans werden durch bakterielle Aktivität oxidiert was die Wichtigkeit der Methanotrophen im Methankreislauf unterstreicht (DAELMAN et al., 2012). Nichtsdestotrotz wurden den MOB in Kläranlagen wenig Beachtung geschenkt, bis HO et al. (2013) die erste Studie über aerobe methanoxidierende Bakterien in Kläranlagen veröffentlichten. In diesem Kontext wurden die Faultürme des Mombacher Klärwerks auf MOB hin untersucht. Mit Hilfe MOB-spezifischer Primer (CHENG et al., 1999) wurde zunächst die Anwesenheit dieser Bakterien ermittelt und später durch FISH bestätigt. Es konnte ein Gemisch aus Typ I und Typ II MOB ermittelt werden, was dem Befund von HO et al. (2013) entspricht. Die allgemein guten Methanreduktionsraten von bis zu 30 % bestätigen die starke Abbaukraft der MOB, die DAELMAN et al. (2012) in Kläranlagen erwähnten.

Durch die Holzverwertung entstehen im Termitendarm jährlich 20 Tg Methan (SUGIMOTO et al., 2000), darüberhinaus werden etwa 40 % des Hinterdarms durch Diffusion über eine Distanz von bis zu 100 μm über Tracheen mit Sauerstoff versorgt (BERCHTOLD et al., 1999; FUCHS, 2007). Damit werden beide Grundvoraussetzungen für das Vorkommen von methanotrophen Bakterien im Termitendarm geschaffen. Der erste Nachweis dieser Existenz wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Detektion der pMMO-spezifischen Gensequenz durch die Primer von CHENG et al. (1999) geschaffen. Die Identität des erhaltenen PCR-Produkts wurde durch eine nested PCR als Amplifikat der *pmoA*-Gensequenz eindeutig belegt. Auf diese Weise wurden MOB im Darm der Termiten *Incistitermes marginipennis*, *Mastotermes darwiniensis* und *Neotermes castaneus* nachgewiesen. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestätigte die Resultate dieser PCR. Während keine Typ I MOB im Termitendarm detektiert werden konnten, wurden mit Typ II-spezifischen Sonden, innerhalb der komplexen Mikroflora, Zellen mit einer verlängerten Kokkenform spezifisch erkannt.

Die meisten Methanotrophen, wie auch Bakterien im Allgemeinen, sind im Hinterdarm im Bereich der Gärkammer zu finden, dem Bereich mit dem größten Anteil an symbiontischen Mikroorganismen des gesamten Termitendarms (BRUNE, 2005). Dies wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung wie auch der qPCR in dieser Arbeit qualitativ bzw. quantitativ bestätigt (Abb. 15 und 18). Durch qPCR wurde die MOB-Zellzahl

auf rund $0,8 \cdot 10^3$ bestimmt, während die Gesamtzellzahl von ca. $1,2 \cdot 10^8$ den bekannten Werten entspricht (HONGO et al., 2008). Mit einem Titer von 10^2 bis 10^3 tragen die MOB mit 0,001 % zur gesamten Bakterienpopulation bei, wobei dieser Anteil in allen Termiten, in denen methanotrophe Bakterien nachgewiesen werden konnten ähnlich ist. Typ II MOB sind im Gegensatz zu Typ I zur Stickstofffixierung fähig. Die Termiten als Wirt könnte von dieser Fähigkeit profitieren, da die primäre Nahrungsquelle Holz zwar einen hohen Anteil an Kohlenstoff, aber nur 0,005 % Stickstoff aufweist (LILBURN et al., 2001). Die Fixierung von molekularem Stickstoff durch symbiotische Bakterien ist somit essentiell für Termiten (TAYASU et al., 1994). In der Vergangenheit wurden bereits verschiedenste stickstofffixierende Bakterien aus Termiten isoliert, die u.a. den Gattungen *Enterobacter*, *Desulfovibrio* und *Citrobacter* oder auch der Gruppe der Spirochaeten angehören (WENZEL et al., 2002). Die phylogenetische Analyse von aus dem Termitendarm gewonnenen *nifH*-Sequenzen zeigte, dass diese überwiegend keinen bekannten Stickstofffixierern zugeteilt werden konnten (OHKUMA et al., 1999). Möglicherweise kann diese Lücke durch den in dieser Arbeit erbrachten Nachweis an stickstofffixierenden MOB im Termitendarm zumindest partiell geschlossen werden. Zudem sind Typ II MOB neben der Ausbildung der pMMO zur Bildung von sMMO fähig. Kommt es zu einer Verknappung von Kupfer stellt dies einen entscheidenden Lebensvorteil dar. Neben der großen Bedeutung der Stickstofffixierung für die Termiten können die MOB auch das bei der Holzverwertung entstehende Methanol verwerten, was in höheren Konzentrationen für die Termiten toxisch wirkt (BAHADIR et al., 2000).

Die Termitenproben wiesen durchschnittlich die höchsten Methanabbauraten aller getesteten Habitate auf, wobei auch hier deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu beobachten war. Diejenigen aus *Neotermes castaneus* zeigten insgesamt den schwächsten Abbau, wie bspw. Probe 403 mit < 1 %. Eine Ausnahme in dieser Termitenart bildete das Isolat 613, eine MOB-Reinkultur, welche den Methangehalt um 20 % reduzierte. Die Termitenproben erzielten jedoch auch hohe Abbauraten von z.T. fast 45 %, beispielsweise Probe 640 aus *Incisitermes marginipennis*. Allgemein weisen Termiten in der Gärkammer hohe bakterielle Zellzahlen von bis zu 10^9 - 10^{10} Zellen/ml Darminhalt auf (BERCHTOLD et al., 1999), wobei die Proteobacteria, zu denen auch die MOB zählen, Bacteroidacea, Flavobacteriaceae und Spirochaeten den größten Anteil an der Population tragen. Etwa 300 verschiedene bakterielle Genome konnten in der kleinen Termitenart *Reticulitermes speratus* identifiziert werden (HONGO et al., 2008), deren 16S rDNA in zwei Drittel der Fälle unter 90 % Sequenzidentität mit bekann-

ten Bakterien zeigte (OHKUMA und KUDO, 1996) und 10 überhaupt keine Ähnlichkeit zu irgendeinem bekannten bakteriellen Phylum aufwies (DILLON und DILLON, 2004). Der größte Teil dieser Bakteriengemeinschaft sind obligate Symbionten, die nicht außerhalb des Termitendarmbiotops vorkommen (SABREE et al., 2012). Zur Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Termitendarmmikroflora wurde diese mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad) analysiert (Abschnitt 3.9.7). Den überwiegenden Teil stellten Spirochaeten und Proteobakterien mit je 29 % dar. Daneben wurden weitere Sequenzen gefunden, die Firmicutes und Planctomyceales zugeordnet werden konnten. Diese Ergebnisse werden durch frühere Studien von DRÖGE (2005), KRASIL'NIKOV und SATDYKOV (1969), KUHNIGK und KÖNIG (1997), BERCHTOLD et al. (1999), WENZEL et al. (2002) und HONGOH et al. (2003) unterstützt. Beachtenswert ist der ektodermale Ursprung des Hinterdarms, d.h., dass das Epithel bei jeder Häutung mit abgestriffen wird. Eine Neuinokulation des Termitendarms, die häufig durch gegenseitiges Füttern gewährleistet wird, ist unabdingbar um die Mikroflora wieder herzustellen. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, dass die symbiontische Population innerhalb des Termitendarms von Kolonie zu Kolonie alterieren kann (MATSUURA, 2001), was ein Grund sein könnte, warum PESTER et al. (2007) keine MOB in Termiten nachweisen konnten. Weiterhin werden immer wieder Bakterien aus Lebensräumen isoliert, deren Existenz durch 16S rRNA Klonbibliotheken ausgeschlossen wurde, wie beispielsweise WADE (2013) demonstrierte. Die Erstellung von Klonbibliotheken ist demnach eine gute Methode das Gesamtgenom eines Habitats zu bestimmen, deren Ergebnisse aber offensichtlich Lücken aufweisen können.

5.2 Differenzierende Methanabbauraten

Der durchschnittliche Methanabbau der Mischkulturen aus Termitendärmen lag unter dem mittleren Methanverbrauch der Reinkulturen 610, 613, 626, 639 und 640 (Abb. 14). Die Methanoxidationsraten sollen jedoch grundsätzlich in Umweltproben höher liegen als in Reinkulturen (HANSON und HANSON, 1996). Dabei muss allerdings der gemessene absolute Methanabbau vom spezifischen Verbrauch unterschieden werden. Letzterer bezieht die Reduktion des Methangehalts auf eine einzelne Zelle einer Kultur. Da eine genaue Bestimmung der Zahl an MOB-Zellen in den Mischkulturen nicht möglich war, konnte der spezifische Methanverbrauch nicht ermittelt werden. Der durch

qPCR bestimmte niedrige Anteil von 0,001 % MOB an der Bakterienpopulation im Termitendarm erklärt den niedrigen absoluten Methanabbau, selbst unter der Annahme, dass dieser Anteil während der Kultivierung der Mischpopulation unter Selektionsdruck (Minimalmedium mit Methan als einziger Kohlenstoffquelle) während der 14-tägigen Inkubationszeit stark zugenommen hat.

