

Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Isolierung, Charakterisierung und Nachweis  
methanogener Archaea aus laufenden Praxis-  
NawaRo-Biogasanlagen unter besonderer  
Berücksichtigung der Gattung *Methanobacterium***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Robbin Stantscheff

geboren am 23.02.1982 in Duisburg

Mainz, 2013



Die experimentellen Arbeiten der hier vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 2008 bis September 2013 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Teile der Arbeit wurden in folgenden Posterpräsentationen und Publikationen veröffentlicht oder befinden sich in Vorbereitung:

**Seyfarth K., Stantscheff R., Dröge S., König S. (2009).** Isolierung und Charakterisierung von Methanbakterien aus Biogasanlagen. Poster und Diskussion. Tag der Technologie BioTech in Rheinland-Pfalz. 26.10.2009, ZDF- Konferenzzentrum, Mainz.

**Seyfarth K., Stantscheff R., Dröge S., König H. (2009).** Isolierung und Charakterisierung von Methanbakterien aus Biogasanlagen. Poster. Internationale Wissenschaftskonferenz Biogas Science 2009, 02. - 04.12.2009, Erding.

**Stantscheff R., Seyfarth K., Dröge S., Klocke M., König H. (2011).** Isolation and characterisation of methanogenic Archaea from on-farm biogas plants. Poster GWP013., BIOSpektrum Tagungsband zur Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, 03.- 06.04.2011, Karlsruhe, ISSN 0947-0867, S. 157.

**Stantscheff R., Kuever J., Rabenstein A., Seyfarth K., Dröge S., König H. (Eingereicht).** Isolation and differentiation of methanogenic archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis to the genus *Methanobacterium*. Appl Microbiol Biotechnol.

**Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Eikmeyer F.G., Seffner A., Boelter J., Szczepanowski R., Blom J., Jaenicke S., König H., Pühler A., Schlüter A. (2012).** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2<sup>T</sup>, isolated from a sewage sludge digester. J Bacteriol. 194:5487–5488.

**Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Cibis K., Eikmeyer F.G., König H., Pühler A., Schlüter A. (2013).** Complete genome sequence of the hydrogenotrophic archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1, isolated from a production-scale biogas plant. J Biotechnol. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.013> (im Druck).

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

## **Druckgenehmigungen**

Für sämtliche Abbildungen der vorliegenden Arbeit, welche aus wissenschaftlichen Publikationen oder Lehrportalen entnommen bzw. modifiziert wurden, sind die folgenden, dazu erforderlichen Druckgenehmigungen bei den entsprechenden Verlagen bzw. Institutionen eingeholt worden:

A) Druckgenehmigung über das Copyright Clearance Center (CCC) RightsLink in Vertretung für die aufgeführten wissenschaftlichen Journale bzw. Verlage erhalten:

A.1) Erteilte Genehmigungen unter Ausgabe einer Lizenznummer

Angewandte Chemie (Lizenznummer: 3047020744178), Antonie van Leeuwenhoek (3047060987877), ChemBioChem (3047030042348), Current Opinion in Microbiology (3047160168379), FEBS Letters (3047131324290), FEMS Microbiology Reviews (3047130635571), Helvetica Chimica Acta (3047010538141), Science (3047140421524)

A.2) Erteilte Genehmigungen unter Verzicht auf Ausgabe einer Lizenznummer

Applied and Environmental Microbiology, Journal of Biological Chemistry, Journal of Natural Products, Microbiology and Molecular Biology Reviews

B) Erteilte Druckgenehmigungen ausserhalb der Vermittlung durch das CCC:

Annula Reviews of Biochemistry mit freundlicher Genehmigung durch Latusha Williams; Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) mit Genehmigung durch das Referat Bürgerkommunikation; Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) mit freundlicher Genehmigung durch Volker Petersen; Lehrportal Universität Göttingen mit freundlicher Genehmigung durch Arne Gerdes

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel I – Einleitung</b> .....	<b>1</b>
I.1 Globale Energielage und Erneuerbare Energien in Deutschland.....	1
I.1.1 Fossile Energieträger und Verfügbarkeitsprognosen.....	1
I.1.2 Erneuerbare Energien in Deutschland .....	2
I.2 Biogas und die Mikrobiologie der Biogasbildung .....	4
I.2.1 Zusammensetzung und Quellen von Biogas.....	4
I.2.2 Mikrobiologie der Biogasbildung .....	5
I.2.3 Methanogene Archaea: Endpunkt des anaeroben Abbaus organischer Substrate .....	11
I.2.3.1 Die Archaea als Domäne des Lebens .....	11
I.2.3.2 Methanogene Archaea .....	15
I.2.4 Die Methanogenese.....	21
I.2.4.1 Kofaktoren der Methanogenese.....	22
I.2.4.2 Die hydrogenotrophe Reaktionsfolge der Methanogenese.....	25
I.2.4.3 Methan aus Acetat: Reaktionen der acetoklastischen Methanogenese .....	31
I.2.4.4 Methan aus methylierten Verbindungen: Reaktionen der methylo-trophen Methanogenese.....	35
I.3 Gewinnung und energetische Nutzung von Biogas .....	38
I.3.1 Aufbau von landwirtschaftlichen Biogasanlagen .....	38
I.3.2 Landwirtschaftliche Gewinnung und Nutzung von Biogas .....	40
I.3.3 Substrate, Prozessparameter und Störungsindikatoren .....	42
I.3.3.1 Substrate für den Betrieb von NawaRo-Biogasanlagen .....	42
I.3.3.2 Fermentationsrelevante Verfahrensparameter: Ursachen und Indikatoren von Prozess-Störungen.....	45
I.3.4 Fördern und Fordern: Das Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (EEG) .....	51
I.3.5 Stand der Forschung: Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen. ....	52
I.3.6 Ziele der Arbeit .....	57
<b>Kapitel II - Material und Methoden</b> .....	<b>58</b>
II.1 Mikrobiologische Methoden.....	58
II.1.1 Laborinventar und Hilfsmittel .....	58
II.1.2 Chemikalien.....	60
II.1.3 Biochemikalien und Enzyme.....	61
II.1.4 Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits.....	62

II.1.5 Gase für die anaerobe Kultivierung.....	63
II.1.6 Antibiotika.....	63
II.1.7 Referenzorganismen und Kulturbedingungen.....	64
II.1.8 NaWaRo-Biogasanlagen und Probennahme .....	66
II.1.9 Nährmedien .....	66
II.1.10 Methoden für die Isolierung methanogener Archaea aus BGA- Fermentersubstrat ....	72
II.1.10.1 Die Tiefagar-Verdünnungsmethode.....	72
II.1.10.2 Festmedien-Kultivierung durch anaerobes Ausplattieren.....	73
II.1.10.3 Reinkultivierung dominanter anaerober Mikroorganismen durch serielle Verdünnung .....	75
II.1.11 Strategien zur Reinkultivierung spezifischer Gattungen methanogener Archaea aus BGA-Fermenterproben .....	76
II.1.11.1 Isolierung von Mikroorganismen der hydrogenotrophen Gattung <i>Methano-</i> <i>bacterium</i> .....	76
II.1.11.2 Isolierung von Mikroorganismen der Gattung <i>Methanosarcina</i> .....	77
II.1.11.3 Isolierung von Mikroorganismen der Gattung <i>Methanosaeta</i> .....	78
II.1.11.4 Isolierung von Mikroorganismen der Gattung <i>Methanoculleus</i> .....	80
II.1.12 Fluoreszenzmikroskopie.....	81
II.2 Molekularbiologische Methoden.....	83
II.2.1 DNA-Extraktion aus BGA-Fermenterproben.....	83
II.2.2 DNA-Extraktion aus Flüssigkulturen .....	84
II.2.3 Polymerase-Kettenreaktion .....	85
II.2.3.1 Präparative Amplifikation von Fragmenten des 16S rRNA-Gens.....	85
II.2.3.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) von 16S rRNA-Genfragmenten..	87
II.2.3.3 Amplifikation und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens von Vertretern der Gattung <i>Methanobacterium</i> .....	91
II.2.4 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese .....	95
II.2.5 ARDRA-Analyse methanogener BGA-Fermenterpopulationen und Kulturen.....	100
II.2.6 Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	105
II.2.6.1 Herleitung von SONDENSEQUENZEN .....	105
II.2.6.2 Durchführung der Hybridisierungsexperimente .....	106
II.2.7 Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR).....	110
II.2.8 SAPD-abgeleitete Direkt-PCR zur Detektion von Eigenisolaten der Gattung <i>Methanobacterium</i> sp. in DNA-Extrakten aus Kulturen und BGA-Fermenterproben.	112

<b>Kapitel III - Ergebnisse.....</b>	<b>113</b>
III.1 DNA-Extraktion aus BGA-Fermentersubstrat und Flüssigkulturen .....	113
III.2 Biodiversität methanogener Archaea in ausgewählten NawaRo-Praxis-BGA .....	114
III.2.1 ARDRA von Fermentersubstrat der BGA Arenrath .....	114
III.2.2 ARDRAs von Fermentersubstraten der BGA Wallhalben.....	119
III.2.2.1 ARDRA der Klonbibliothek aus der Beprobung des Jahres 2010.....	119
III.2.2.2 ARDRA der Klonbibliothek aus der Beprobung des Jahres 2011.....	120
III.3 Untersuchung der Biodiversität methanogener Archaea mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) .....	125
III.3.1 Vergleich der archaeellen Population in Fermenter und Nachgärer .....	125
III.3.2 DGGE-Analyse von Fermenterproben mit eingeschränkter Gradientenspanne .....	126
III.3.2.1 Referenzgestützte DGGE-Analysen von BGA-Fermenterproben .....	127
III.4 Isolate methanogener Archaea aus landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen .....	132
III.4.1 Isolate von Mikroorganismen der Gattung <i>Methanobacterium</i> .....	132
III.4.2 Isolat <i>Methanosarcina mazei</i> NieKK.....	135
III.4.3 Isolat <i>Methanoculleus bourgensis</i> Mcu(1).....	137
III.4.4 Isolat <i>Methanosaeta concilii</i> Mst1.3 .....	138
III.5 Molekularbiologische Untersuchungen der Isolate methanogener Archaea.....	140
III.5.1 Restriktionsanalyse (ARDRA) von Isolaten methanogener Archaea .....	140
III.5.1.1 ARDRA unter Einsatz von <i>HaeII</i> und <i>HaeIII</i> .....	140
III.5.1.2 Etablierung eines modifizierten ARDRA-Systems zur Restriktion von Isolaten methanogener Archaea .....	144
III.5.1.3 Anwendung des modifizierten ARDRA-Systems zur Auswertung von Klon- bibliotheken methanogener Archaea aus BGA.....	147
III.5.2 Analyse von Isolaten methanogener Archaea mittels DGGE .....	148
III.5.3 Specifically amplified polymorphic DNA-Technik (SAPD) zur Gesamtgenom- Fingerabdruckanalyse von <i>Methanobacterium</i> sp.-Isolaten.....	154
III.5.3.1 T-Not SAPD-Muster von <i>Methanobacterium</i> sp. und Referenzstämmen.....	154
III.5.3.2 C-Not SAPD-Muster von <i>Methanobacterium</i> sp. und Referenzstämmen.....	156
III.5.3.3 A-Not SAPD-Muster von <i>Methanobacterium</i> sp. und Referenzstämmen.....	158
III.5.4 Nachweis methanogener Archaea der Gattung <i>Methanobacterium</i> mittels SAPD- abgeleiteter Fragmentamplifikation .....	160
III.5.5 Sequenzierung des 23S rRNA-Gens von Vertretern der Gattung <i>Methano-       bacterium</i> .....	165
III.5.6 Phylogenetische Einordnung von Eigenisolaten der Gattung <i>Methanobacterium</i> anhand von 23S rRNA-Gensequenzinformation.....	167



III.5.7 Nachweis methanogener Archaea der Gattung <i>Methanobacterium</i> mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	169
III.5.7.1 Entwicklung spezifischer Oligonukleotid-Sonden .....	169
III.5.7.2 Spezifitätstests zum Hybridisierungsverhalten entwickelter Oligonukleotid-Sonden .....	171
III.5.8 Quantifizierung methanogener Archaea in Fermentersubstrat von NawaRo-BGA....	179
<b>Kapitel IV - Diskussion .....</b>	<b>183</b>
IV.1 Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen .....	183
IV.2 Charakterisierung der Isolate methanogener Archaea aus landwirtschaftlichen NawaRo-BGA.....	191
IV.3 Phylogenie der Gattung <i>Methanobacterium</i> .....	195
IV.4 Isolat Mb1 - Vertreter einer neuen Art?.....	197
IV.5 Nachweissysteme für ausgewählte Organismen der Gattung <i>Methanobacterium</i> .....	199
<b>Kapitel V - Zusammenfassung .....</b>	<b>203</b>
<b>Kapitel VI - Ausblick .....</b>	<b>206</b>
<b>Kapitel VII - Literatur .....</b>	<b>208</b>
<b>Kapitel VIII - Anhang.....</b>	<b>I</b>
VIII.1 Nukleotidsequenzen des 23S rRNA-Gens methanogener Archaea .....	I
VIII.2 Zellzahlbestimmung mittels qPCR.....	X