Die potentiell Methanabbauenden Termitenisolate des IMW zeigten nur geringes Wachstum und eine sehr moderate Methanoxidation. Möglicherweise stellen diese Isolate keine MOB, sondern nitrifizierende Bakterien dar, deren Ammoniummonooxygenase als Nebenreaktion ebenfalls Methan zu Methanol umsetzen kann. Da Nitrifizierer jedoch keine Energie aus dieser Methanoxidation ziehen können, ist so kein Wachstum möglich (BÉDARD und KNOWLES, 1989). Es ist daher wahrscheinlich, dass die als MOB deklarierten Kulturen der Stammsammlung nitrifizierende Bakterien sind, was das schlechte Anwachsen der Kulturen und somit auch die schlechten Methanumsatzraten erklärt.

Die durchschnittlichen Methanumsatzraten der Proben aus Kläranlage und Laacher See ähnelten, wobei auch hier neben Proben mit deutlichen Methanabbau solche mit nur geringer Reduktion gefunden wurden. Auch dies kann durch das zufällige Überimpfen von Nitrifizierern erklärt werden.

5.3 Methanotrophe Isolate aus den Termiten *Neotermes castaneus*, *Incisitermes marginipennis* und *Mastotermes darwiniensis* als neue *Methylocystis*-Arten?

Durch serielles Überimpfen und Ausstreichen auf Festmedium wurden fünf Reinkulturen gewonnen, deren Reinheit durch Ausplattieren auf Komplexmedium, durch lichtmikroskopische optische Überprüfung und mit Hilfe einer DGGE sichergestellt wurde. Die Isolate weisen die typische verlängerte Kokkenform von MOB auf. Die Kolonien sind weiß-beige in der Färbung und kreisrund. TEM-Aufnahmen zeigten die Ausbildung von Pili. Da diese nur sehr selten zu beobachten waren, wird vermutet, dass es sich um F-Pili zum horizontalen Gentransfer handelt und nicht der Anheftung an Oberflächen wie dem Termitenepithel dienen. Die Ausbildung von Flagellaten konnte nicht beobachtet werden, die, wenn vorhanden, bei Methanotrophen polar angelegt sind (BOWMAN, 2011). Die Ausbildung eines S-Layers konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Mit Hilfe neu erstellter Primer wurde die komplette 16S rDNA-Sequenz der Isolate gewonnen und mit den in *insilico* Datenbanken hinterlegten Sequenzen verglichen. Die

Isolate konnten so alle der Gattung *Methylocystis* zugeordnet werden, eine Artzuweisung konnte jedoch nicht erfolgen. Problematisch hierbei ist, dass viele Methanotrophe lediglich unzureichend in den Sequenzdatenbanken vertreten sind. Von den 11 bekannten Genera mit 51 Arten sind lediglich die kompletten Genome von 5 Methanotrophen bekannt. Die 16S rDNA-Sequenzen, die üblicherweise der Identifikation dienen sind zum überwiegenden Teil nur als partielle Sequenz hinterlegt und beinhalten zu wenig Information für eine eindeutige Artzuordnung. Somit ist eine Artbestimmung der Isolate aufgrund der 16S rDNA-Sequenzinformation nur begrenzt möglich. Die Sequenzvergleiche der Isolate untereinander zeigten jedoch Unterschiede, so dass es sich nicht um ein und dieselbe Art handeln konnte. Zur Identifizierung wurde auf eine Fingerprintmethode, die (n)SAPD-PCR zurückgegriffen. Hierbei zeigte sich, dass kein Bandenmuster der Isolate mit dem eines Referenzstammes übereinstimmt und somit keiner Art zugeordnet werden kann. Die Isolate zeigten untereinander auf den ersten Blick Übereinstimmungen im Bandenmuster, unterschieden sich bei näherer Betrachtung, insbesondere nach Durchführung der nSAPD-PCR, deutlich voneinander. Daher kann zum einen die Identität mit einem der Referenzstämme ausgeschlossen und zum anderen die Differenziertheit der Isolate untereinander angenommen werden. Die Unterschiedlichkeit der Isolate wird durch die Analyse der zellulären Fettsäuren bekräftigt. Die Isolate 639 und 640, die sich im Bandenmuster der nSAPD-PCR noch ähneln weisen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäuren auf. Insgesamt kann aufgrund des Fettsäuremusters keine klare Zuteilung der Isolate zu einem Referenzstamm erfolgen, vor allem im Zusammenspiel mit den nSAPD-PCR-Analysen. Die MALDI-TOF-MS-Analysen zeigten hingegen eine nahe Verwandtschaft der Isolate mit *Methylocystis parvus* (Isolate 610, 626, 639 und 640) bzw. *Methylocystis bryophila* (Isolat 613) auf. Die Grundlage der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen stellt die Analyse des für jedes Bakterium spezifischen Proteinprofils dar. Die Proteine werden ionisiert und in einem elektrischen Feld nach ihrer Masse unterschiedlich schnell beschleunigt. Die einzelnen Massenspektren der Proteine werden zu einem Gesamtspektrum angeordnet, welches für jedes Bakterium unterschiedlich ist. Allerdings wird das Proteinprofil hauptsächlich aus positiv geladenen ribosomalen Proteinen ermittelt, deren Aufbau auch auf der Sequenz der 16S rDNA beruht. Aufgrund dessen können sehr nah verwandte Bakterien wie beispielsweise *Shigella* sp. von *E. coli* nicht voneinander unterschieden werden (SCHUBERT und WIESER, 2010). Da durch die 16S rDNA-Sequenzabgleiche der Isolate nicht zwischen *Methylocystis*-Arten differenziert werden konnte ist es möglich, dass die MALDI-TOF-

MS-Analysen hier ebenfalls an ihre Grenzen stießen. Die Verwandtschaft von Isolat 613 mit *Methylocystis bryophila* konnte mit nSAPD-PCR oder der Fettsäureanalyse nicht bestätigt werden, ebenso wenig die der Isolate 610, 626, 639 sowie 640 zu *Methylocystis parvus* und wird aufgrund der höheren Differenzierungsmöglichkeiten der beiden letztgenannten Untersuchungsmöglichkeiten als nicht wahrscheinlich angenommen.

Um trotzdem eine Artzuordnung treffen zu können, wurden verschiedene physiologische Studien vorgenommen. Durch Sudanschwarzfärbung wurde in allen Isolaten PHB nachgewiesen. GC-MS-Analyse zeigten hingegen nur für das Isolat 610 eine PHB-Bildung in Höhe von bis zu 0,75 % der Zelltrockenmasse an. Sudanschwarz färbt relativ unspezifisch neutrophile Granula an (SIGMA-ALDRICH, 2014), wodurch eventuell falsch positive Ergebnisse möglich sind. Allerdings könnte auch die Detektionsgrenze der GC-MS-Methode zu niedrig sein, vor allem wenn man mögliche PHB-Verluste während deren Extraktion aus der Zelle berücksichtigt. Die Bildung von PHB durch Methanotrophe ist in der Literatur bereits mehrfach beschreiben worden (VECHERSKAYA et al., 2001; PIEJA et al., 2011), wobei von Typ II MOB wesentlich mehr PHB gebildet werden kann als von Typ I (ASENJO und SUK, 1986; TROTENSKO et al., 1992). WENDLANDT et al. (2001) demonstrierten eine PHB-Bildung von bis zu 30 g/l in einer nicht sterilen Mischkultur, die von *Methylocystis* sp. GB 25 dominiert wurde. Nach HELM (2002) wird die PHB-Produktion entscheidend durch die Cokultur von Methanotrophen mit Methanol- und Citratverwertern bestimmt. Die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd stellt den Flaschenhals der Methanoxidation zu CO₂ dar, da die Reaktion der Methanoldehydrogenase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Das sich hierdurch ansammelnde Methanol im Medium, führt ab Konzentrationen von 30 mg/l zu einer Hemmung der MMO und damit zur Reduktion der Methanoxidation (HARRISON, 1978; HELM, 2002). HELM (2002) beobachtete die Bildung eines für die PHB-Bildung notwendigen Wachstumsfaktor durch Citratverwerter, vermutlich Vitamin B₁₂. Durch die Umstellung der Kulturbedingungen auf phosphatfreies Medium und der Coinokulation der methanotrophen Kultur mit Methanol- und Citratverwerter ist es also sehr gut möglich die PHB-Produktion der MOB-Isolate deutlich zu steigern. Dadurch ließe sich nicht nur die aus Methan gewonnene Zellmasse sondern auch das energiereiche PHB als Substrat zurück in die Biogasanlagen leiten. Das schafft die Möglichkeit Methan als Abfallprodukt der Gasaufbereitungsanlagen, kostengünstig und umweltschonend aufzubereiten und stellt so eine effektive Methode der Kohlenstoffsequestrierung dar.

Die überwiegende Mehrheit der MOB sind mesophil und wachsen am besten in einem

Temperaturbereich zwischen 20 und 45 °C (TROTSSENKO und KHMELENINA, 2002). Daneben wurden aber auch thermophile Methanotrophe isoliert wie z.B. *Methylothermus thermalis* aus einer heißen Thermalquelle mit einem Wachstum bis zu 59 °C (TROTSSENKO et al., 2009). MOB mit hoher Temperaturtoleranz weisen einen für Eubakterien ungewöhnlich hohen Gehalt an gesättigten und methylierten Fettsäuren wie etwa C_{16:0} und zyklische Derivate wie beispielsweise C_{17:0}cyclo auf (TROTSSENKO et al., 2009). Das Isolat 613 zeigt im Vergleich zu den anderen Isolaten und den Referenzstämmen relativ hohe Werte an ungesättigten und methylierten Fettsäuren, wie etwa C_{14:0}, C_{15:0} oder C_{16:0}. Auch C_{17:0}cyclo wurde nachgewiesen, welches bei keinem anderen Isolat vorzufinden war. Dieses besondere Fettsäuremuster des Isolats 613 korreliert mit dem höchsten Temperaturoptimum aller Isolate und Referenzstämmen. Die höchste Temperaturtoleranz wies hingegen Isolat 640 auf, welches lediglich C_{16:0} als ungesättigte Fettsäure besitzt, und diese auch in relativ geringer Konzentration. Möglicherweise weist dieses Isolat einen höheren Wert an Sterolen bzw. Squalenen auf, welche eine entscheidende Rolle bei der Thermotoleranz von *Methylococcus capsulatus* Bath zu spielen scheint (BIRD et al., 1971; LAMB et al., 2007). Auch psychrophile Methanotrophe konnten isoliert werden wie etwa *Methylocella tundrae*, welcher ab 5 °C Wachstum aufweist, mit einem Optimum bei 15 °C (DEDYSH et al., 2004). Eine besondere zellphysiologische Anpassung an ein Wachstum in diesem niedrigen Temperaturbereich wurde bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben. Die Isolate wie auch die in dieser Arbeit untersuchten Referenzstämmen zeigen hier unter einer Temperatur von 20 °C kein Wachstum. Wie die meisten MOB sind die Isolate als mesophil bis moderat thermophil einzuordnen, was durch die Isolierung aus wärmeliebenden Insekten zu erwarten war. Für verschiedene Habitate wurde die höchste Methanoxidation bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. So wurde aus Tundraböden ein MOB mit Temperaturoptimum zwischen 5 und 10 °C isoliert (OMELCHENKO et al., 1996; TOUROVA et al., 1999), auf der anderen Seite wurde das stärkste Wachstum und somit auch die höchste Methanoxidation bei 35 °C in Reisfeldern beobachtet (CAI und YAN, 1999), was exakt der Temperatur entspricht, bei der der höchste Methanabbau im Termitenisolat 610 zu beobachten war (Abb. 30). Allgemein überwiegen Typ I MOB in kälteren Gebieten während Typ II MOB ab 25 °C, d.h. Temperaturen die denen im Termitendarm ähneln, dominieren.

Der pH-Wert beeinflusst die Höhe des Methanverbrauchs kaum, wie schon BORNE et al. (1990) beobachteten, wonach sie eine annähernd gleiche Oxidation in Böden mit pH 3,5 bis 8 zeigten. Allgemein zeigen die meisten Methanotrophen das beste Wachstum im

neutralen Bereich, obwohl auch hier acidophile Ausnahmen wie *Methylocapsa acidiphila* (DEDYSH et al., 2002) oder alkaliphile wie *Methylomicrobium kenii* (SOROKIN et al., 2000) isoliert wurden, die Wachstum ab pH 4,5 bzw. ein Optimum von pH 10 aufweisen. Auch in dieser Arbeit bevorzugten die Isolate neutrale pH-Bereiche, lediglich Isolat 613 zeigte gutes Wachstum erst ab pH 8. DEDYSH et al. (2000) zeigten, dass acidophile MOB relativ hohe Gehälter u.a. an C_{16:0} aufweisen. Den höchsten Wert dieser Fettsäure weist *Methylocystis rosea* auf, derjenige Stamm, mit der höchsten Toleranz im niedrigsten pH-Bereich. Allerdings weist auch das Isolat 613 im Vergleich zu den anderen Isolaten recht hohe Werte dieser Fettsäure auf. Möglicherweise wird die Zellmembran durch diese Fettsäure gegenüber extremeren pH-Bedingungen stabilisiert. Mit Ausnahme des Isolates 613 zeigten die Isolate und Referenzstämmen ein so ähnliches Verhalten in verschiedenen pH- und Temperaturbereichen, dass eine eindeutige Zuordnung der Isolate zu einem Referenzstamm nicht eindeutig erfolgen kann.

Die Bildung einer sMMO bei Kupfermangel konnte lediglich bei den Referenzstämmen *Methylocystis hirsuta*, *Methylocystis bryophila* und *Methylocystis echinoides* nachgewiesen werden.

Somit kann nach dieser Studie kein Isolat den Referenzstämmen zugeordnet werden, was die Ergebnisse der SAPD-PCR und Fettsäureanalyse unterstützt und die der MALDI-TOF-MS zumindest für das Isolat 613 widerlegt.

Das Gen für die Stickstoffreduktase zur Stickstofffixierung konnte bei allen Isolaten wie auch Referenzstämmen nachgewiesen werden. Wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, ist dies bei der stickstoffarmen Ernährung der Termiten möglicherweise ein für die Termiten essentieller Kommensalismus. Letztendlich ist diese Fähigkeit in der Literatur für alle Typ II MOB und *Methylococcus* beschrieben (AUMAN et al., 2001) und unterstützt die bisherigen Untersuchungen zur Verwandtschaftsaufklärung, schränkt eine Zuordnung jedoch auch nicht weiter ein.

Die Verwertung alternativer Stickstoffquellen stimmt für die Referenzstämmen mit den Angaben in der Literatur, soweit bekannt, überein (LINDNER et al., 2007). Auch hier zeigte das Isolat 613 ein auffälliges Verhalten, indem es als einzige Kultur keine alternativen Stickstoffquellen verwerten konnte. Die restlichen Isolate und die Referenzstämmen zeigten mit Ausnahme von *Methylocystis bryophila*, *Methylocystis echinoides* und *Methylocystis parvus* gleiches Verhalten. Nach diesen Ergebnissen kann also keines der Isolate den genannten *Methylocystis*-Arten zugeordnet werden.

Was die Verwertbarkeit unterschiedlicher C-Quellen betrifft, wurden nur Methan und

Methanol als erstes Stoffwechselzwischenprodukt der Methanoxidation genutzt. Lediglich das Isolat 613 nimmt hier wieder eine Sonderstellung ein, indem es Wachstum auf Methylamin als einziger C-Quelle zeigte, was darauf hinweist, dass dieses Isolat ein fakultatives methanotrophes Bakterium darstellt (THEISEN und MURRELL, 2005).

Die Isolate wiesen eine relativ hohe NaCl-Toleranz von 4 % bzw. 3,5 % bei Isolat 639 auf. Halophile Methanotrophe, die u.a. aus hypersalinen Gewässern mit Salinitäten bis zu 20 % isoliert wurden, zeigen besondere morphologische Oberflächenstrukturen auf (SOKOLOV und TROTSENKO, 1995; KALYUZHNYA et al., 1998; TROTSENKO und KHMELLENINA, 2002). Diese S-Layer setzen sich aus becherförmigen Strukturen zusammen, die hexagonal angeordnet und möglicherweise an der Osmotoleranz beteiligt sind (KHMELLENINA et al., 1999; TROTSENKO und KHMELLENINA, 2002). Solche S-Layer wurden in den TEM-Aufnahmen nicht beobachtet (Abschnitt 25) und unterstützen die Wachstumsversuche zur NaCl-Toleranz. Aufgrund der geringeren NaCl-Toleranz der Referenzstämme *Methylocystis echinoides* und *Methylocystis bryophila* ist eine Verwandtschaft der Isolate zu diesen MOB eher auszuschließen.