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	Restriktionsanalyse amplifizierter rRNA-Genfragmente (engl.: <u>a</u> mplified <u>r</u> DNA <u>r</u> estriction <u>a</u> nalysis)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Größenordnung der relativen Fluoreszenzintensität (engl.: <u>a</u> rbitrary <u>u</u> nits)
BGA	Biogasanlage
BHKW	Blockheizkraftwerk
bp	Basenpaar(e)
B <sub>R</sub>	(Faul-)Raumbelastung
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld
CoB	Coenzym B (Mercaptoheptanoylthreoninphosphat)
CoM	Coenzym M (2-Mercaptoethansulfonsäure)
c <sub>t</sub>	qPCR Fluoreszenzintensitäts-Schwelle (engl.: <u>c</u> ycle <u>t</u> reshold)
DGGE	<u>D</u> enaturierende <u>G</u> radienten <u>G</u> elelektrophorese
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
e <sup>-</sup>	Elektron(en), Elektron(en)-
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Erneuerbare Energien
EEG	Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien ( <u>E</u> rneuerbare- <u>E</u> nergien- <u>G</u> esetz)
engl.	englisch, aus dem Englischen
F <sub>420</sub>	Coenzym F <sub>420</sub>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
FOS	flüchtige organische Substanzen
G	Guanin
G°	Gibbs-Energie unter Standard-Bedingungen
g	Einheit der Masse (Gramm)
GPS	Ganzpflanzensilage
h	Stunde(n) ( <u>h</u> ora)
H <sub>4</sub> MPT	Tetrahydromethanopterin
HRT	hydraulische Verweilzeit (engl.: <u>h</u> ydraulic <u>r</u> etention <u>t</u> ime)
IMW	Institut für Mikrobiologie & Weinforschung, Universität Mainz
kW <sub>el</sub>	Kilowatt elektrisch
kWh	Kilowattstunde
LUCA	Letzter universeller, gemeinsame Vorfahre (engl.: <u>l</u> ast <u>u</u> niversal <u>c</u> ommon <u>a</u> ncessor)
Mt	Megatonne

M	Molar (mol L <sup>-1</sup> )
m	Milli-, Präfix der Einheitengröße 10 <sup>-3</sup> (z.B. mL, mM, mg)
<i>Mb</i>	Gattung <i>Methanobacterium</i> (z.B. <i>Mb. formicicum</i> MF <sup>T</sup> )
MCR	Methyl-Coenzym M-Reduktase
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl.: <u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite)
<i>Mcu</i>	Gattung <i>Methanoculleus</i> (z.B. <i>Mcu. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup> )
Min	Minute
MFR	Methanofuran
<i>Mm</i>	Gattung <i>Methanomethylovorans</i> (z.B. <i>Mm. hollandica</i> DMS1 <sup>T</sup> )
mod	modifiziert(es)
<i>Msc</i>	Gattung <i>Methanosarcina</i> (z.B. <i>Msc. mazei</i> S-6 <sup>T</sup> )
<i>Msh</i>	Gattung <i>Methanosphaera</i> (z.B. <i>Msh. stadtmanae</i> MCB-3 <sup>T</sup> )
<i>Msp</i>	Gattung <i>Methanospirillum</i> (z.B. <i>Msp. hungatei</i> JF-1 <sup>T</sup> )
<i>Mst</i>	Gattung <i>Methanosaeta</i> (z.B. <i>Mst. concilii</i> FE)
N	Nano-, Präfix der Einheitengröße 10 <sup>-9</sup> (z.B. nM, ng)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NawaRo	nachwachsende Rohstoffe
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium(-Ion)
Nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte (Extinktion)
oTS	organische Trockensubstanz
P	Medium ohne Zusatz von Reaktorfiltrat (z.B: Medium 287P)
PBq	Peta-Becquerel (= 10 <sup>15</sup> s <sup>-1</sup> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pH <sub>2</sub>	Wasserstoffpartialdruck
PVPP K25	Polyvinylpyrrolidon K25
qPCR	(real-time) quantitative Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SAPD-PCR	<u>s</u> pecifically <u>a</u> mplified <u>p</u> olymorphic <u>D</u> NA-PCR
t	Tonne (1000 kg)
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAC	Summe anorganischer C-Verbindungen (engl.: <u>t</u> otal <u>a</u> norganic <u>c</u> arbon)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TS	Trockensubstanz
VFA	flüchtige Fettsäuren (engl.: <u>v</u> olatile <u>f</u> atty <u>a</u> cids)
vgl	vergleiche
x g	Einheit der Erdbeschleunigung
μ	Mikro-, Präfix der Einheitengröße 10 <sup>-6</sup> (z.B. μL, μM, μg)
z.B.	zum Beispiel
zzgl	zuzüglich



## Kapitel I – Einleitung

### I.1 Globale Energielage und Erneuerbare Energien in Deutschland

#### I.1.1 Fossile Energieträger und Verfügbarkeitsprognosen

Die Weltbevölkerung stieg von 6 Mrd. Menschen im Jahre 1999 zum Ende des Jahres 2011 auf über 7 Mrd. an (UNFPA, 2011). Seit dem Anbruch des Zeitalters der Industrialisierung wächst der globale Energieverbrauch dabei noch schneller als die Weltbevölkerung selbst. So stieg der pro-Kopf-Verbrauch innerhalb der letzten 130 Jahre auf das 16fache (BMU, 2011). Für die Deckung eines Großteils dieses globalen Energiebedarfs werden bis heute fossile Energieträger zur Energiegewinnung eingesetzt. Im Jahre 2006 bezog die Menschheit 87 % des Energiebedarfs aus Erdöl (34 %), Kohle (26 %), Erdgas (21 %) und Kernenergie (Uran und Thorium, 6 %) (BGR, 2009); 2009 entfielen bereits nur noch 81 % des wachsenden globalen Energiebedarfs auf diese Energieträger (REN21, 2011). Mit der Nutzung konventioneller Energierohstoffe und Kernbrennstoffe gehen jedoch Probleme einher, welche sich global auf Gesundheit, Wirtschaft, Gesellschaft und Umwelt auswirken. Ein herausragendes Problem besteht in der kurz- bis mittelfristigen Endlichkeit der weltweiten Lagerstätten fossiler Rohstoffe. Dabei wird zwischen den Begriffen **Reserven** und **Ressourcen** unterschieden. Reserven umfassen diejenigen Volumina fossiler Energieträger, welche nach gegenwärtigem Stand der Technik wirtschaftlich erschlossen und genutzt werden können. Lager volumina, welche bislang nur geophysikalisch prognostiziert, jedoch noch nicht nachgewiesen wurden oder deren Erschließung mit moderner Bergetechnik bislang unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht möglich ist, werden als Ressourcen bezeichnet. Unter Einberechnung des momentanen Energieverbrauchs lassen sich für Reserven und Ressourcen diejenigen Zeiträume berechnen, über welche sie der Menschheit noch zur Verfügung stehen. Diese sog. statische Reichweite (Abb. 1) ist definiert als der Quotient aus dem Volumen bekannter

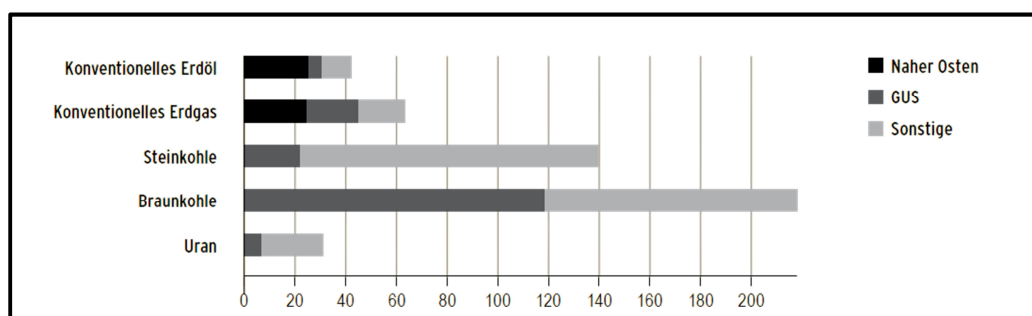
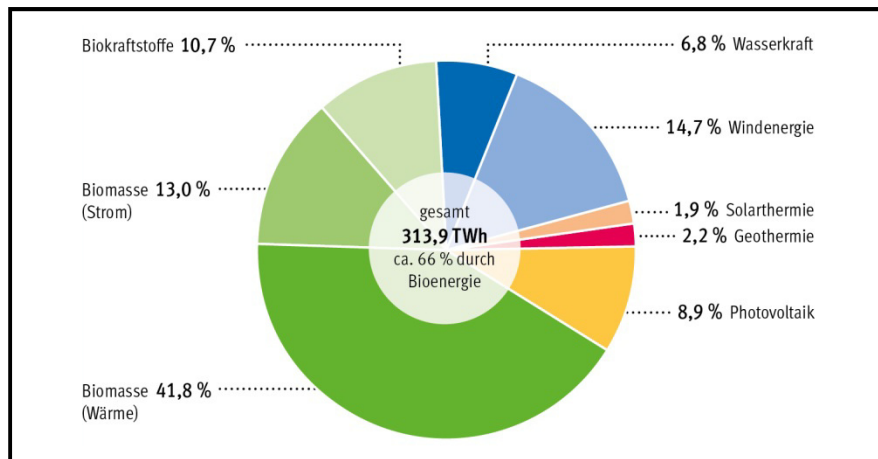


Abb. 1: Statische Reichweite weltweiter Energiereserven. Nach BGR 2007/BMU 2011.

Reserven und der aktuellen Förderproduktion. Da das Reservevolumen mit dem Aufkommen neuer Technologien oder neuer Explorationen schwankt, kann die statische Reserve nur einen gegenwärtigen Trend wiedergeben, die Aussage verbleibt „statisch“. Berechnungen der Globalreserven durch die Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR) ergaben unter diesen Bedingungen für den Erdölanteil eine statische Reichweite von 42 Jahren (unter Einbezug nichtkonventioneller Reserven wie Ölsande bis 58 Jahre); die Erdgas- und Uran-Reserven werden in 63 bzw. 30 Jahren erschöpft sein. Brisanz gewinnt die geringe statische Reichweite insbesondere von Erdöl dadurch, dass es trotz geringer Verfügbarkeit mittelfristig der wichtigste Energielieferant bleiben wird. Damit stellt Erdöl den einzigen Energierohstoff dar, für den die steigende Nachfrage in den kommenden Jahrzehnten nicht gedeckt werden kann. Durch den Endlichkeitscharakter ist schon vor dem Versiegen der Reserven mit einem Anstieg der Preise auf dem Weltmarkt zu rechnen, sodass ein ständig wachsender Ausgabenbetrag für die Sicherstellung der Energieversorgung aufgebracht werden muss. Je nach Studie ist der Zeitpunkt der maximal möglichen Ölförderungsrate („Peak Oil“) bereits überschritten oder liegt kurz bevor. Spätestens mit der Erschöpfung der Hälfte des globalen Erdölvorrats in 5 bis 20 Jahren ist mit einer Preissteigerung zu rechnen (BMU 2011).

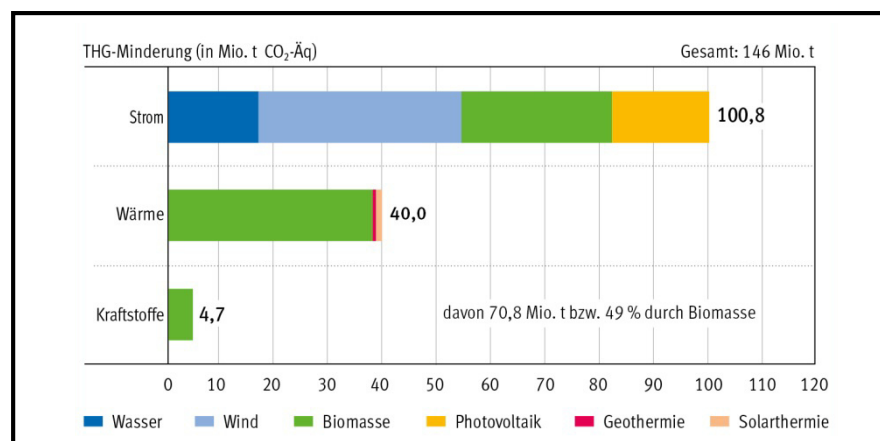
### **I.1.2 Erneuerbare Energien in Deutschland**

Als Folge der Reaktorhavarie im japanischen Atomkraftwerk Fukushima Daiichi vom März 2011 wurde in der Bundesrepublik Deutschland ein beschleunigter Ausstieg aus der Nutzung der Kernenergie beschlossen (**13. AtGÄndG**) und das Voranschreiten in der sog. Energiewende gesetzlich forciert. Mit Erlass der dritten Novelle des Gesetzes für den Vorrang Erneuerbarer Energien (Erneuerbare-Energien-Gesetz, EEG, **I.3.4**) wurde der Deckungsanteil des bundesdeutschen Stromverbrauchs aus Erneuerbaren Energien (EE) auf 35 % im Jahre 2020 und 80 % im Jahre 2050 festgelegt. Heute erzeugt Deutschland bereits 18 % seines Brutto-Stroms aus EE. Zur Bereitstellung der Gesamtenergie (Wärme + Strom + Kraftstoffe) wird dafür auf einen Energiemix aus Wasserkraft, Windenergie, Solarenergie, Geothermie und Biomasse zurückgegriffen (**Abb. 2**). Neben dem Aspekt des fehlenden Endlichkeitscharakteristikums ergeben sich weitere Vorteile regenerativer Energieträger insbesondere unter ökologischen und Nachhaltigkeits-Kriterien. In vielen Fällen kann bereits nach kurzen **energetischen Amortisationszeiten** (Herstellung, Betrieb und Entsorgung; je nach Technik zwischen 3 Monaten (Wind) und 5 Jahren (Photovoltaik)) CO<sub>2</sub>-neutral Strom erzeugt werden. Da die genutzten fossilen Rohstoffe in den sich energetisch nie amortisierenden Kraftwerken



**Abb. 3: Energiebereitstellung aus erneuerbaren Energien 2012 in Deutschland.** Quelle: Mediathek der Fachagentur nachwachsender Rohstoffe (FNR, 2013a) auf Basis der AGEE Stat.

eingespart werden können, reduziert sich die Emission von Treibhausgasen bei gleichbleibender Energiegewinnung. Im Jahr 2012 konnten auf diese Weise in Deutschland 146 Mio. t CO<sub>2</sub>-Äquivalente vermieden werden (Abb. 3). Durch die Nutzung der EE kann also direkt einer Verschärfung des Treibhauseffekt-Fortschritts entgegengewirkt werden. Des Weiteren können Altanlagen ökologisch unbedenklich rückgebaut und die Materialien dem Recycling zugeführt werden, ohne strahlende Altlasten oder weiträumige Tagebauhalden zu hinterlassen. Das im globalen Maßstab technisch nutzbare Potential EE wird selbst unter



**Abb. 2: Treibhausgas-Vermeidung durch die Nutzung erneuerbarer Energien in 2012.** Angaben für Deutschland. Quelle: Mediathek der Fachagentur nachwachsender Rohstoffe (FNR, 2013b) auf Basis der AGEE Stat.

strengen Umweltschutz- und Strukturrestriktionen sowie unter Berücksichtigung der technischen Wirkungsgrade auf das sechsfache des derzeitigen weltweiten Endenergiebedarfs geschätzt. Allein in Deutschland wird weniger als 10 % der langfristig durch EE bereitstellbaren Energiemenge genutzt, sodass auch hier große Ausbaupotentiale verbleiben (BMU, 2011). Im Spektrum der EE weist die Nutzung von Biogas aus Biomasse eine besondere Flexibilität auf. Sie ermöglicht mit der Produktion von Strom und Wärme über die Kraft-

Wärme-Kopplung (KWK) sowie der Verwendung als Erdgas-Substitut und Kraftstoff die parallele Erzeugung dreier Energieträger. Weiterhin lässt eine Zwischenspeicherung von Biogas oder daraus gewonnener Energieträger sowohl ein Abrufen zu späteren Spitzenlastzeiten zu als auch die temporäre Substitution ausgefallener Strom-/Wärmeerzeuger (Grundlastsicherung). Der flexiblen Nutzung von Biogas steht dabei eine Konstanz in seiner Erzeugung in Biogasanlagen gegenüber: Damit ist die Energieerzeugung aus Biogas weitgehend unabhängig von jahreszeitlichen oder klimatischen Schwankungen (FNR, 2011a). Aus ökologischen Gesichtspunkten ist Biogas u.a. deswegen interessant, da es die einzige Quelle von EE darstellt, welche eine negative Treibhausgas-Emissionsbilanz erreichen kann, wenn eine Kovergärung von Güllekomponenten erfolgt. Durch den direkten Eingang dieser Wirtschaftsdünger in den Biogas-Produktionsprozess werden lagerbedingte Methanemissionen in die Atmosphäre vermieden, was nach Verrechnung in negativen Summenemissionen resultiert.

## I.2 Biogas und die Mikrobiologie der Biogasbildung

### I.2.1 Zusammensetzung und Quellen von Biogas

Die Entstehung von Biogas ist ein natürlicher, in anaeroben Habitaten der Umwelt ubiquitär stattfindender Prozess. Er umfasst die mikrobiell katalysierte Abbaukaskade organischer Ausgangsstoffe in einem feuchten, O<sub>2</sub>-freien Milieu. Endpunkt des Abbaus stellt ein Gasgemisch dar, dessen Hauptkomponenten in wechselnden Anteilen von der energietragenden Komponente Methan (CH<sub>4</sub>, 50 - 75 %), von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>, 25 - 45 %) und Wasserdampf (H<sub>2</sub>O, 2 - 7 %) gebildet werden. Das Restgasvolumen teilt sich hier auf verschiedene gasförmige Bestandteile wie Ammoniak (NH<sub>3</sub>), Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) oder Spurengas-Mischungen auf (Tab. 1).

**Tab. 1: Volumenbezogene Konzentration von Biogaskomponenten.** Nach FNR, 2011a.

Komponente	Konzentration [% v/v]
CH <sub>4</sub>	50 – 75
CO <sub>2</sub>	25 – 40
H <sub>2</sub> O	2 – 7
O <sub>2</sub>	< 2
N <sub>2</sub>	< 2
NH <sub>3</sub>	< 1
H <sub>2</sub> S	< 1
Spurengase	< 2



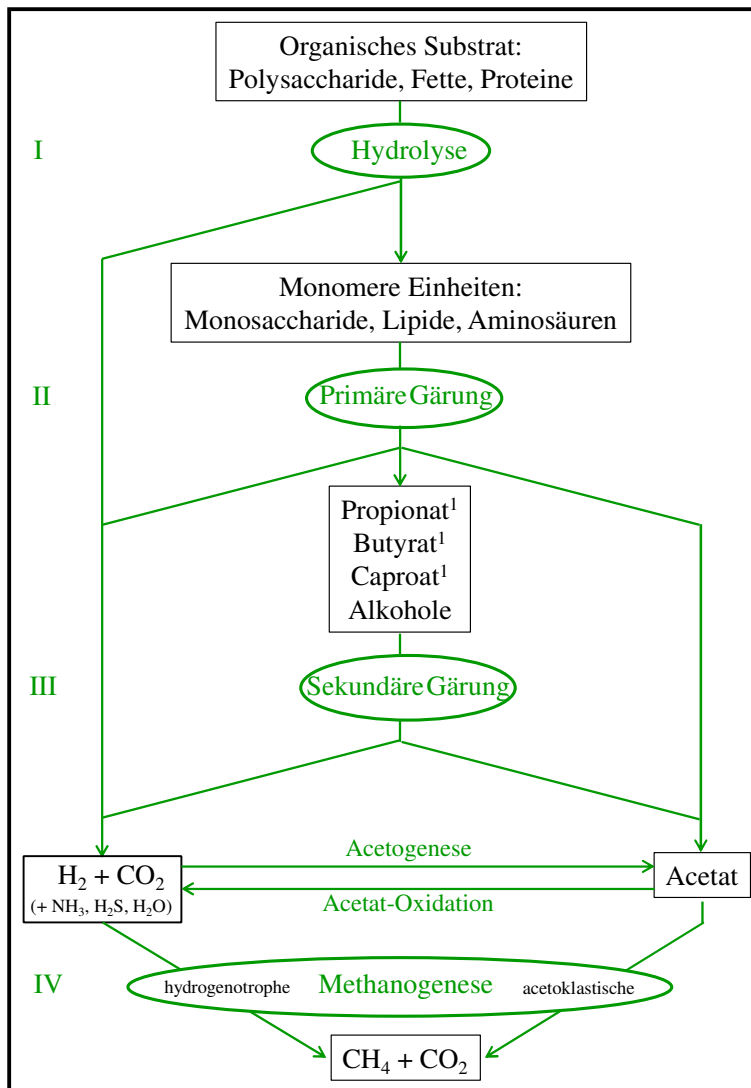
Aufgrund des biogenen Ursprungs wird das Gasgemisch als Biogas bezeichnet und damit abgegrenzt von Methanvorkommen, welche auf abiotische, thermochemische (Bildungs-) Reaktionen zurückzuführen sind. Beispiele dafür stellen unterseeische Lagerstätten reiner Methanhydrate in Clathratstruktur dar, welche in Tiefen von 400 – 1000 m in den Sedimenten der Ozeane vorliegen. Verschiedene Biotope und Habitate tragen zu der natürlichen Freisetzung von etwa  $535 \times 10^6 \text{ t CH}_4 \text{ a}^{-1}$  in die Atmosphäre bei. Die größten Anteile entfallen dabei auf Sümpfe, Marschlande und Moore ( $115 \times 10^6 \text{ t CH}_4 \text{ a}^{-1}$ , daher wird Biogas häufig auch als „Sumpfgas“ bezeichnet), gefolgt von Pansen wiederkäuender Tiere ( $85 \times 10^6 \text{ t CH}_4 \text{ a}^{-1}$ ) und Reisfeldern ( $60 \times 10^6 \text{ t CH}_4 \text{ a}^{-1}$ ) (**Reineke und Schlömann 2007**). Weitere Quellen stellen Deponien, offen gelagerte Gülle sowie Kläranlagen und die Gärkammer von Termiten dar.

### **I.2.2 Mikrobiologie der Biogasbildung**

Der mikrobielle Bildungsmechanismus von Methan umfasst das metabolische Zusammenspiel mehrerer Organismen-Gattungen während des Abbaus organischer Substrate zum  $\text{C}_1$ -Körper ( $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ ) reichen Biogas. Formalistisch durchläuft der strikt anaerobe Prozess vier Stadien, an denen jeweils distinkte Mikroorganismen-Gruppen beteiligt sind:

- I. **Hydrolyse** komplexer organischer Verbindungen zu monomeren Bestandteilen
- II. **Primäre Vergärung** der monomeren Produkte aus Phase I zu Acetat,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , Fettsäuren (**Acidogenese**) und Alkoholen
- III. **Sekundäre Vergärung** der primären Gärungsprodukte zu Acetat,  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$ . Parallel dazu stattfindende Synthese von Acetat aus  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  (**Acetogenese**)
- IV. Umsatz des in den Vorstufen generierten Acetats,  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  zum  $\text{CH}_4$  im Verlauf der **Methanogenese**

Im Folgenden soll auf die einzelnen Phasen des Prozesses näher eingegangen und der mikrobielle Kontext weiter beleuchtet werden. **Abb. 4** zeigt dazu ergänzend das Stoffflussschema.



**Abb. 4: Schema des Stoffflusses während der anaeroben Biogas-Bildung.** (I) In der Hydrolysephase wird das organische Substrat in seine monomeren Bestandteile gespalten sowie  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  („Hydrolysegas“) gebildet. Im Rahmen primärer Gärungsreaktionen (II) werden die monomeren Einheiten zu verschiedenen Fettsäuren, Alkoholen und kleineren Spaltprodukten umgesetzt. Die Fettsäuren und Alkohole werden letztlich durch sekundäre Gärer (III) komplett zu  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  und Acetat verstoffwechselt. Diese bilden die Substrate für die hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogenese (IV), resultierend in den Hauptbiogaskomponenten  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$ .

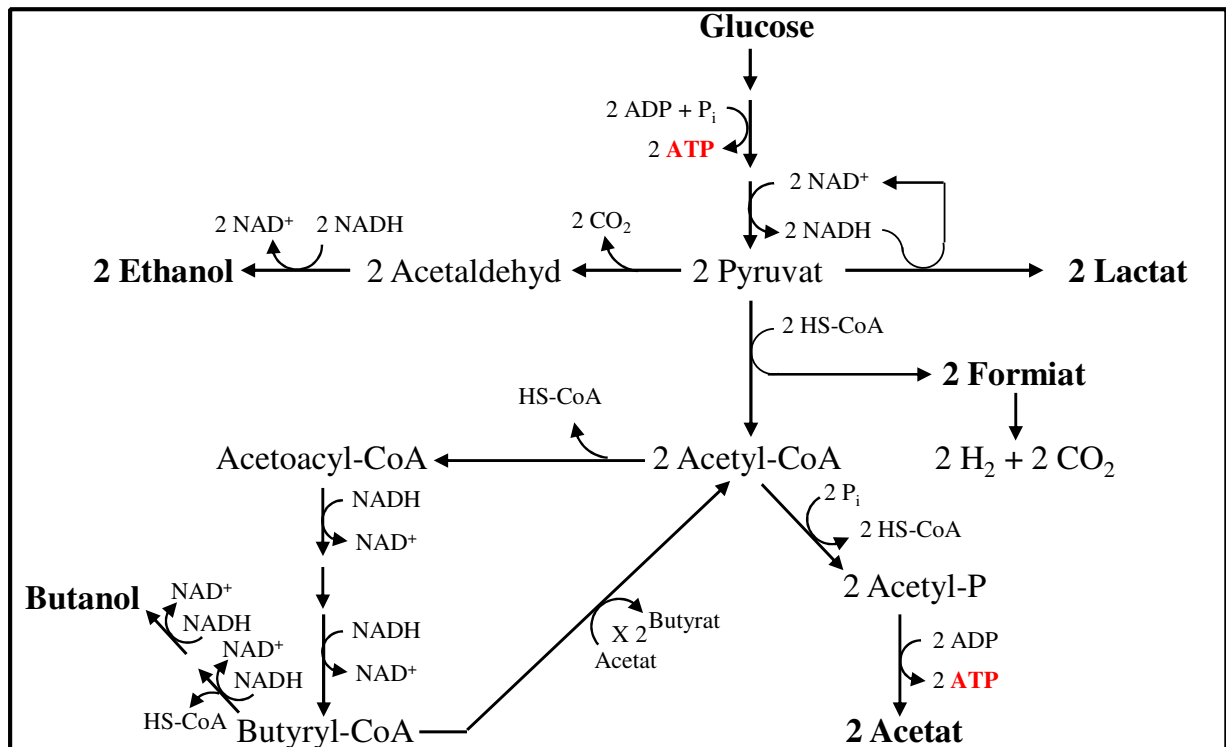
<sup>1</sup>Exemplarische Angabe wichtiger Fettsäuren als Produkte der primären Gärung ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Verändert nach **Reineke und Schlömann (2007); Bauer et al., (2009)**.

In der **hydrolytischen Phase** erfolgt die Spaltung der komplexen Ausgangssubstrate zunächst zu ihren oligo- und schlussendlich zu ihren monomeren Spaltprodukten. Dabei entstehen Mono- und Disaccharide, Aminosäuren, Lipide bzw. Fettsäuren und Glycerin sowie das sogenannte Hydrolysegas aus  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$ . Damit setzt sich die Hydrolyse im Verlauf des Abbaus organischer Substrate vom chemischen Hydrolysebegriff ab. Im Fall der chemischen Hydrolyse ergibt sich durch die Addition eines Wasserstoff- bzw. Hydroxylrestes an die beiden hervorgehenden Spaltprodukte nur selten eine Gasphase, während beim Umsatz organischer (Makro-)Moleküle mit Wasser im Verlauf der natürlichen Mineralisierung die Gasphase, monomere Spaltprodukte und organische Säuren die dominierenden Reaktionsprodukte darstellen. Insbesondere aufgrund der Entstehung einer Fraktion organischer Säuren in der Hydrolysephase lässt sich dieser formalistische Schritt in der Biogasanlagen-Praxis aus

Sicht der Produkte meist nicht klar definiert von der nachfolgenden Phase der primären Gärungen (auch als Acidogenese bezeichnet, s.u.) abgrenzen. Die hydrolytischen Spaltungsreaktionen werden dabei von Exoenzymen, welche durch Mikroorganismen sezerniert werden oder von an Zelloberflächen gebundenen Enzymkomplexen katalysiert. Darunter finden sich u.a. Amylasen,  $\beta$ -Glucosidasen, Lipasen und Proteasen. Dabei sind die monomeren Produkte in der Regel besser wasserlöslich als ihre Edukte, womit eine bessere Bioverfügbarkeit erreicht wird. Die exakte Zusammensetzung des Produktgemisches ist stark von der Substratzusammensetzung abhängig. Bei hohen Schwefel- oder Stickstoffgehalten kann es bereits hier zum Entstehen von  $H_2S$  und  $NH_3$  kommen. Die an der hydrolytischen Phase in anaeroben Habitaten beteiligten Mikroorganismen umfassen ein breites Spektrum fakultativ anaerober Bakteriengattungen wie *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acetovibrio* und *Sarcina*. Dabei wurden die lignocellulolytischen Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* (Gupta *et al.*, 2012; Lynd *et al.*, 2002) wiederholt auch in landwirtschaftlichen Biogasanlagen nachgewiesen (Krause *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2008). Bedingt durch den fließenden Übergang von Hydrolysephase und primärer Gärungsphase lassen sich viele der genannten Gattungen nicht spezifisch einer der beiden Phasen zuordnen. Die hydrolytische und die Methanogenese-Phase stellen im Biogas-Gewinnungsverfahren die langsamsten Schritte dar und bilden somit die Flaschenhalse des Gesamtprozesses.