Zusammenfassend deuten die durchgeführten Untersuchungen darauf hin, dass es sich bei keinem der Termitenisolate um einen der *Methylocystis*-Referenzstämme handeln kann. Die Fingerprint-Methode der SAPD-PCR, das Fettsäuremuster sowie physiologische Unterschiede zeigen deutliche Differenzen. Die ribosomalen Proteine, die bei der MALDI-TOF-MS-Analyse herangezogen wurden sind möglicherweise so stark konserviert, dass keine eindeutige Verwandtschaftsaussage getroffen werden kann. Die so gewonnenen Ergebnisse weisen auf die Isolierung einer oder mehrerer neuer Arten der Gattung *Methylocystis* hin.

5.4 Reduktion des Methanschlupfes in Biogasaufbereitungsanlagen durch methanoxidierende Termitenisolate

Um den Einsatz von MOB in Biogasaufbereitungsanlagen zu testen wurde am PMI in Pirmasens ein Reaktor im Technikumsmaßstab konstruiert, der mit Methan oxidierenden Bakterien befüllt wurde. Über diese Kultur wurde das methanhaltige Abgas der Biogasaufbereitungsanlage geleitet und nach Wiederaustritt dessen Methangehalt gemessen. Zur Beimpfung des Reaktors wurde das Termitenisolat 610 herangezogen. Dieses zeichnete sich durch schnelles Anwachsen und eine stabile Methanoxidation aus.

Um eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen, wurde das Medium zur Oberflächenvergrößerung mit Füllkörpern versetzt. Hierfür wurden zunächst Tonkugeln getestet, die gut von den MOB angenommen wurden, bei denen sich jedoch selbst bei geringer mechanischer Belastung Partikel lösten welche die Funktion von Dichtungen und Leitungen herabsetzen können. Aus diesem Grund wurde auf Kunststofffüllkörper aus HDPE (High Density Polyethylen) zurückgegriffen, welche sich ebenfalls gut zur Besiedelung eigneten. Wurden diese Füllkörper mit dem Termitenisolat 610 beimpft, zeigte diese Kultur eine deutlich stärkere Methanoxidationsrate als ohne Füllkörper, was sich durch die höhere Zelldichte erklären lässt. Eine Reduktion des Methanverbrauchs durch den Füllkörper, wie er für *Methylocystis hirsuta* beobachtet wurde, korreliert mit einer verringerten Zelldichte und lässt sich durch eine mangelnde Toleranz gegenüber dem Werkstoff HDPE erklären.

Zur weiteren Optimierung wurde die Zusammensetzung des verwendeten NMS-Mediums untersucht, abgeändert und der Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Methanabaurate untersucht. Die Versuche fokussierten sich hierbei auf Bestandteile des Mediums, die als Cofaktoren von Enzymen während der Umsetzung von Methan zu Kohlenstoffdioxid, an diesem Stoffwechselweg direkt beteiligt sind. Eisen ist im Standard-NMS-Medium mit einer Konzentrationen von $12,8 \mu\text{M}$ enthalten und ist Bestandteil der sMMO. Die sMMO setzt sich aus drei Komponenten zusammen, einer Hydroxylase, einer Reduktase und einem regulatorischen Protein (SEMRAU et al., 2010), wobei die Hydroxylase das Eisen als Dieisen-Cluster mit einer Sauerstoffbrücke aufweist (Abb. 44, ELANGO et al. (1997)). Der Eisengehalt des Mediums scheint für die MOB optimal, da eine Erhöhung wie auch Reduzierung des Eisengehalts zu einer Abnahme der Methanoxidationsrate führte.

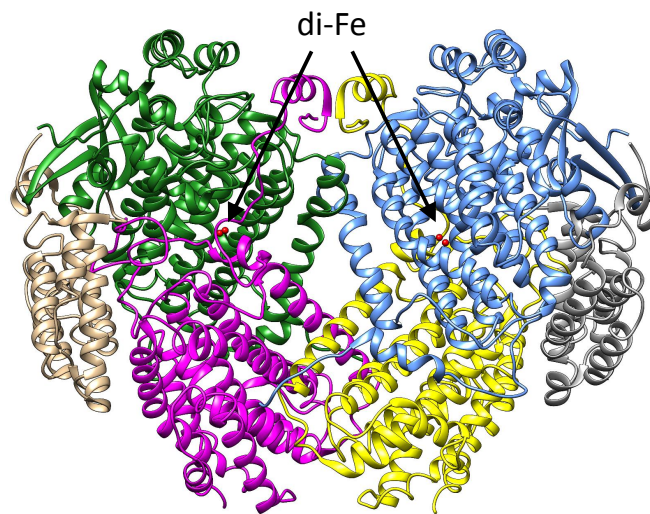


Abb. 44: Struktur der sMMO aus *Methylococcus capsulatus* (ROSENZWEIG und LIPPARD, 1994).

Im Gegensatz zur sMMO ist wenig über die molekularen Eigenschaften der pMMO bekannt, was hauptsächlich an der unzureichenden Aktivität ihrer Enzympräparationen liegt (SEMRAU et al., 2010). Es wird jedoch angenommen, dass die pMMO ein aus drei Untereinheiten aufgebautes Enzym ist, welches Kupfer im aktiven Zentrum aufweist (Abb. 45, LIEBERMAN und ROSENZWEIG (2005)).

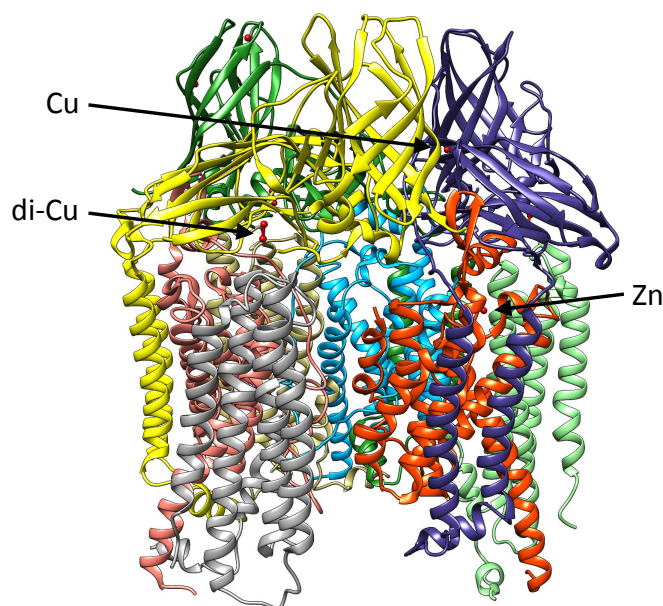


Abb. 45: Struktur der pMMO aus *Methylococcus capsulatus* (LIEBERMAN und ROSENZWEIG, 2005).

Der Einfluss von Kupfer auf den Methanabbau wurde ebenfalls untersucht. Eine Verdopplung des Kupfergehalts von $0,8 \mu\text{M}$ auf $1,6 \mu\text{M}$ zeigte eine signifikante Steigerung der Methanoxidation, was durch die Kupferabhängigkeit der partikulären Methanmonooxygenase, als katalysierendes Enzym im ersten Schritt der Methanoxidation zu CO_2 , erklärt werden kann. Allerdings führt eine zu hohe Konzentration zur Hemmung des Wachstums durch die toxische Wirkung des Kupfers als Schwermetall, wodurch die Methanoxidation dementsprechend unterbleibt. Sulfat und Nitrat scheinen in zu hohen Konzentrationen im Medium enthalten zu sein, da eine Reduktion dieser Bestandteile zur Steigerung der Methanoxidation führt. Schon HANSON und HANSON (1996) berichteten von der inhibierenden Wirkung von Nitrat auf die Methanoxidation, welche von BUSSMANN et al. (2004) erneut bestätigt wurde. Eine moderate Steigerung des Kupfergehalts sowie die Reduzierung von Sulfat und Nitrat im Medium sollte den Abbau von Methan im Reaktor beschleunigen. Die Abnahme des Methangehalts von 68 % innerhalb von 30 h könnte durch diese Modifikationen, neben dem Einsatz von Füllkörpern, Druck und einer Temperatur von $35 \text{ }^\circ\text{C}$ zu einer weiteren Steigerung der Methanoxidationsrate führen.