Im Rahmen der **primären Gärung** werden die organischen Produkte der Hydrolysephase von den hydrolytisch-acidogenen Bakterien weiter umgesetzt. Dabei entstehen flüchtige organische Fettsäuren (volatile fatty acids, **VFA**) verschiedener Kohlenstoff-Kettenlänge bis hin zum Acetat sowie Alkohole, Formiat,  $H_2 + CO_2$ ,  $H_2S$  und  $NH_3$ . Wichtige VFAs stellen insbesondere Propionat, Butyrat, Valerat und Caproat dar. Im natürlichen Habitat des Kuhpansens werden diese VFAs resorbiert und dem Gleichgewicht entzogen, während sie in weiteren natürlichen Habitaten sowie in Biogasanlagen den syntrophen fettsäureoxidierenden Bakterien weiter zur Verfügung stehen und als Substrate dienen (s.u.). Welche VFAs in einer gegebenen Abbausituation entstehen ist abhängig von der Art der vorliegenden Edukte und des Wasserstoff-Partialdrucks ( $p_{H_2}$ ) bzw. pH-Werts. Bei niedrigem  $p_{H_2}$  ist eine Freisetzung von Elektronen aus Oxidations-Reaktionen als Wasserstoff möglich. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht der Gärprodukte auf Seiten der Bildung von Acetat,  $H_2$  und  $CO_2$ . Bei hohem  $p_{H_2}$  liegt der Elektronencarrier NAD(P) protonengesättigt als  $NAD(P)H + H^+$  vor. Elektronen aus dem oxidativen Substratabbau werden nun vermehrt auf die  $NAD(P)H + H^+$ -Form übertragen. Ein daraus resultierender Überschuss dieser Form kann nun über die

Propionat-Gärung, Butyratgärung, die Lactatgärung und die alkoholische Gärung abgebaut werden. Ein Abbau über die Acetatbildung aus Acetyl-CoA ist dagegen nicht möglich (**Abb. 5**). Als Folge verschiebt sich das Produktgleichgewicht auf Seiten der VFAs. Durch die Bildung und mögliche Akkumulation saurer Verbindungen kommt es in dieser Phase des Prozesses zum Absenken des pH-Wertes auf 4,5 - 6,3, weswegen sie häufig auch als „Versäuerungs-“ oder Acidogenese-Phase bezeichnet wird.



**Abb. 5: Primäre Gärverläufe und -produkte am Beispiel des Ausgangssubstrats Glucose.** Die ATP-generierenden Zwischenschritte sind rot markiert, die namensgebenden Endprodukte eines Gärverlaufes sind fett gedruckt.

Im Anschluss an die primären Gärungsreaktionen geht der Prozess in die Phase der **sekundären Gärungen** über. Die ablaufenden Reaktionen umfassen primär die Vergärung der VFAs zu den Endprodukten Acetat und H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> durch die syntrophen fettsäureoxidierenden Bakterien. Sie beinhalten zudem zwei gegenläufige Stoffwechselwege, welche beide Endprodukt-Konzentrationen miteinander verbinden: Zum einen die syntrophe Acetat-oxidation zu H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, zum anderen die Acetogenese aus H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> durch die homoacetogenen Bakterien. Ähnlich wie im Falle der hydrolytisch-acidogenen Bakterien entstammen die anaeroben fettsäureoxidierenden Bakterien einer Vielzahl von Gattungen wie *Pelotomaculum*, *Pelobacter*, *Propionibacter*, *Smithella*, *Sporotomaculum*, *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophus* und *Thermoanaerobium*. Auch unter den Clostridien und  $\delta$ -Proteobakterien existieren VFA-oxidierende Arten. Allen diesen Mikroorganismen gemein ist ein langsames Wachstum bei Nutzung dieses Substrats. Dies liegt darin begründet, dass die

Energetik des anaeroben Fettsäureabbaus als eigenständige Reaktionsfolge endergon, also energiezehrend ist. Thermodynamisch möglich wird ein exergoner Abbau erst dann, wenn der produzierte Wasserstoff direkt aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird (**Schink, 1997**). In den natürlichen Habitaten sowie in Biogasanlagen geschieht dies durch den Umsatz des  $H_2$  durch hydrogenotrophe Methanogene oder homoacetogene Bakterien (**Tab. 2**).

**Tab. 2: Änderung der Gibbs'schen freien Energie im Verlauf beispielhafter VFA- und Alkoholabbaureaktionen und in Kombination mit  $H_2$ -zehrenden Partnerreaktionen.** Angabe unter Standardbedingungen (Konzentration der Reaktanden  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $p = 1,013 \text{ bar}$ ,  $T = 25 \text{ °C}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Nach **Schink, 1997**.

Edukte	Produkte	$\Delta G^{0'}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
<b>Fettsäuren</b>		
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Butyrat, Wasser)	$\rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ (Acetat, Wasserstoff)	+ 48,30
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Propionat, Wasser)	$\rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 3 \text{H}_2$ (Acetat, Kohlendioxid, Wasserstoff)	+ 76,00
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Isovaleriat, Wasser)	$\rightarrow 3 \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2$ (Acetat, Wasserstoff)	+ 25,20
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ (Acetat, Wasser)	$\rightarrow 2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2$ (Kohlendioxid, Wasserstoff)	+ 94,90
<b>Primäre Alkohole</b>		
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ (Ethanol, Wasser)	$\rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$ (Acetat, Wasserstoff)	+ 9,60
<b><math>H_2</math>-verbrauchende Reaktionen</b>		
$4 \text{H}_2 + \text{CO}_2$ (Hydrogenotrophe Methanogenese)	$\rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Methan, Wasser)	- 131,00
$4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2$ (Acetogenese)	$\rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Acetat, Wasser)	- 94,90
<b>Beispielhafte Kombinationen</b>		
$2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Butyrat, Wasser)	$\rightarrow 5 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2$ (Methan, Kohlendioxid)	- 88,50
$2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Butyrat, Kohlendioxid, Wasser)	$\rightarrow 4 \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}^+ + \text{CH}_4$ (Acetat, Wasserstoff, Methan)	- 17,50
$4 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 4 \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$ (Propionat, Wasser)	$\rightarrow 7 \text{CH}_4 + 5 \text{CO}_2$ (Methan, Kohlendioxid)	- 62,25

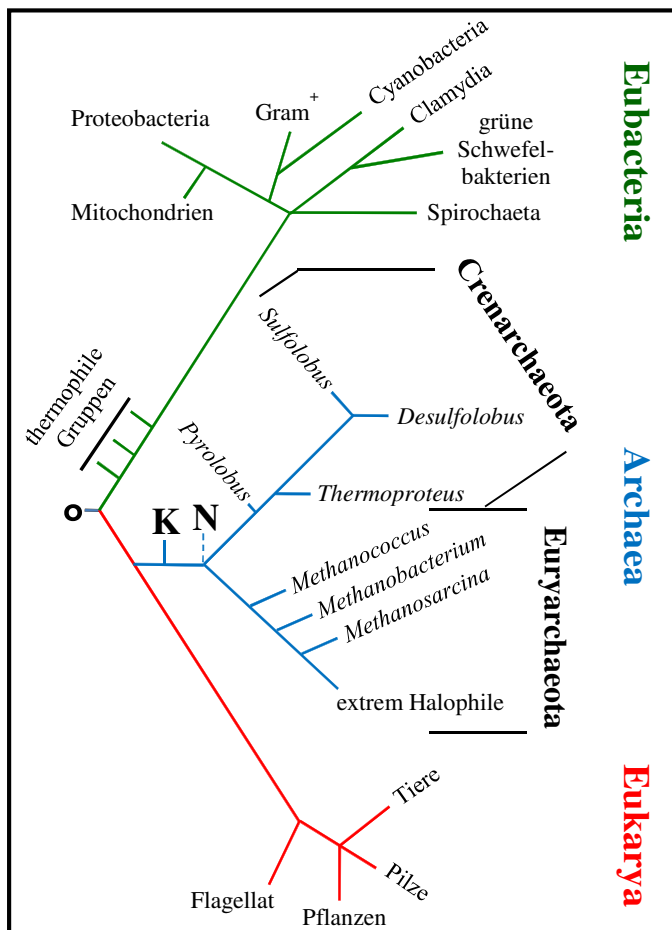
Unter diesen Umständen relativieren sich die in **Tabelle 2** dargestellten Änderungen der freien Energien. Da die Reaktionen in der Natur nicht unter Standardbedingungen ablaufen, ist die freie Energie, welche von den Mikroorganismen tatsächlich gespeichert werden kann, in der Regel deutlich geringer. Des Weiteren sind syntrophe Summenabbaureaktionen häufig sehr komplex und aus vielen Teilreaktionsschritten zusammengesetzt, an denen mehrere Partnerorganismengruppen beteiligt sein können. Damit ist die nutzbare freie Energie für jeden der Mikroorganismen nochmals geringer. Als kleinstes Maß nutzbarer freier Energie wird gegenwärtig -20 kJ angesehen, genug, um ein Proton über die Membran zu translozieren und 1/3 ATP zu generieren. Chemostatexperimente konnten bereits das Wachstum eines

propionatoxidierenden Konsortiums aus *Syntrophobacter fumaroxidans* und *Methanospirillum hungatei* unter solchen Niedrigenergie-Bedingungen zeigen (**Scholten und Conrad, 2000**). Ein Kriterium für den erfolgreichen Aufbau einer VFA-abbauenden Gemeinschaft besteht in der nahen räumlichen Assoziation von  $H_2$ -zehrenden methanogenen Archaea mit den syntrophen bakteriellen VFA-Oxidierern in Dimensionen weniger Mikrometer. Dies ist bedingt durch eine schlechte Löslichkeit von  $H_2$  in Wasser, welche den Interspezies-Elektronen-/Wasserstofftransfer über große Distanzen erschwert. In Granulae aus Laborfermentern mit synthetischem Medium konnte mittels einer Kombination aus der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungs-Technik (siehe **II.2.6**) mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie die Kolokalisation von Archaea und *Syntrophobacter* sp.-assoziierten Organismen beispielhaft gezeigt werden (**Sekiguchi et al., 1999**). Können sich die VFA-oxidierenden Bakterien in einem solchem Konsortium erfolgreich etablieren, so liegen nach Abschluss der sekundären Gärungen die beiden Ausgangssubstrate für den abschließenden Schritt in der Degradationskaskade bereit, dem Umsetzen von Acetat und  $H_2 + CO_2$  zu  $CH_4$  im Verlauf der **Methanogenese**. Die Fähigkeit zur Methanogenese wurde bislang nur bei Vertretern der Domäne Archaea nachgewiesen. Je nach Ausgangssubstrat wird in natürlich vorkommenden Abbaukaskaden die hydrogenotrophe ( $H_2 + CO_2$ , Formiat) von der acetoklastischen (Acetat) und der methylotropen Methanogenese (methylierte Verbindungen) unterschieden. Abgeleitet aus Forschungsergebnissen über Methangewinnung im Rahmen von Abwasserreinigungs- und Klärprozessen wurde auch für Biogasanlagen zunächst eine Dominanz des acetoklastischen Reaktionswegs postuliert. Neuere Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass entgegen dieser Annahme in landwirtschaftlichen Biogasanlagen, welche mit nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) betrieben werden, die hydrogenotrophe gegenüber der acetoklastischen Methanogenese überwiegt (**Bauer et al., 2008; Nettmann et al., 2010**). Die methylotrophe Reaktionsfolge scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung im Abbauprozess und ihren Anforderungen an das sie umgebende Habitat wird im Folgenden gesondert auf die (methanogenen) Archaea und die verschiedenen Methanogenese-Reaktionen eingegangen.

## I.2.3 Methanogene Archaea: Endpunkt des anaeroben Abbaus organischer Substrate

### I.2.3.1 Die Archaea als Domäne des Lebens

Mit ihrer Entdeckung in der zweiten Hälfte der 1970er Jahre legten die Mikroorganismen, welche später als „Archaea“ (griechisch: „urtümlich“) bezeichnet werden sollten, den Grundstein für eine Revolution der Taxonomie, Phylogenie und Evolutionsbiologie. Bis dahin wurden alle Lebewesen in einer dichotomen Taxonomie entweder der Domäne „Prokaryoten“ oder der Domäne „Eukaryoten“ zugeordnet. Mit dem Aufkommen der Archaea etablierte sich jedoch daneben eine zweite prokaryotische Domäne, was zu dem heute gültigen und auf 16S rRNA-Sequenzvergleichen basierenden taxonomischen Grundbau aus den drei Domänen „(Eu-)Bacteria“, „Archaea“ und „Eukarya“ führte (Fox *et al.*, 1980; Woese und Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990). Ausgehend vom letzten universellen und gemeinsamen Vorfahren LUCA (last universal common ancestor) positionieren sich die Archaea nahe der Verzweigungsstelle zu den Eubacteria und Eukarya (Abb. 6). Diese Nähe zu LUCA reflektiert dabei zum einen ihre langsame Evolution und Ähnlichkeit zu postulierten, nichtrezenten Vorläuferzellen, sowie ihre Anpassung an teils extreme Habitats, wie sie in ähnlicher Form auf einer frühen Erde geherrscht haben sollen. Zum anderen spiegelt sie ihre Zwischenposition in Bezug auf die stoffwechselphysiologische und transkriptionell-translationelle Enzymsausstattung wider.



**Abb. 6: Übersicht über die Domänen des Lebens.** Angegeben sind ausgewählte Gattungen der Archaea in ihrer relativen Position zu anderen taxonomischen Gruppen, O = Position des LUCA, K = Korarchaeota, N = Nanoarchaeota.

So ähneln die an den zentralen anabolen und katabolen Stoffwechselwegen beteiligten Proteine und Enzyme in ihrem Aufbau häufig mehr den bakteriellen als den eukaryotischen Gegenstücken (**Kletzin, 2007**). Proteine und Ribozyme, welche an der DNA-Replikation (**Grabowski und Kelman, 2003**) und Genexpression (**Bell und Jackson, 1998**) beteiligt sind, zeigen dagegen oftmals einen deutlich komplexeren Aufbau als in Bakterien und sind strukturell und funktionell mehr mit Makromolekülen aus den Eukarya verwandt. Taxonomisch wird die Domäne der Archaea in die drei Phyla **Euryarchaeota** (inklusive der Nanoarchaeota), **Crenarchaeota** und **Korarchaeota** unterteilt. Die Euryarchaeota und die Crenarchaeota bilden die beiden „Ur-Phyla“ der Archaea, welche bereits mit der Entdeckung der Domäne abgeleitet und akzeptiert wurden (**Woese et al., 1990**). Das Phylum Euryarchaeota umfasst mit drei (hyper-) thermophilen Ordnungen (Thermococcales, Thermoplasmatales und Archaeoglobales), den halophilen Archaeen und den Methanogenen eine große Anzahl physiologisch diverser Mikroorganismengruppen. Den Crenarchaeota wurden dagegen zunächst ausschließlich (hyper-)thermophile Archaea aus vulkanischen, sauren und schwefelhaltigen Habitaten (z.B. Sulfolobales und Desulfurococcales) zugeordnet. Die nachfolgende Entdeckung psychrophiler Crenarchaeota erweiterte jedoch die Biodiversität innerhalb dieses Phylums. Sowohl die Eury- als auch die Crenarchaeota beinhalten marine Vertreter (**Fuhrman et al., 1991; DeLong, 1992**). Die Korarchaeota wurden bislang nur kultivierungsunabhängig in einer heißen Quelle des Yellowstone Nationalparks mit ihrem einzigen Vertreter „*Candidatus Korarchaeum cryptofilum* OFP8“ nachgewiesen (**Barns et al., 1996**). Gegenwärtig wird zudem die Existenz von zwei weiteren Phyla postuliert und diskutiert: der **Thaumarchaeota** und der „**Aigarchaeota**“. Die in den Arbeiten von Fuhrman und DeLong gefundenen neuen marinen Archaea wurden zunächst als „Mesophile“ einer phylogenetischen Schwestergruppe der hyperthermophilen Crenarchaeota zugeordnet. Eine phylogenetische Analyse ribosomaler Proteine durch **Brochier-Armanet et al. (2008)** ergab jedoch ein separates Abzweigen vor der Aufteilung in Eury- und Crenarchaeota und begründete so das Aufkommen des neuen Phylums Thaumarchaeota. *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* (**Nunoura et al., 2011**) stellt den ersten Vertreter einer als „Aigarchaeota“ bezeichneten Gruppe dar. Das Genom dieses Mikroorganismus weist jedoch einige Gemeinsamkeiten mit Repräsentanten der Thaumarchaeota auf, sodass die Einordnung der „Aigarchaeota“ als eigenes Phylum oder als Teil tiefverzweigter Thaumarchaeota gegenwärtig noch strittig ist. Eine Übersicht über die phylogenetische Beziehung ausgewählter Phyla und Ordnungen innerhalb der Archaea bietet zusammenfassend **Abb. 7**.



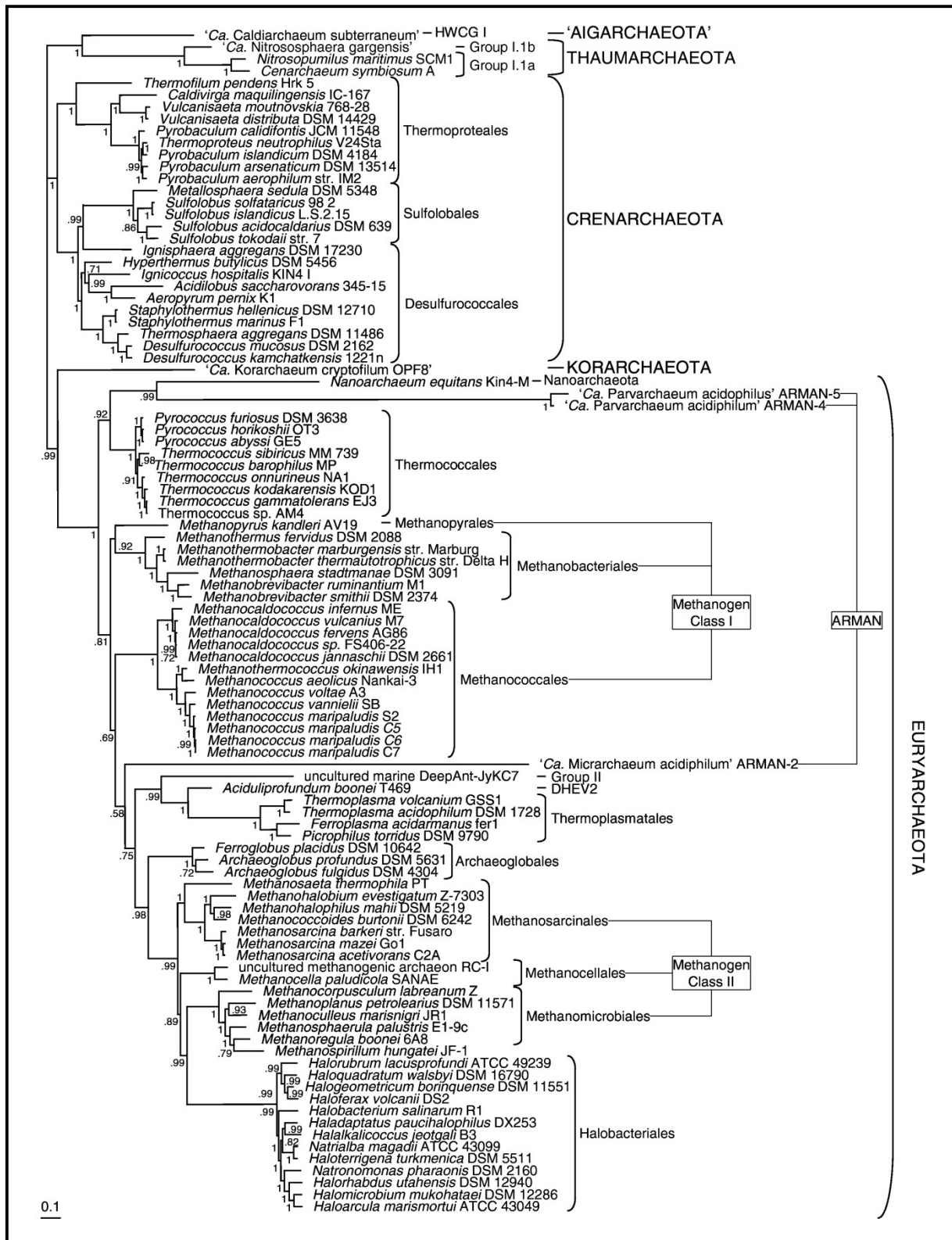


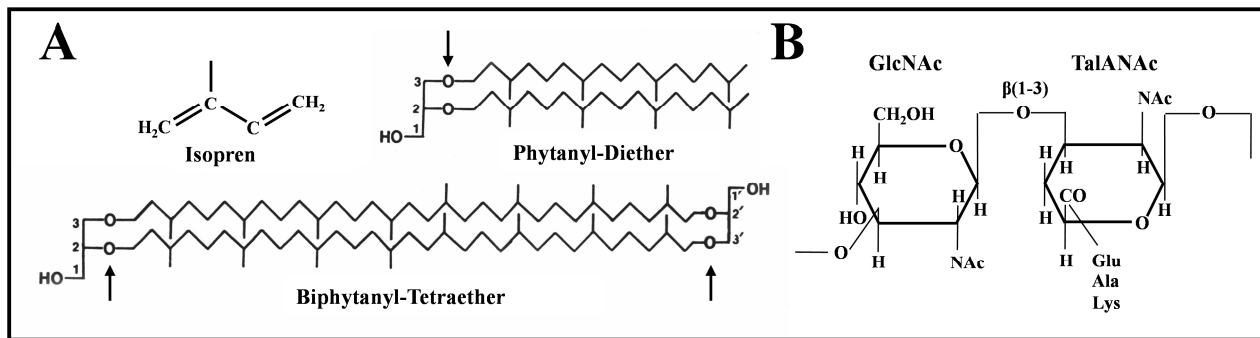
Abb. 7: Phylogenetisches Dendrogramm der Domäne Archaea. Berechnung des archaellen Stammbaums nach Brochier-Armanet *et al.*, (2011) basierend auf ribosomalen Proteinen aus 89 archaellen Gesamtgenom-Sequenzen. Für Einsicht in bioinformatische Parameter siehe Publikation.

Neben Gemeinsamkeiten mit den anderen Domänen (**Tab. 3**) weisen die Archaea auch Alleinstellungsmerkmale auf, welche sie von den Eukarya und Eubacteria abgrenzen. Diese

**Tab. 3: Auswahl gemeinsamer struktureller und molekularbiologischer Charakteristika von Archaea mit den Eubacteria bzw. Eukarya.** Nach König, 1988.

<b>Archaeelle Gemeinsamkeiten</b>	
<b>mit Eubacteria</b>	<b>mit Eukarya</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellgröße</li> <li>• Zirkuläres Genom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EF-2 enthält Diphtamid</li> <li>• Ribosomenproteine mit Sequenz-homologien</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 70S-Ribosomen</li> <li>• Flagellen filamentöser Protein-Helices</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tRNA<sup>Met</sup> nicht formyliert</li> <li>• DNA-abhängige RNA-Polymerase vom BAC-, AB'B''C oder (A+C) B'B''-Typ</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nichtmitotische Zellteilung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manche tRNA-Gene mit Introns</li> </ul>

umfassen den einzigartigen **Membranaufbau** auf Basis von Isoprenderivaten. Dadurch wird die Membran nicht durch veresterte Lipide, sondern von (Glycerin-)Phytanyldiethern und Biphythanyltetraethern gebildet (**Abb. 8A**). Durch die kovalente Verbindung zweier Phytanyldiether im Biphythanyltetraether kann es hier zur Ausbildung eines Membran-Monolayers kommen. Stereochemisch sind die Isoprenoidketten der Archaea an Position *sn-2* und *sn-3* des **Glycerin-1-Phosphats** über eine **Etherbindung** gebunden, während die Lipide der Eubacteria und Eukarya an Position *sn-1* und *sn-2* des Glycerin-3-Phosphats verestert sind (**Koga et al., 1993; Yoshinaga et al., 2012**). Ein weiteres einzigartiges Charakteristikum stellt die Fähigkeit mancher Archaea zur Katalyse der **Methanogenese** dar. Bislang ist kein Organismus aus den anderen Domänen beschrieben worden, welcher die Reaktionsfolge der Methanogenese betreiben kann. Des Weiteren weist das **Peptidoglycan** archaeeller Mikroorganismen eine einzigartige Struktur auf. Im Gegensatz zu den in Eubakterien konservierten Zellwand-Komponenten aus Peptidoglycan-Strängen, deren dimere Grundeinheit aus  $\beta(1-4)$ -glycosidisch verbundener *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) besteht, stellt das Peptidoglycan der Archaea (**Abb. 8B**) eine  $\beta(1-3)$ -glycosidische Verbindung von MurNAc und *N*-Acetyltalosaminuronsäure (TalANAc) dar (**König und Kandler, 1979; Visweswaran et al., 2011**). Vor der Entdeckung von Archaea in gemäßigten Habitaten wurde ihr Vorkommen vorübergehend als auf extreme Habitate beschränkt angesehen. Wurden Vertreter der Archaea zunächst nur in stark salzhaltigen, sauerstoffarmen, in heißen oder sauren/alkalischen Habitaten entdeckt, konnte ihre ubiquitäre Verbreitung auch in moderaten Lebensräumen gezeigt werden. Nach heutigem Kenntnisstand ergibt sich sogar



**Abb. 8: Chemische Struktur der Isopren-basierten Membrankomponenten der Archaea (A) und des Peptidoglykan-Disaccharids der Methanogenen (B).** Gezeigt sind das Isopren als Grundeinheit des Glycerin-Phytanyldiethers sowie dessen kovalent verknüpfte Tetraetherform. Pfeile weisen auf die Etherbindungen (A). GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin; TalANAc = *N*-Acetyltalosaminuronsäure (B).

ein gegenüber der Ausgangsvermutung umgekehrtes Bild über die Anwesenheit archaeeller Mikroorganismen in verschiedenen Ökosystemen: Die im Labor kultivierten und erforschten Vertreter der „Extremophilen“, wie methanogener, thermophiler oder halophiler Archaea, scheinen nur eine Minderheit im Vergleich zur global-ökologischen, gesamtarchaeellen Verteilung in Böden, Wäldern, Meeren und Seen zu repräsentieren (**Schleper *et al.*, 2005**).