Zusätzlich zur Gewinnung von Zellmasse und PHB aus dem im Abgas befindlichen Methan wurde die Ausschleusung des bei der Oxidation von Methan zu CO_2 als Zwischenprodukt entstehenden Formiats untersucht. Dieses soll gesammelt und zurück in die Biogasanlage geschleust werden, wo es als Substrat für die dortige Mikroflora dienen kann. Die Detektion des Formiats stellte sich als erstes Hindernis dar, da dieses in den von MOB theoretisch gebildeten Mengen nur durch ein Kaltaufgabesystem gaschromatographisch nachgewiesen werden kann, welches für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand. Die Messung erfolgte daher auf enzymatischem Wege. Lediglich bei *Methylobacterium methanicum* konnte Formiat ohne Beeinflussung des Stoffwechselweges in geringen Konzentrationen von $0,04 \text{ g/l}$ nachgewiesen werden. Die Zugabe von artifiziellen Elektronenakzeptoren mit gleichwertigem Redoxpotential wie das der Formiatdehydrogenase führten ebenso wenig zum Erfolg wie die Zugabe von Formiatanaloge. Da Formiat nur schwer gewonnen werden kann und zudem stark flüchtig ist, wird im Rahmen dieser Arbeit empfohlen, von der Rückgewinnung von Formiat abzusehen und stattdessen die durch den Methangehalt im Abgas gewonnene MOB-Zellmasse als Substrat in die Biogasanlage zurückzuleiten. Auch hier würde letztendlich ein Abfallprodukt wiederverwertet, was die wirtschaftliche Bilanz der gesamten Biogasanlage erhöht. Alternativ

könnte durch Abänderung des Mediums PHB hergestellt werden (Abschnitt 4.6.2), was ebenfalls als energiereiches Substrat in die Biogasanlagen geleitet werden kann oder auch als biologisch abbaubares Polyester mit den ähnlichen Eigenschaften wie Polyethylen als dessen Ersatz eingesetzt werden (PIEJA et al., 2011). Auch hierdurch wäre eine verbesserte Bilanz der Biogasproduktion zur Energiegewinnung erreicht.

5.5 Ausblick

Durch weitere Untersuchungen zur Modifizierung des Mediums im Reaktor ist eine zusätzliche Steigerung der Methanoxidationsrate denkbar. Zudem kann durch die Methode des RNA-Silencings die Gewinnung des energiereichen Stoffwechselzwischenprodukts Formiats womöglich doch noch erfolgen (Abb. 46). RNA-Silencing ist ein natürlicher Mechanismus bei Pro- wie auch Eukaryoten, über den der Organismus die Genexpression kontrollieren kann. Mit Hilfe des RNA-Silencings lässt sich so die Expression der Formiatdehydrogenase (FDH) präzise regulieren, wodurch die gebildete Enzymmenge reduziert werden kann. Dadurch wird weniger Formiat zu CO_2 umgesetzt und Ameisensäure kann akkumulieren. Gleichzeitig werden weiterhin geringe Mengen zu CO_2 oxidiert, um die Energieversorgung der Zelle zu gewährleisten.

Von einem Vektor wird die zur mRNA der FDH komplementäre antisense RNA in der Zelle transkribiert. Es kommt zur Komplexbildung zwischen mRNA und antisense RNA, die zum Abbau der mRNA führt, die Translation verhindert und so die Bildung des Enzyms inhibiert (GOOD und STACH, 2011). Die Transkription der antisense RNA erfolgt von einem passenden Vektor, der diese Transkription unter die Kontrolle eines passenden Promotors stellt. Dieser Promotor muss die Transkription in Methanotrophen erlauben (NAKASHIMA et al., 2012), bspw. das Plasmid pMHA201, das für die Verwendung in *Methylococcus capsulatus* Bath entwickelt wurde (ALI und MURRELL, 2009). Wie in Abb. 47 gezeigt, besitzt dieser Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen und stellt ein *gfp*-Gen unter die Kontrolle des für Methanotrophe geeigneten Promotors pMMO- σ 70. MOB mit diesem Plasmid sind daher Kanamycin-resistent und fluoreszieren im grünen Bereich. Ersetzt man die Sequenz des *gfp*-Gens durch eine Sequenz, die für die passende antisense-RNA codiert, wird in MOB mit diesem Plasmid die FDH kaum exprimiert, Formiat akkumuliert und kann Biogasanlagen zugeführt werden, wo es als Substrat für dortige Mikroorganismen dient.

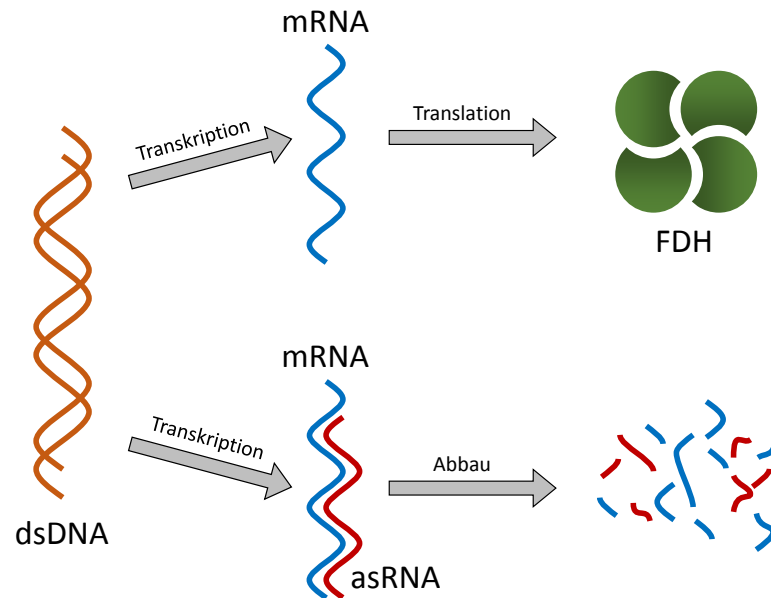


Abb. 46: Wirkungsweise der antisense RNA. Von der dsDNA wird durch Transkription eine mRNA generiert. Normalerweise wird diese translatiert, wodurch ein Protein (hier die Formiatdehydrogenase, FDH) entsteht. Bindet jedoch die antisense RNA an die mRNA wird deren Translation blockiert und der so entstandene Komplex abgebaut.

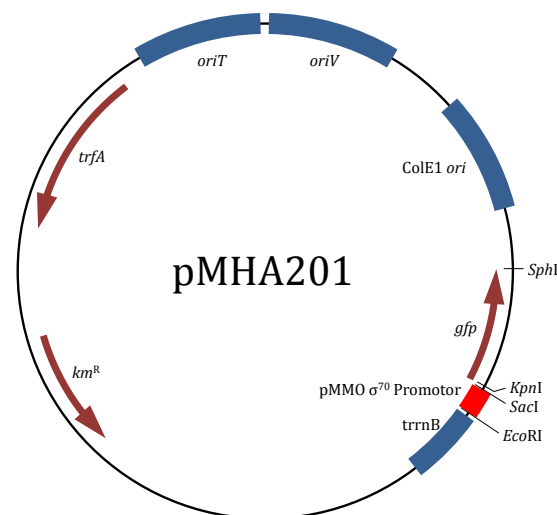


Abb. 47: Expressionsplasmid pMHA201 (ALI und MURRELL, 2009). gfp: Grün fluoreszierendes Protein; km^R: Kanamycinresistenzgen; ori: origin of replication; pMMO: partikuläre Methanmonooxygenase.

6 Literatur

Literatur

- ALI, H und J. MURRELL (2009). *Development and validation of promoter-probe vectors for the study of methane monooxygenase gene expression in Methylococcus capsulatus Bath*. Microbiology (Reading, England), 155:761–771.
- ASENJO, JA und J. SUK (1986). *Microbial conversion of methane into poly- β -hydroxybutyrate (PHB): growth and intracellular product accumulation in a type II methanotroph*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 64:271–278.
- AUMAN, AJ, C. SPEAKE und M. LIDSTROM (2001). *nifH sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs*. Applied and Environmental Microbiology, 67:4009–4016.
- AUMAN, AJ, S. STOLYAR, A. COSTELLO und M. LIDSTROM (2000). *Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment*. Applied and Environmental Microbiology, 66:5259–5266.
- BAHADIR, M, H. PARLAR und M. SPITELLER (2000). *Umweltlexikon*. Springer Verlag, Heidelberg.
- BAUER, C, M. LEBUHN und A. GRONAUER (2009). *Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen*, Bd. 12 d. Reihe Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Direkt Marketing & Digitaldruck, Hallbergmoos.
- BÉDARD, C und R. KNOWLES (1989). *Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers*. Microbiological Reviews, 53:68–84.
- BEE, BUNDESVERBAND ERNEUERBARE ENERGIE (2014). *Erneuerbare Energien in der Debatte*. <http://www.bee-ev.de>; Letzter Zugriff 01.12.2014.
- BERCHTOLD, M, A. CHATZINOTAS, W. SCHONHUBER, A. BRUNE, R. AMANN, D. HAHN und H. KÖNIG (1999). *Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite mastotermes darwiniensis by hybridization with rRNA-targeted probes*. Archives of Microbiology, 172:407–416.