### I.2.3.2 Methanogene Archaea

Methanogene Archaea bilden innerhalb der Euryarchaeota eine Gruppe strikt anaerober, chemolithotropher (im Fall der acetoklastischen bzw. methylotropher Methanogenen chemoorganotropher) Mikroorganismen. Taxonomisch werden die Methanogenen gegenwärtig in die folgenden fünf Ordnungen, jeweils benannt nach einer prominenten Gattung, eingeteilt: den Methanobacteriales, Methanococcales, Methanopyrales, Methanomicrobiales und den Methanosarcinales. Die Ordnung **Methanobacteriales** ist die umfangreichste aller methanogenen Ordnungen und umfasst mit Ausnahme der Gattung *Methanosphaera* sp. (*Msh.*) vorwiegend hydrogenotrophe Mikroorganismen. Seltener werden jedoch auch sekundäre Alkohole als e<sup>-</sup>-Donor genutzt. Es existieren autotrophe und acetatbasierte, heterotrophe Familien. Einige Spezies zeigen die Fähigkeit zur Fixierung molekularen Stickstoffs (N<sub>2</sub>). Zwei Familien mariner Archaea bilden die Ordnung **Methanococcales**. Die Energiegewinnung erfolgt hier stets über die hydrogenotrophe Methanogenese, wobei entweder H<sub>2</sub> und Formiat oder ausschließlich Formiat (nach Umsatz in H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>) als e<sup>-</sup>-Donoren genutzt werden. Die vorwiegend autotrophen Organismen weisen Protein-Zellwände auf. Im Allgemeinen dienen Ammonium und Sulfid als N- bzw. S-Quellen, manche Spezies können jedoch auch andere Verbindungen nutzen. Die heterotrophen **Methanomicrobiales** bilden vorwiegend Protein-Zellwände aus S-Layern. Ihren Stickstoff- und Kohlenstoffbedarf decken die Spezies dieser Ordnung häufig aus komplexen Flüssigphasen wie Klärschlamm oder Rumenflüssigkeit. Das gut untersuchte Modellarchaeon *Methanospirillum hungatei* zeigt

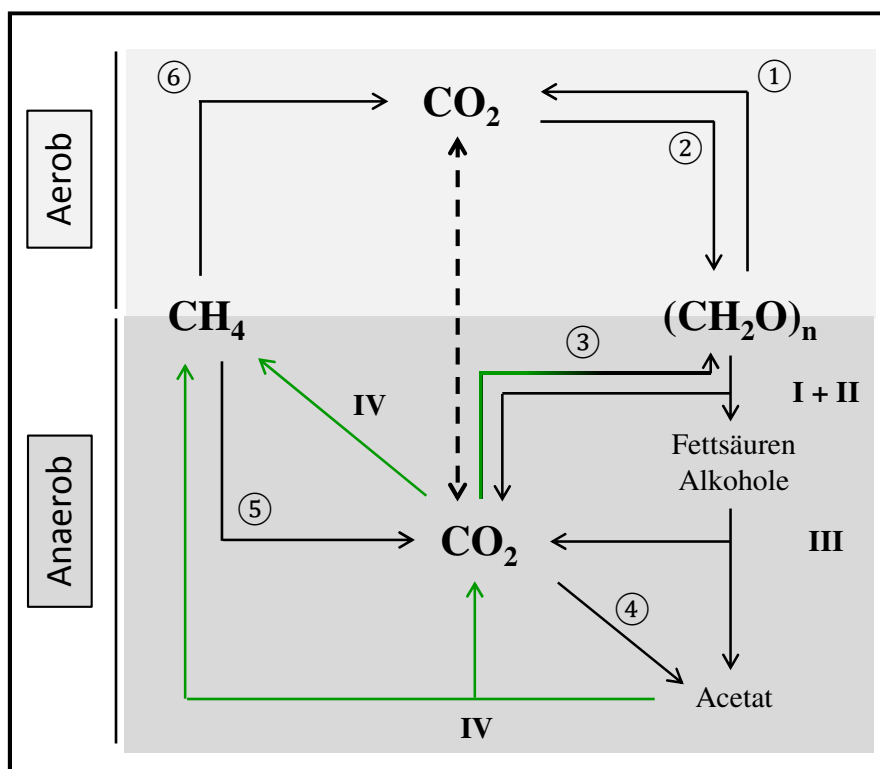
jedoch auch autotrophes Wachstum sowie die Fähigkeit zur N<sub>2</sub>-Fixierung. Ähnlich wie die Methanococcales setzt sich die Ordnung **Methanosarcinales** aus zwei Familien zusammen. Während die *Methanosarcinaceae* methylierte Verbindungen wie Mono-, Di- und Trimethylamine, Methanol und Methylsulfide für die Methanogenese einsetzen und meist auch zusätzlich die hydrogenotrophen und acetoklastischen Wege katalysieren können, sind Mitglieder der *Methanosaetaceae* obligat acetoklastisch. Neben Ammonium und Sulfid als N- bzw. S-Quelle benötigen manche Spezies Kofaktoren wie Biotin für das Wachstum. Ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber den methanogenen Archaea der anderen Ordnungen ist das Vorkommen von Cytochromen (**Jussofie und Gottschalk, 1986**) und des Menachinon-Analogons Methanophenazin (**Abken et al., 1998; Tietze et al. 2003**). Das breite Spektrum von Ausgangssubstraten für die Methanogenese insbesondere der Methanosarcinaceae hat zu einer ebenso weiten Verbreitung in den unterschiedlichsten anaeroben Habitaten geführt. Haufenförmige Aggregate von *Methanosarcina* sp. können von einer Heteropolysaccharid-Schicht umgeben sein, während *Methanosaeta* sp. eine filamentöse Scheide bildet, in welcher die stäbchenförmigen Zellen kettenförmig aufgereiht und durch sog. „Spacer Plugs“ getrennt vorliegen. Aus phylogenetischer Sicht entwickelten sich die Methanosarcinales als jüngste der fünf methanogenen Ordnungen, wohingegen die **Methanopyrales** als die am tiefsten verzweigte Ordnung angesehen wird. Sie wird gegenwärtig ausschließlich durch die Spezies *Methanopyrus kandleri* repräsentiert. Dieser hyperthermophile Mikroorganismus weist eine Zellwand aus Peptidoglycan und eine Umhüllung bislang unbekannter molekularer Zusammensetzung auf. Sein Habitat sind unterseeische, aufgeheizte Sedimente, in denen er ähnlich den anderen Methanogenen Ammonium und Sulfid als N-/S-Quelle benötigt. Einen zusammenfassenden Überblick über weitere physiologische Parameter der methanogenen Archaea bietet **Tabelle 4 (Ferry und Kastead, 2007)**. Phylogenetische Untersuchungen auf Basis ribosomaler Proteine methanogener Archaea legen nahe, dass die fünf beschriebenen Ordnungen nicht als monophyletisch aufzufassen sind. Vielmehr werden sie in zwei Klassen (nicht zu verwechseln mit dem taxonomischen Klassenbegriff!) von Methanogenen eingeteilt, sodass die Methanopyrales, Methanococcales und Methanobacteriales als **Klasse-I-Methanogene**, die Methanosarcinales und Methanomicrobiales als **Klasse-II-Methanogene** zusammengefasst werden (**Baptiste et al., 2005**). Im Stammbaum der Archaea werden beide Klassen der Methanogene durch nicht-methanogene Ordnungen wie den Archaeoglobales oder Thermoplasmatales getrennt (vgl. **Abb. 6B**). Eine in der Literatur diskutierte mögliche Erklärung stellt den Verlust der Fähigkeit dieser Ordnungen zur Methanogenese im Verlauf der Evolution dar (**Gribaldo und Brochier-Armanet, 2006**).

Die natürlichen Habitate der Methanogenen werden durch diejenigen Nischen und Ökosysteme gebildet, in denen ein anaerober Abbau organischer Substrate stattfindet. So konnten Vertreter der Methanogenen in anoxischen Habitaten wie marinen oder Frischwassersedimenten, in Abwasser- und Klärschlamm, gemäßigten bis heißen Böden, Reisfeldern, Tundren, Sumpf- und Marschländern, hydrothermalen Schloten sowie Deponien gefunden und z.T. aus ihnen isoliert werden. Der Verdauungstrakt herbivorer Säuger, die Gärkammer holzverzehrender Insekten sowie die Mundhöhle, der Darm und die Vagina des Menschen stellen weitere Lebensräume dar (**Belay et al., 1990; Horz und Conrads, 2010; Huber et al., 1982; Jones et al., 1983a; Jones et al., 1983b; König et al., 2009; Lü und Lu, 2012; Zeikus und Wolfe, 1972**). Trotz des Vorkommens von Vertretern methanogener Archaea wie *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter oralis* und *Methanosphaera stadtmanae* im menschlichen Körper verbleibt die Frage nach einer eventuellen Pathogenität strittig. Bislang ist für kein archaeelles Mitglied der humanen Mikroflora ein direktes Wirken als Pathogen nachgewiesen. Dennoch werden zwei Szenarien für potentiell krankheitsauslösende Mechanismen mit Beteiligung methanogener Archaea diskutiert. Zum einen könnte über den oben beschriebenen Interspezies-Wasserstofftransfer in syntrophen Gemeinschaften das Wachstum echter Pathogene im Körper gefördert werden. Zum anderen könnten methanogene Archaea eine aktive Rolle als Krankheitserreger spielen, indem sie die Methylierung von Schwermetallen und Metalloiden katalysieren. Solcherart methylierte Verbindungen sind deutlich flüchtiger und toxischer für den Menschen als ihre Ausgangsverbindungen (**Conway de Macario und Macario, 2009; Michalke et al., 2008**). Die mit der menschlichen Mukosa assoziierten Stämme von *Mbb. smithii* und *Msh. stadtmanae* sind jüngsten Untersuchungen zufolge in der Lage eine Antwort des Immunsystems auszulösen. Insbesondere für *Msh. stadtmanae* konnte dabei eine Stimulierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gezeigt werden (**Bang, 2013**).

**Tab. 4: Die fünf Ordnungen methanogener Archaea.** Zusammenfassende Übersicht aus **Balch et al., 1979; Ferry und Kastead, 2007; Veit et al., 2005** und dem Online-Katalog der Mikroorganismen der DSMZ (<http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html>, letzter Zugriff: 15.07.2012). Charakteristika ohne nachfolgend erwähnte Beispielorganismen gelten für den Großteil der Spezies der angegebenen Gattung. Ausnahmefälle innerhalb einer Ordnung sind in Klammern vermerkt.

Ordnung	Morphologie	Methanogenese	C-Quelle	Physiologisches Optimum	
				Temperatur	pH
Methanobacteriales	kurze bis filamentöse Stäbchen, bisweilen Kokkobacillen	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrogenotroph</li> <li>CH<sub>3</sub>OH + H<sub>2</sub> (<i>Methanospaera</i> sp.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>autotroph (<i>Methanobacterium</i> sp., <i>Methanothermobacter</i> sp.)</li> <li>Acetat (<i>Methanospaera</i> sp., <i>Methanobrevibacter</i> sp.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mesophil</li> <li>thermophil (<i>Methanothermobacter</i> sp.)</li> </ul>	Primär neutrophil (6,8 – 8,0); selten alkalophil
Methanococcales	unregelmäßig geformte Kokken	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrogenotroph</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>autotroph</li> <li>Acetat (<i>Methanococcus voltae</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mesophil</li> <li>(hyper-) thermophil (<i>Methanocaldococcus</i> sp.)</li> </ul>	neutrophil
Methanomicrobiales	kurze Stäbchen, unregelmäßige Kokken; wellenförmige Spirillen ( <i>Methanospirillum</i> sp.); scheibenförmige Zellen ( <i>Methanoplanus</i> sp.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrogenotroph (selten sekundäre Alkohole als e<sup>-</sup>-Donoren)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>heterotroph (Acetat, komplexe Quellen wie Pepton oder Rumenflüssigkeit)</li> <li>autotroph (<i>Methanospirillum hungatei</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mesophil</li> <li>thermophil (<i>Methanoculleus thermophilicus</i>)</li> <li>psychrophil (<i>Methanogenium frigidum</i>)</li> </ul>	neutrophil ( <i>Methanospirillum hungatei</i> : 6,6-7,4)
Methanosarcinales	kokkoide Formen und Zellpakete; Stäbchen in filamentösen Zellscheiden ( <i>Methanosaeta</i> sp.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrogenotroph</li> <li>methyloolithotroph</li> <li>acetoklastisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>autotroph</li> <li>heterotroph (Acetat, Methylamine)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mesophil</li> <li>thermophil (<i>Methanosarcina thermophila</i>)</li> <li>psychrophil (<i>Methanococcoides alaskense</i>)</li> </ul>	Primär neutrophil (6,5 – 7,5); selten alkalophil ( <i>Methanolobus talaris</i> ); acidophil ( <i>Methanosaeta thermophila</i> : pH <sub>opt</sub> = 6,0)
Methanopyrales	Stäbchen, solitär oder in Ketten	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrogenotroph</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>autotroph</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>hyperthermophil</li> </ul>	neutrophil, pH <sub>opt</sub> = 6,5

Die nahezu ubiquitäre Verbreitung und große Variabilität der Habitate methanogener Archaea steht im Kontrast zu einem eng umrissenen Substratspektrum, welches im Rahmen der Methanogenese zu  $\text{CH}_4$  umgesetzt wird (siehe **I.2.4**). Dennoch nehmen die Methanogenen im globalen Kohlenstoffkreislauf eine wichtige Rolle ein. Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass jährlich über alle Reaktionswege hinweg eine Gigatonne ( $10^{15}$  g) Methan gebildet und aus der Summe aller Habitate freigesetzt wird (**Thauer, 1998**). Dieses steht dann den aeroben Methanotrophen, wie *Methylobacter* sp., zur Verfügung oder wird über die syntrophen AOM-Reaktionen (anaerobe Oxidation von Methan) in  $\text{CO}_2$  überführt (**Abb. 9**, Reaktion ⑤ und ⑥). So tragen die methanogenen Archaea zur Rezyklisierung von