- BGR, BUNDESANSTALT FÜR GEOWISSENSCHAFTEN UND ROHSTOFFE (2009). *Energirohstoffe 2009 - Reserven, Ressourcen, Verfügbarkeit - Erdöl, Erdgas, Kohle, Kernbrennstoffe, Geothermische Energie*. <http://www.bgr.bund.de>; Letzter Zugriff 01.12.2014.
- BIRD, CW, J. LYNCH, F. PIRT und W. REID (1971). *Steroids and squalene in Methylococcus capsulatus grown on methane*. *Nature*, 230:473–474.
- BISCHOFBERGER, W, N. DICHTL, K. ROSENWINKEL, C. SEYFRIED und B. BÖHNKE (2005). *Anaerobtechnik*. Springer Verlag, Heidelberg.
- BMU, BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT (2011). *Erneuerbare Energien - Innovationen für eine nachhaltige Energiezukunft*. Silber Druck, Niestetal.
- BORNE, M, H. DORR und I. LEVIN (1990). *Methane consumption in aerated soils of the temperate zone*. *Tellus*, 24:2–8.
- BOURNE, DG, A. HOLMES, N. IVERSEN und J. MURRELL (2000). *Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria*. *FEMS Microbiology Ecology*, 31:29–38.
- BOWMAN, JP (2011). *Approaches for the characterization and description of novel methanotrophic bacteria*. *Methods in Enzymology*, 495:45–62.
- BOWMAN, JP, L. JIMÉNEZ, I. ROSARIO, T. HAZEN und G. SAYLER (1993). *Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene-contaminated subsurface groundwater site*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:2380–2387.
- BRUNE, A und STINGL, U (2005). *Prokaryotic symbionts of termite gut flagellates: phylogenetic and metabolic implications of a tripartite symbiosis*. *Molecular Basis of Symbiosis* 39-60. Overmann, J (Hrsg.), Springer-Verlag Berlin.
- BUSSMANN, I, M. PESTER, A. BRUNE und B. SCHINK (2004). *Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance)*. *FEMS Microbiology Ecology*, 47:179–189.

LITERATUR

- CAI, Z und X. YAN (1999). *Kinetic model for methane oxidation by paddy soil as affected by temperature, moisture and N addition*. Soil Biology and Biochemistry, 31:715–725.
- CARINI, S, N. BANO, G. LECLEIR und S. JOYE (2005). *Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Mono Lake, California (USA)*. Environmental Microbiology, 7:1127–1138.
- CHENG, YS, J. HALSEY, K. FODE, C. REMSEN und M. COLLINS (1999). *Detection of methanotrophs in groundwater by PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 65:648–651.
- CONRAD, R (2009). *The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved*. Environmental Microbiology Reports, 1:285–292.
- DAELMAN, MRJ, E. VAN VOORTHUIZEN, U. VAN DONGEN, E. VOLCKE und M. VAN LOOSDRECHT (2012). *Methane emission during municipal wastewater treatment*. Water Research, 46:3657–3670.
- DEDYSH, SN, Y. BERESTOVSKAYA, L. VASYLIEVA, S. BELOVA, V. KHMELLENINA, N. SUZINA, Y. TROTSSENKO, W. LIESACK und G. ZAVARZIN (2004). *Methylocella tundrae sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54:151–156.
- DEDYSH, SN, V. KHMELLENINA, N. SUZINA, Y. TROTSSENKO, J. SEMRAU, W. LIESACK und J. TIEDJE (2002). *Methylocapsa acidiphila gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52:251–261.
- DEDYSH, SN, W. LIESACK, V. KHMELLENINA, N. SUZINA, Y. TROTSSENKO, J. SEMRAU, A. BARES, N. PANIKOV und J. TIEDJE (2000). *Methylocella palustris gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50:955–969.
- DENA, DEUTSCHE ENERGIE-AGENTUR GMBH (2013). *Leitfaden Biomethan BHKW - direkt. Eine Handreichung für mit Biomethan betriebene Blockheizkraftwerke gemäß EEG 2012 mit Schwerpunkt Direktvermarktung und der bedarfsgerechten Erzeugung von Strom aus Biomethan*. <http://www.biogaspartner.de/>; Letzter Zugriff 01.12.2014.

- DILLON, RJ und V. DILLON (2004). *The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions*. Annual Review of Entomology, 49:71–92.
- DREIZEHNTES GESETZ ZUR ÄNDERUNG DES ATOMGESETZTES (2011).
- DRÖGE, S (2005). *Isolierung und Charakterisierung von Spirochaeten aus dem Termitendarm*. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- DUNFIELD, PF, V. KHMELLENINA, N. SUZINA, Y. TROTSSENKO und S. DEDYSH (2003). *Methylocella silvestris sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53:1231–1239.
- EDER, B und H. SCHULZ (2006). *Biogas Praxis. Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit*. Eder, B. & Schulz, H, Staufen bei Freiburg.
- EEG (2009). *Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/EG (2009)*. EEG.
- ELANGO, N, R. RADHAKRISHNAN, W. FROLAND, B. WALLAR, C. EARHART, J. LIPSCOMB und D. OHLENDORF (1997). *Crystal structure of the hydroxylase component of methane monooxygenase from Methylosinus trichosporium OB3b*. Protein Science: A Publication of the Protein Society, 6:556–568.
- ELLER, G, S. STUBNER und P. FRENZEL (2001). *Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation*. FEMS Microbiology Letters, 198:91–97.
- ENGEL, M, D. GRIMALDI und K. KRISHNA (2007). *Primitive termites from the early cretaceous of Asia (Isoptera)*. In: *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde. Serie B*, S. 1–32. Staatliches Museum für Naturkunde, Stuttgart.
- FACHVERBAND BIOGAS E.V. (2015). *Branchenzahlenprognose für die Jahre 2014 und 2015*. <http://www.biogas.org>; Letzter Zugriff: 10.01.2015.
- FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2010). *Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung*. Gülzow-Prüzen.

LITERATUR

- FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2011). *Basisdaten Bioenergie Deutschland*. Gülzow-Prüzen.
- FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2013). *Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung*. Gülzow-Prüzen.
- FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2014a). *Basisdaten Bioenergie*. <http://fnr.de/basisdaten/bioenergie/biogas.html>; Letzter Zugriff 27.12.2014.
- FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2014b). *Online-Mediathek der FNR, Grafik Energiebereitstellung aus erneuerbaren Energien / Endenergie*. <http://mediathek.fnr.de>; Letzter Zugriff 01.12.2014.
- FNR, FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2014c). *Online-Mediathek der FNR, Grafik Struktur des Primärenergieverbrauchs in Deutschland / Primärenergie*. <http://mediathek.fnr.de>; Letzter Zugriff 01.12.2014.
- FRÖHLICH, J (1999). *Entwicklung und Einsatz von Isolierungstechniken zur physiologischen Charakterisierung symbiontischer Mikroorganismen im Darm von Termiten*. Doktorarbeit, Universität Ulm.
- FRÖHLICH, J und J. PFANNEBECKER (2006). *Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material*. Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 022 569 A1.
- FUCHS, G, Hrsg. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*, Bd. 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- GEBER, J (2004). *Mikrobielle Methanoxidation im Biofilter zur Behandlung von Rest-Emissionen bei der passiven Deponientgasung*. Hamburger Bodenkundliche Arbeiten, Band 55.
- GOOD, L und J. STACH (2011). *Synthetic RNA silencing in bacteria - antimicrobial discovery and resistance breaking*. *Frontiers in Microbiology*, 2:185.
- GRAEDEL, TE und P. CRUTZEN (1994). *Chemie der Atmosphäre*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- GRAHAM, DW, J. CHAUDHARY, R. HANSON und R. ARNOLD (1993). *Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors*. *Microbial Ecology*, 25:1–17.

- GROSSE, S, L. LARAMEE, K. WENDLANDT, I. McDONALD, C. MIGUEZ und H. KLEBER (1999). *Purification and characterization of the soluble methane monoxygenase of the type II methanotrophic bacterium Methylocystis sp. strain WI 14*. Applied and Environmental Microbiology, 65:3929–3935.
- HANSON, RS und T. HANSON (1996). *Methanotrophic bacteria*. Microbiological Reviews, 60:439–471.
- HARRISON, DE (1978). *Mixed cultures in industrial fermentation processes*. Advances in Applied Microbiology, 24:129–164.
- HELM, J (2002). *Methanotrophe Bakterien als Produzenten von Poly-(β -Hydroxybuttersäure) (PHB) - Charakterisierung des Prozesses, des Polymers und einer stabilen Mischkultur*. Doktorarbeit, Technische Universität Dresden.
- HEYER, J, V. GALCHENKO und P. DUNFIELD (2002). *Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments*. Microbiology (Reading, England), 148:2831–2846.
- HIRSCHHÄUSER, S, J. FRÖHLICH, A. GNEIPEL, I. SCHÖNIG und H. KÖNIG (2005). *Fast protocols for the 5S rDNA and ITS-2 based identification of Oenococcus oeni*. FEMS Microbiology Letters, 244:165–171.
- HO, A, S. VLAEMINCK, K. ETTWIG, B. SCHNEIDER, P. FRENZEL und N. BOON (2013). *Revisiting methanotrophic communities in sewage treatment plants*. Applied and Environmental Microbiology, 79:2841–2846.
- HONGO, Y, M. OHKUMA und T. KUDO (2003). *Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite Reticulitermes speratus (Isoptera; Rhinotermitidae)*. FEMS Microbiology Ecology, 44:231–242.
- HONGO, Y, V. SHARMA, T. PRAKASH, S. NODA, T. TAYLOR, T. KUDO, Y. SAKAKI, A. TOYODA, M. HATTORI und M. OHKUMA (2008). *Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105:5555–5560.
- INVITROGEN (2012). *Anleitung zum TOPO[®] TA Cloning[®] Kit*. Carlsbad, USA. Letzter Zugriff: 01.12.2014.

- IPPC, INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (1994). *Radiative Forcing of Climate Change and an Evaluation of the IPCCIS92 Emission Scenarios*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. IPCC.
- KALYUZHAYAYA, MG, V. KHMELLENINA, N. STAROSTINA, S. BARANOVA, N. SUZINA und Y. TROTSSENKO (1998). *A new moderately halophilic methanotroph of the genus Methylobacter*. Mikrobiologiya, 67:438–444.
- KHMELLENINA, VN, M. KALYUZHAYAYA, N. SAKHAROVSKY, N. SUZINA, Y. TROTSSENKO und N. GOTTSCHALK (1999). *Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs*. Archives of Microbiology, 172:321–329.
- KIGHTLEY, D, D. NEDWELL und M. COOPER (1995). *Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms*. Applied and Environmental Microbiology, 61:592–601.
- KIP, N, W. OUYANG, J. VAN WINDEN, A. RAGHOEBARSING, L. VAN NIFTRIK, A. POL, Y. PAN, L. BODROSSY, E. VAN DONSELAAR, G. REICHART, M. JETTEN, J. DAMSTÉ und H. OP DEN CAMP (2011). *Detection, isolation, and characterization of acidophilic methanotrophs from Sphagnum mosses*. Applied and Environmental Microbiology, 77:5643–5654.
- KÖNIG, H und A. BREUNIG (1997). *Ökosystem Termitendarm*. Spektrum der Wissenschaft, 4:68–76.
- KÖNIG, H, J. FRÖHLICH, M. BERCHTHOLD und M. WENZEL (2002). *Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites*. Recent Res Devel Microbiology, 6:125–156.
- KÖNIG, H, J. FRÖHLICH und H. HERTEL (2011a). *Diversity in Lignocellolytic Activities of cultured microorganisms*. Intestinal Microorganisms of termites and other invertebrates, König H und Varma A (Hsg.), Springer-Verlag Heidelberg.
- KÖNIG, H, R. STANTSCHIEFF, K. SEYFARTH und D. S (2011b). *Biologie der methanogenen Archaea und ihre Bedeutung für die mikrobielle Prozessführung in Biogasanlagen*. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. Tagungsband FNR/KTBL-Kongress vom 20. Bis 21. September 2011 in Göttingen.

- KRASIL'NIKOV, NA und S. SATDYKOV (1969). *Estimation of the total bacteria in the intestines of termites*. Microbiology, 38:289–292.
- KTBL, KURATORIUM FÜR TECHNIK UND BAUWESEN IN DER LANDWIRTSCHAFT (2009). *Faustzahlen Biogas 2009*. Darmstadt.
- KUHNIGK, T und H. KÖNIG (1997). *Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites*. Journal of Basic Microbiology, 37:205–211.
- KUYKENDALL, LD, M. ROY, J. O'NEILL und T. DEVINE (1988). *Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of Bradyrhizobium japonicum*. International Journal of Systematic Bacteriology, 38:358–361.
- LAMB, DC, C. JACKSON, A. WARRILOW, N. MANNING, D. KELLY und S. KELLY (2007). *Lanosterol biosynthesis in the prokaryote Methylococcus capsulatus: insight into the evolution of sterol biosynthesis*. Molecular Biology and Evolution, 24:1714–1721.
- LELIEVELD, J, P. CRUTZEM und C. BRUHL (1993). *Climate effects of atmospheric methane*. Chemosphere, 26:739–768.
- LFL, BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT (2009). *Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen*. Freising-Weihenstephan. Letzter Zugriff: 01.12.2014.
- LIEBERMAN, RL und A. ROSENZWEIG (2005). *Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane*. Nature, 434:177–182.
- LILBURN, TG, K. KIM, N. OSTROM, K. BYZEK, J. LEADBETTER und J. BREZNAK (2001). *Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes*. Science (New York, N.Y.), 292:2495–2498.
- LINDNER, AS, A. PACHECO, H. ALDRICH, A. COSTELLO STANIEC, I. UZ und D. HODSON (2007). *Methylocystis hirsuta sp. nov., a novel methanotroph isolated from a groundwater aquifer*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57:1891–1900.

LITERATUR

- LITT, T, K. BEHRE, K. MEYER, H. STEPHAN und S. WANSA (2007). *Eiszeitalter und Gegenwart. Stratigraphische Begriffe für das Quartär des norddeutschen Vereisungsgebietes*. Quaternary Science Journal, 56:7–65.
- LO, N, X. TOKUDA, H. WATANABE, H. ROSE, M. SLAYTOR, K. MAEKAWA, C. BANDI und H. NODA (2000). *Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches*. Current biology, 10:801–804.
- MATSUURA, K (2001). *Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, Reticulitermes speratus*. OIKUS, 92:20–26.
- MAY, T (2012). *Molekularbiologische Untersuchung methanogener Archaea und Charakterisierung von Eigenisolaten aus landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- MURRAY, J und D. KING (2012). *Climate policy: Oil's tipping point has passed*. Nature, 481:433–435.
- NAKASHIMA, N, S. GOH und T. TAMURA (2012). *Subtracting gene function by gene silencing and disruption in bacteria*. Current Biotechnology, 1:166–174.
- NOIROT, C (1995). *The gut of the termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny*. Annales- Societe Entomologique de France, 31:197–226.
- OHKUMA, M und T. KUDO (1996). *Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite Reticulitermes speratus*. Applied and Environmental Microbiology, 62:461–468.
- OHKUMA, M, S. NODA und T. KUDO (1999). *Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites*. Appl Environ Microbiol, 65:4926–4934.
- OMELCHENKO, MB, L. VASILIEVA, G. ZAVARZIN, N. SAVELIEVA, A. LYSENKO, L. MITYUSHINA, V. KHMELLENINA und Y. TROTSSENKO (1996). *A novel psychrophilic methanotroph of the genus Methylobacter*. Mikrobiologiya, 65:339–343.
- OTTOW, J (2011). *Mikrobiologie von Böden: Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*. Springer Verlag, Heidelberg.

- PAUL, K, J. NONOH, L. MIKULSKI und A. BRUNE (2012). *Methanoplasmatales, Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens*. Applied and Environmental Microbiology, 78:8245–8253.
- PESTER, M, A. THOLEN, M. FRIEDRICH und A. BRUNE (2007). *Methane oxidation in termite hindguts: absence of evidence and evidence of absence*. Applied and Environmental Microbiology, 73:2024–2028.
- PFANNEBECKER, J (2008). *Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen*. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- PIEJA, AJ, E. SUNDSTROM und C. CRIDDLE (2011). *Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph Methylocystis parvus OBBP*. Applied Environmental Microbiology, 77:6012–6019.
- PRILLINGER, H, R. MESSNER, H. KÖNIG, R. BAUER, K. LOPANDIC, O. MOLNAR, P. DANGEL, F. WEIGAND, T. KIRISITIS, T. NAKASE und L. SIEGLER (1996). *Yeast associated with termites: a phenotypic and genotypic characterization and use of coevolution for dating evolutionary radiations in asco- and basidiomycetes*. Systematic + Applied Microbiology, 19:265–283.
- RAMANATHAN, V, J. CICERONE, H. SINGH und J. KIEHL (1985). *Trace gas trends and their potential role in climate change*. Journal of Geophysical Research, 90:5547–5566.
- REEBURGH, WS, S. WHALEN und M. ALPERN (1993). *The role of methylotrophy in the global methane budget*. In: MURRELL JC, KELLEY DP, Hrsg.: *Microbial growth on C1 compounds*. Intercept Press, Ltd.
- REINEKE, W und M. SCHLÖMANN (2007). *Umweltmikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, München.
- REUSS, J, H. KÖNIG und S. DRÖGE (2013). *Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut*. VAAM Tagungsband 2013 BIOSpektrum, Springer Verlag, Heidelberg. Poster FTP029, S. 29.
- REUSS, J, H. KÖNIG und S. DRÖGE (2014). *Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut*. VAAM Tagungsband 2014 BIOSpektrum, Springer Verlag, Heidelberg. Oral Presentation GMV03, S. 103.