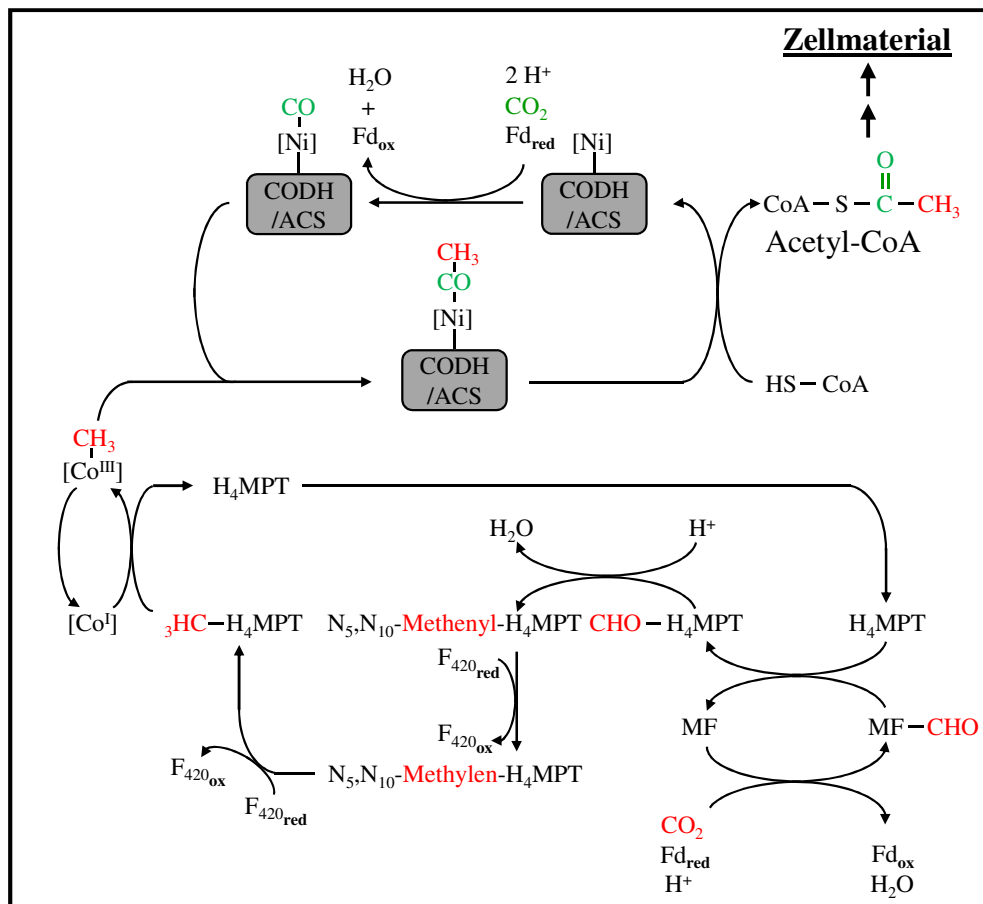


**Abb. 9: Schematische Darstellung des globalen Kohlenstoffkreislaufs.**  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  bezeichnet gebundenen Kohlenstoff in Form von Kohlenhydraten und Zellmasse. Grüne Pfeile markieren Reaktionen, an denen methanogene Archaea beteiligt sind. ① aerobe Atmung; ② Autotrophie (aerob); ③ Autotrophie (anaerob); ④ Acetogenese; ⑤ anaerobe Oxidation von Methan (AOM); ⑥ Methanotrophie. Römisch bezifferte Reaktionen entsprechend den in Kapitel **I.2.2** beschriebenen, anaeroben Abbauschritten organischen Materials (vgl. **Abb. 4**).

Kohlenstoff aus toter, organischer Materie bei. Ein direkter Abbau komplexer C-Quellen wie Kohlenhydrate und Fette zu  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  wurde bislang nicht beobachtet. Für eine Vielzahl an Gattungen methanogener Archaea ist jedoch das Vorkommen intrazellulärer Glucosevorkommen in Form des Speichermoleküls Glycogen gezeigt (**König et al., 1985; Murray und Zinder, 1987; Pellerin et al., 1987**). Da methanogene Mikroorganismen keine externen Hexosen aus dem umgebenden Medium aufnehmen können, erfolgt der Aufbau solcher Kohlenhydrate zur Synthese von Zellmaterial oder dem Aufbau des Glycogens ausschließlich

intrazellulär über die klassische Gluconeogenese. Der Abbau der aus dem Glycogen freigesetzten Glucose erfolgt dagegen über eine leicht modifizierte Variante des Embden-Meyerhof-Wegs der Glycolyse (**Danson *et al.*, 2007**).

Doch nicht nur an der Freisetzung gebundenen Kohlenstoffs als CH<sub>4</sub> sind Archaea beteiligt: Chemolithoautotrophe methanogene Archaea fixieren CO<sub>2</sub> hauptsächlich über den reduktiven **Acetyl-CoA-Weg** (= Wood-Ljungdahl Weg, **Ragsdale und Pierce, 2008; Abb. 8, ③**) und bilden z.B. zusammen mit den homoacetogenen Bakterien und vielen Sulfatreduzierern die **chemosynthetische** Organismengruppe. Einen Überblick über die Kohlenstoff-Fixierung mittels des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs bietet **Abb. 10**.



**Abb. 10: Der reduktive Acetyl-CoA-Weg der autotrophen CO<sub>2</sub>-Fixierung am Beispiel hydrogenotropher Archaea.** Je ein CO<sub>2</sub>-Molekül geht in der **Carboxyl-** bzw. **Methyl**gruppe des Acetyl-CoA auf. Obwohl die C<sub>1</sub>-Gruppenträger regeneriert werden, stellt der Acetyl-CoA-Weg keinen Zyklus dar. Im Fall der methanogenen Archaea entstammt die Methylgruppe des Acetyl-CoA aus den Reaktionsfolgen der Methanogenese. Fd<sub>red</sub>/Fd<sub>ox</sub> = reduziertes/oxidiertes Ferredoxin, MF = Methanofuran, H<sub>4</sub>MPT = Tetrahydromethanopterin, F<sub>420red</sub>/ F<sub>420ox</sub> = reduzierter/oxidiertes Kofaktor F<sub>420</sub>, [Co<sup>I</sup>]/ [Co<sup>III</sup>] = ein- bzw. dreiwertiges Corrinoidprotein, CODH/ACS = CO-Dehydrogenase/ Acetyl-CoA-Synthase, [Ni] = Nickel-Reaktionszentrum der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase. Verändert nach **Erb, 2011**.



In *Methanobacterium thermoautotrophicum* werden etwa 90 % des CO<sub>2</sub> zur Energieerzeugung eingesetzt, während auf die Fixierung für den Aufbau von Zellmasse nur rund 10 % entfallen. Alternativ zum reduktiven Acetyl-CoA-Weg der Kohlenstoff-Fixierung wurde in den Gattungen *Methanococcus* sp., *Methanobacterium* sp. und *Methanospirillum* sp. ein unvollständiger, **reduktiver Citratzyklus** gefunden (König, 1988). Die Fixierung erfolgt hier in der revers gegenüber der in dem oxidativen Citratzyklus stattfindenden Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA (Abb. 11):

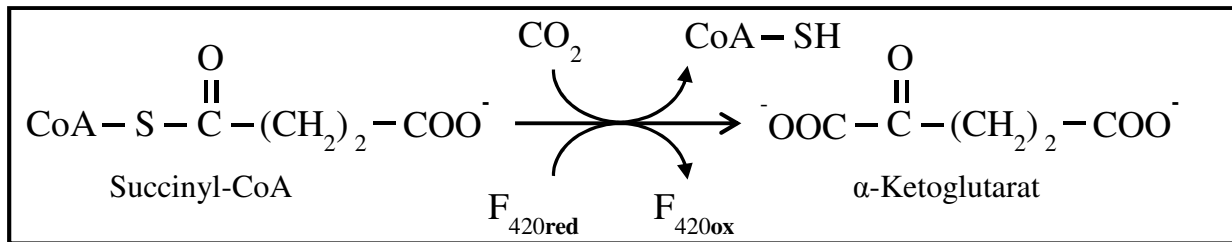


Abb. 11: CO<sub>2</sub>-fixierender Reaktionsschritt des unvollständigen, reduktiven Citratzyklus beispielhafter, methanogener Gattungen. Reaktion katalysiert durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat:Ferredoxin Oxidoreduktase. CoA-SH = Coenzym A, F<sub>420red</sub>/F<sub>420ox</sub> = reduzierter/oxidiertes Kofaktor F<sub>420</sub>.

Die einzige verbleibende Gruppe, die ebenso zur Fixierung von CO<sub>2</sub> befähigt ist, umfasst die **photosynthetischen Organismen**.

#### I.2.4 Die Methanogenese

Die abschließenden, terminalen Reaktionsfolgen im Verlaufe der anaeroben Degradation organischer Materie zu Methan werden als Methanogenese-Reaktionen bezeichnet. Die Fähigkeit zur Katalyse dieser Reaktionsschritte stellt ein Alleinstellungsmerkmal der methanogenen Archaea dar und wurde bislang exklusiv in diesen Mikroorganismen gezeigt. Die Methanogenese stellt für die methanogenen Archaea die einzige Möglichkeit zur Energiegewinnung und -konservierung dar und ist damit für das Überleben und die Proliferation der Zelle obligatorisch. Je nach Ausgangsverbindung werden drei Reaktionskaskaden unterschieden: Im Verlauf **der hydrogenotrophen Methanogenese** wird CO<sub>2</sub> mit Elektronen von H<sub>2</sub> oder Formiat (HCOO<sup>-</sup>) auf Methanniveau reduziert. Unter Standardbedingungen liefert dieser Reaktionsweg die größte Energieausbeute aller drei Reaktionswege (s.u.). Schätzungen zufolge wird ein Drittel des global produzierten, biologischen Methans durch die hydrogenotrophe Methanogenese produziert. Zwei Drittel der Methanproduktion entfällt auf die **acetoklastische Methanogenese**, deren Substrat Acetat darstellt (Ferry und Kstead, 2007). Neben diesen beiden dominanten Wegen existiert als dritter Weg die **methylo trope Methanogenese**. Obwohl der Umsatz der anderen beiden Wege auf globaler Ebene als größer eingeschätzt wird, kann über die methylo trope Methanogenese doch ein breiteres Substrat-

spektrum umgesetzt werden: Methylierte  $C_1$ -Verbindungen wie Methanol sowie Methylthiole und Mono-, Di-, Tri- und Tetramethylamine können auf diese Weise zur Energiegewinnung genutzt werden. Alle drei Wege der Methanogenese weisen im Abschluss einen zweiphasigen Energiestoffwechsel auf: In der **oxidativen Phase** wird, gekoppelt an die Bildung einer Methylgruppe und deren Freisetzung als Methan, der  $e^-$ -Überträger Coenzym B oxidiert und mit Coenzym M zu einem Heterodisulfid kovalent verbunden (**Abb. 13**). Der energiegewinnende Schritt in der **reduktiven Phase** besteht dann unabhängig vom Ausgangssubstrat in der Regeneration der freien Koenzyme (Reduzierung des CoB) und dem Aufbau eines Protonengradienten. Dieser wird durch eine membranständige ATPase zur Erzeugung von ATP durch oxidative Phosphorylierung genutzt. Damit handelt es sich bei der Methanogenese um eine Form der **Carbonatatmung**.

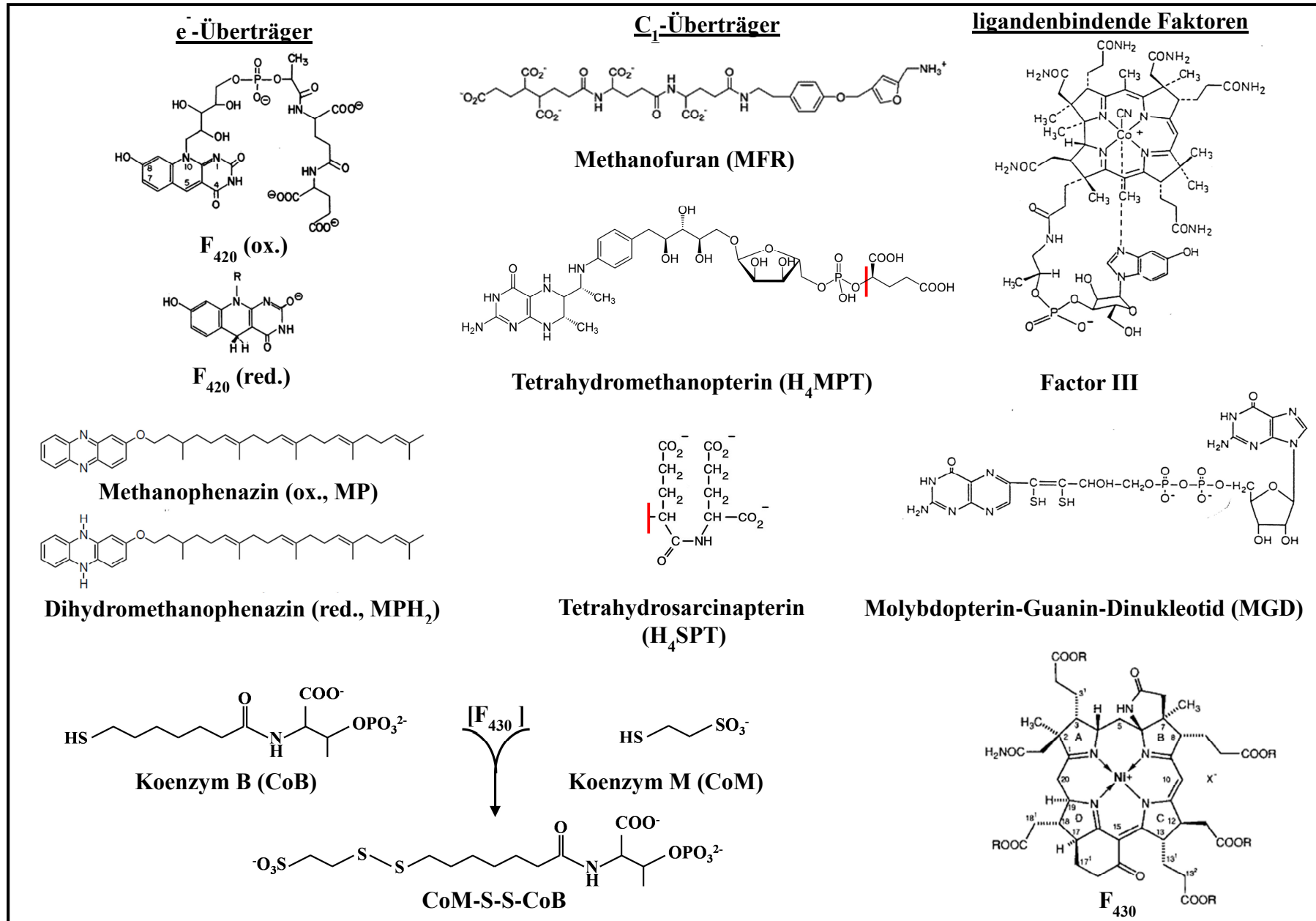
#### I.2.4.1 Kofaktoren der Methanogenese

An den verschiedenen Reaktionsfolgen der Methanogenese ist ein hochkonserviertes Set aus teils einzigartigen Koenzymen beteiligt. Funktionell werden hier die Gruppen der  $C_1$ - und der Elektronen-Überträger von Reaktionszentren bzw. unterschieden. Einen Überblick über die Kofaktoren mitsamt beispielhafter Enzymaktivitäten bietet **Tab. 5**, Strukturinformationen können **Abb. 12** entnommen werden.