- RIIS, V und W. MAI (1988). *Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis*. Journal of Chromatography A, 445:285–289.
- ROSENTHAL, AZ, X. ZHANG, K. LUCEY, E. OTTESEN, V. TRIVEDI, H. CHOI, N. PIERCE und J. LEADBETTER (2013). *Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured deltaproteobacteria in the termite gut hydrogen economy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110:16163–16168.
- ROSENZWEIG, AC und S. LIPPARD (1994). *Determining the structure of a hydroxylase enzyme that catalyzes the conversion of methane to methanol in methanotrophic bacteria*. Accounts of Chemical Research, 27:229–236.
- SABREE, ZL, C. HUANG, G. ARAKAWA, G. TOKUDA, N. LO, H. WATANABE und N. MORAN (2012). *Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis**. Applied and Environmental Microbiology, 78:204–210.
- SCHUBERT, CJ, M. COOLEN, L. NERETIN, A. SCHIPPERS, B. ABBAS, E. DURISCHKAISER, B. WEHRLI, E. HOPMANS, J. DAMSTÉ, S. WAKEHAM und M. KUYPERS (2006). *Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column*. Environmental Microbiology, 8:1844–1856.
- SCHUBERT, S und A. WIESER (2010). *MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik*. Biospektrum, 7:760–762.
- SEMRAU, JD, A. CHISTOSERDOV, A. COSTELLO, J. DAVAGNINO, E. KENNA, A. HOLMES, R. FINCH, J. MURRELL und M. LIDSTROM (1995). *Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs*. Journal of Bacteriology, 177:3071–3079.
- SEMRAU, JD, A. DISPIRITO und S. YOON (2010). *Methanotrophs and copper*. FEMS Microbiology Reviews, 34:496–531.
- SÖHNGEN, N (1906). *Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffquelle und Energiequelle gebrauchen*. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 2:513–517.
- SIGMA-ALDRICH (2014). *Sudanschwarz B. Produktinformationsdatenblatt*. <https://www.sigmaaldrich.com>; Letzter Zugriff: 16.12.2014.

- SOKOLOV, AP und Y. TROTSSENKO (1995). *Methane consumption in (hyper)saline habitats of Crimea (Ukraine)*. FEMS Microbiology Ecology, 18:299–204.
- SOROKIN, DY, B. JONES und J. KUENEN (2000). *An obligate methylotrophic, methane-oxidizing Methylobacterium species from a highly alkaline environment*. Extremophiles: Life Under Extreme Conditions, 4:145–155.
- STANTSCHIEFF, R, J. KUEVER, A. RABENSTEIN, K. SEYFARTH, S. DRÖGE und H. KÖNIG (2014). *Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus Methanobacterium*. Applied Microbiology and Biotechnology, 98:5719–5735.
- SUGIMOTO, A, D. BIGNELL und J. MACDONALD (2000). *Global impact of termites on the carbon cycle and atmospheric trace gases*. In: *Termites: Evol, Social, Symbioses, Ecology*, S. 409–435. Springer Science & Business Media, Dordrecht, Niederlande.
- TAYASU, I, A. SUGIMOTO, E. WADA und T. ABE (1994). *Xylophagous termites depending on atmospheric nitrogen*. Naturwissenschaften, 81:229–231.
- THEISEN, AR und J. MURRELL (2005). *Facultative methanotrophs revisited*. Journal of Bacteriology, 187:4303–4305.
- TOKURA, M, M. OHKUMA und T. KUDO (2000). *Molecular phylogeny of methanogens associated with flagellated protists in the gut and with the gut epithelium of termites*. FEMS, 33:233–240.
- TOUROVA, TP, M. OMELCHENKO, K. FEGEDING und L. VASILIEVA (1999). *The phylogenetic position of Methylobacter psychrophilus sp. nov.*. Mikrobiologiya, 68:437–444.
- TROTSSENKO, YA, N. DORONINA, A. SOKOLOV und M. OSTAFIN (1992). *PHB synthesis by methane- and methanol-utilizing bacteria*. Internat Symp on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Göttingen.
- TROTSSENKO, IA, K. MEDVEDKOVA, V. KHMELNINA und B. ESHINIMAEV (2009). *Thermophilic and thermotolerant aerobic methanotrophs*. Mikrobiologia, 78:435–450.
- TROTSSENKO, YA und V. KHMELNINA (2002). *Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs*. Archives of Microbiology, 177:123–131.

- TROTSSENKO, YA und V. KHMELENINA (2005). *Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems*. FEMS Microbiology Ecology, 53:15–26.
- VECHERSKAYA, M, C. DIJKEMA und A. STAMS (2001). *Intracellular PHB conversion in a Type II methanotroph studied by ^{13}C NMR*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 26:15–21.
- WADE, WG (2013). *The oral microbiome in health and disease*. Pharmacological Research, 69:137–143.
- WARTIAINEN, I, A. HESTNES, I. McDONALD und M. SVENNING (2006). *Methylocystis rosea sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78 degrees N)*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56:541–547.
- WENDLANDT, KD, M. JECHOREK, J. HELM und U. STOTTMEISTER (2001). *Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane*. Journal of Biotechnology, 86:127–133.
- WENZEL, M, I. SCHÖNIG, M. BERCHTOLD, P. KÄMPFER und H. KÖNIG (2002). *Aerobic and facultatively anaerobic cellolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis**. Journal of Applied Microbiology, 92:32–40.
- WHITTENBURY, R, K. PHILLIPS und J. WILKINSON (1970). *Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria*. Journal of General Microbiology, 61:205–218.
- WISE, MG, J. MCARTHUR und L. SHIMKETS (1999). *Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 65:4887–4897.
- WUEBBLES, D und J. EDMONDS (1991). *Primer on greenhose gases*. Lewis Publishers Inc., Chelsea, Michigan, USA.
- YU, Y, C. LEE, J. KIM und S. HWANG (2005). *Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction*. Biotechnology and Bioengineering, 89:670–679.

A Abkürzungsverzeichnis

BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung
BEE	Bundesverband Erneuerbare Energie eV
BGR	Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffen
BMU	Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BSA	Bovines Serumalbumin
dena	Deutsche Energie-Agentur GmbH
DGGE	Denaturierende Gelelektrophorese
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DWW	Druckwasserwäsche
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Erneuerbare Energien
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FADH	Formaldehyd-Dehydrogenase
FDH	Formiatdehydrogenase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLOX	flammenlosen Oxidation
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe eV
FS	Fettsäuren
GC	Gaschromatographie
HBPE	Hydroxybuttersäurepropylester
HDPE	High Density Polyethylen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
ICM	intracytoplasmatische Membran (engl. intracytoplasmic membrane)
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung
KNV	katalytische Nachverbrennung
LB	engl. lysogeny broth; Medium zur Kultivierung von Bakterien
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry
MCS	Multiple Cloning Site
MDH	Methanoldehydrogenase
MMO	Methanmonooxygenase
MOB	Methan oxidierende Bakterien
MPA	Amtlichen Materialprüfungsanstalt
mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria

A Abkürzungsverzeichnis

<i>nifH</i>	Genbezeichnung für eine Untereinheit der Nitrogenase
NMS	Nitratmineralsalz
nSAPD	-PCR
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PHB	Poly- β -Hydroxybuttersäure
pMMO	Partikuläre Methanmonooxygenase
<i>pmoA</i>	Genbezeichnung für eine Untereinheit der pMMO
ppm	Parts per million
PSA	Druckwechseladsorption (engl. pressure swing adsorption)
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR; auch: Real-Time-quantitative-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RuMP	Ribulosemonophosphat
SAPD	Specifically Amplified Polymorphic DNA
sMMO	Lösliche Methanmonooxygenase (engl. soluble MMO)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tis-Borat-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tg	Teragramm
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
UpM	Umdrehungen pro Minute

B Veröffentlichungen und Präsentationen

Reuß Julia, [REDACTED] (2014).
Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut. Manuskript in Bearbeitung

Reuß Julia (2014). *Methanotrophic bacteria from termite gut*. Vortrag GMV03. VAAM-Jahrestagung, Dresden.

[REDACTED], Reuß J., [REDACTED] (2014). *Alternative Nutzungsweisen für den Anlagenbestand - Bioraffinerie im Energiepark Pirmasens*. Poster. Energieforen Leipzig Leipzig.

Reuß Julia, [REDACTED] (2014). *The use of methanotrophs from termite guts in biogas upgrading plants*. Poster. International Conference on Biogas Microbiology (ICBM). Uppsala, Schweden.

Reuß Julia, [REDACTED] (2013). *Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut*. Poster FTP029. VAAM-Jahrestagung, Bremen.