**Tab. 5: Kofaktoren der Methanogenese und ihre Beteiligung an beispielhaften Enzymreaktionen**

Kofaktor	Enzym/Enzymaktivität	Art <sup>1</sup>
	Hydrogenasen;	
F <sub>420</sub>	N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Dehydrogenase; N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Reduktase	e <sup>-</sup>
F <sub>430</sub>	Methyl-CoM-Reduktase	Reaktionszentrum
Coenzym B	Methyl-CoM-Reduktase	e <sup>-</sup>
Coenzym M	Methyl-CoM-Reduktase	C <sub>1</sub>
	Hydrogenasen;	
Methanophenazin	Heterodisulfid-Reduktase	e <sup>-</sup>
	N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Dehydrogenase;	
H <sub>4</sub> MPT	N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Reduktase	C <sub>1</sub>
Methanofuran	Formyl-Methanofuran Dehydrogenase	C <sub>1</sub>
Factor III	Methyl-H <sub>4</sub> MPT:CoM-Methyltransferase	Reaktionszentrum
	Formiat-Dehydrogenase	
MGD	Formyl-Methanofuran Dehydrogenase	Mo

<sup>1</sup>Klassifikation als Elektronenüberträger (e<sup>-</sup>), C<sub>1</sub>-Überträger (C<sub>1</sub>), Reaktionszentrum oder Molybdän (Mo)-bindende Faktoren.



**Abb. 12: An den Methanogenese-Reaktionen beteiligte Koenzyme.** Tetrahydrosarcinapterin unterscheidet sich von Tetrahydromethanopterin durch die Kopfgruppe. Koenzym B wird am F<sub>430</sub>-Reaktionszentrum mit Koenzym M zum Heterodisulfid kondensiert. Ox. = oxidiert, red. = reduziert. Zusammengestellt und zum Teil verändert aus: Färber *et al.*, 1991; Ferry *et al.*, 1999; Grahame und deMoll 1996; Hand und Honek, 2005; Jones *et al.*, 1987; Tietze *et al.*, 2003.

Unter den Elektronen-Überträgern finden sich Moleküle, welche an verschiedenen Stellen der Methanogenese als **Redoxpartner** Elektronen in intermediäre Redoxreaktionen einspeisen oder als Reduktant in Oxidationsprozessen dienen. Sie selbst werden z.B. von Hydrogenasen reduziert und können, wie das Methanophenazin (s.u.), in zyklischen Redoxprozessen eine Funktion als Elektronentransporter zwischen Proteinkomplexen erfüllen.

Der Zwei-Elektronen-Überträger Koenzym **F<sub>420</sub>** ist ein Deazariboflavin-Derivat mit einem Standard-Redoxpotential  $E^{0'}$  von - 340 bis - 350 mV (**Jacobson und Walsh, 1984**). Im Rahmen der Charakterisierung des funktionellen Restes (**Cheeseman et al., 1972**) wurde die Chromophoreigenschaft von **F<sub>420</sub>** bekannt: So ist die typisch grün-blaue Fluoreszenz methanogener Archaea (siehe **II.1.5**) auf die namensgebenden Anregung der oxidierten Form von **F<sub>420</sub>** mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 420$  nm zurückzuführen. Die reduzierte Form absorbiert diese Wellenlänge nicht und kann daher nicht zur Fluoreszenz angeregt werden. **F<sub>420</sub>** wurde bislang in allen methanproduzierenden Archaea in variierenden Konzentrationen gefunden (**Dolfing und Mulder, 1985; Eirich et al., 1979**) und kommt daneben auch in der Biosynthese von Chlortetrazyklin durch *Streptomyces aureofaciens* (**McCormick und Morton, 1982**) vor. Kofaktor **F<sub>430</sub>** ist dagegen exklusiv in allen methanogenen Archaea vorhanden und bildet das Reaktionszentrum der Methyl-Coenzym M-Reduktase. Hier läuft die Reaktion der Koenzyme B und M zum Heterodisulfid unter Freisetzung von Methan ab. Im Verlauf der terminalen Methyl-CoM-Reduktasereaktion kann dabei das zentrale Nickelatom die drei Oxidationszustände I, II und III zyklisch durchlaufen. Elektronen für die Methylgruppenreduzierung werden vom Koenzym B (7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat, CoB, **Taylor und Wolfe, 1974**) übertragen und die Kondensierung an den Methylgruppenträger Koenzym M (2-Mercaptoethansulfonsäure, CoM) zum Heterodisulfid (**CoM-S-S-CoB**) wird katalysiert. Das bei den Methanosarcinaceae vorkommende **Methanophenazin** (MP) besitzt eine Isoprenoid-Seitenkette, mit der es in der archaeellen Membran verankert ist. Dort katalysiert es die zyklische Elektronenübertragung von Hydrogenasen zur Heterodisulfid-Reduktase

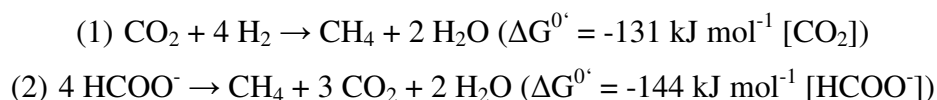
Auf Seiten der C<sub>1</sub>-Gruppenüberträger finden sich die Koenzyme **Methanofuran** (MFR) und **Tetrahydromethanopterin** (H<sub>4</sub>MPT) bzw. **Sarcinapterin** (SPT). Während MFR bislang nur in methanogenen Archaea sowie im sulfatreduzierenden *Archaeoglobus fulgidus* gefunden wurde (**DiMarco et al., 1990**), gibt es in Bezug auf H<sub>4</sub>MPT auch für methylotrophe Bakterien erste Hinweise auf H<sub>4</sub>MPT-vermittelte Enzymaktivitäten (**Chistoserdova et al., 1998**). MFR stellt den ersten C<sub>1</sub>-Akzeptor in der hydrogenotrophen Methanogenese dar und bildet mit CO<sub>2</sub> ein Substrat der Formyl-MF Dehydrogenase. Die Formylierung erfolgt dabei am Aminostickstoff des Furanrestes. Vom MFR aus wird der C<sub>1</sub>-Rest zunächst auf das Pterin-Derivat

H<sub>4</sub>MPT übertragen. Gebunden an den Stickstoff in N<sup>5</sup>- und N<sup>10</sup>-Position des H<sub>4</sub>MPT wird der Formylrest auf Methenyl-, Methylen- und schließlich auf Methyl-Niveau reduziert sowie anschließend auf CoM transferiert. Archaea der Familie Methanosarcinaceae besitzen mit H<sub>4</sub>SPT eine leicht modifizierte Form, bei der ein Glutamylrest mit dem Hydroxyglutaratrestes des H<sub>4</sub>MPT verestert ist.

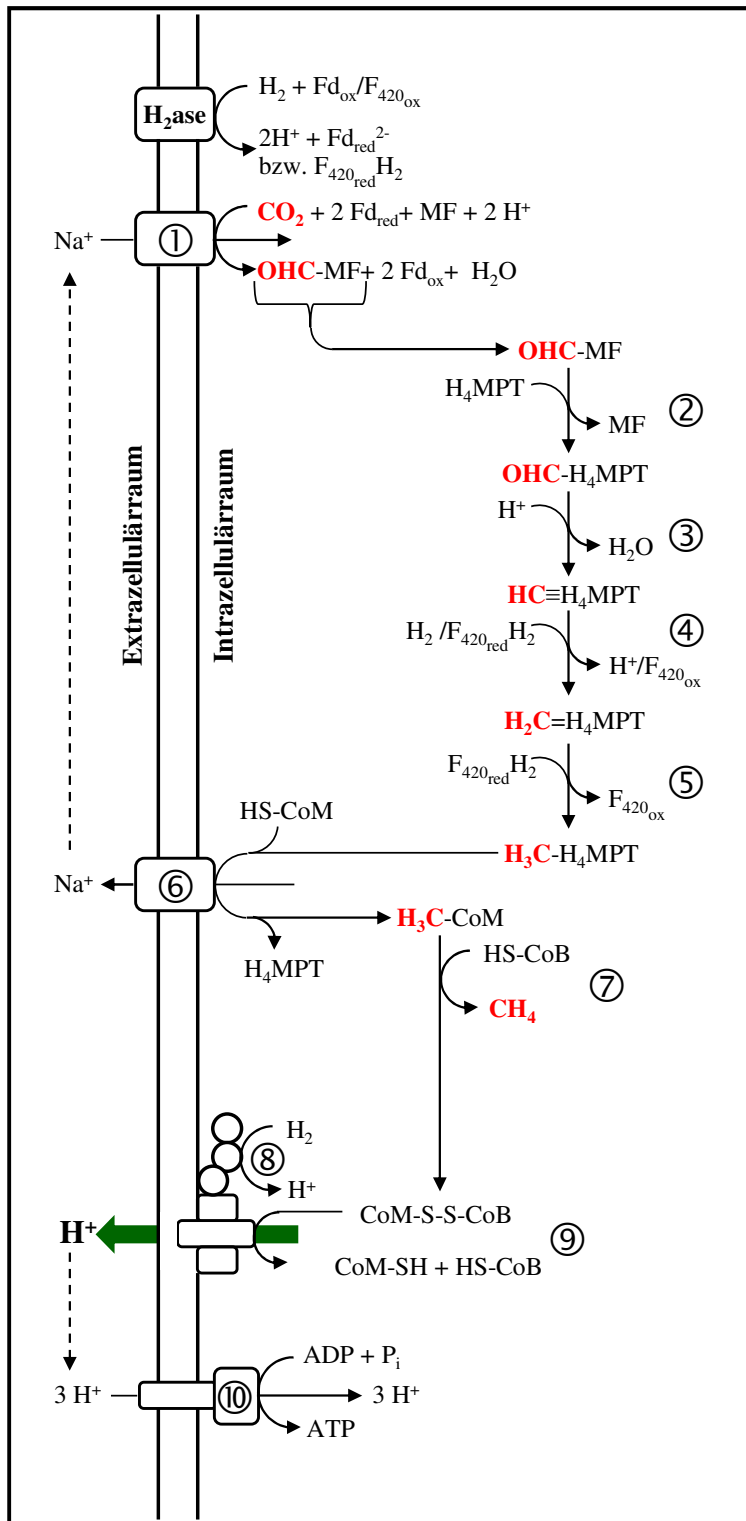
Das cobalthaltige 5-Hydroxybenzimidazolylcobamid (**Factor III**) wurde in Vertretern der Methanobacteriales, Methanomicrobiales und Methanosarcinales (**Scherer *et al.*, 1984; Stupperich und Kräutler, 1988**) als Kofaktor von Methyltransferasen gefunden (**Ferry, 1999**). Als Bestandteil der N<sup>5</sup>-Methyl-H<sub>4</sub>MPT:CoM-Methyltransferase durchläuft das Cobaltatom im zentralen Koordinationszentrum, ähnlich wie das Nickel-Atom der Methyl-CoM-Reduktase, die Oxidationszustände Co(I), Co(II) und Co(III). Im Gegensatz zum Ni(III)-gebundenen CH<sub>3</sub> ist der Co(III)-Zustand deutlich stabiler, sodass es nicht zu einer spontanen Protonolyse und Freisetzung der C<sub>1</sub>-Gruppe kommt, was einen gerichteten Transfer auf den Reaktionspartner CoM erlaubt. Das **Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid** (MGD) wurde auf archaeller Seite es sowohl als Kofaktor der Formiat-Dehydrogenase von *Methanobacterium formicicum* (**Johnson *et al.*, 1991**) als auch in der Formylmethanofuran-Dehydrogenase von *Methanosarcina barkeri* (**Karrash *et al.*, 1990**) gefunden.

#### I.2.4.2 Die hydrogenotrophe Reaktionsfolge der Methanogenese

Die Reaktionskaskade zur sukzessiven Reduzierung von CO<sub>2</sub> mittels H<sub>2</sub> (Reaktion 1) oder Formiat (Reaktion 2) als e<sup>-</sup>-Donatoren wird als hydrogenotrophe Methanogenese bezeichnet. Die schrittweisen Reaktionen resultieren dabei in folgenden Summenreaktionen (**Thauer, 1998**):



Im Vergleich zur acetoklastischen (**siehe I.2.4.3**) oder methylotrophen (**siehe I.2.4.4**) Reaktionsfolge stellt damit die hydrogenotrophe Methanogenese unter Standardbedingungen aus Sicht der frei werdenden Gibbs'schen Energie die energieeffizienteste Form der Methanogenese dar. Unter physiologischen Bedingungen kann, ähnlich wie für die VFA-oxidierenden Organismen (**siehe I.2.2**), die Energieausbeute deutlich geringer sein. Einen Überblick über die im Folgenden beschriebenen Teilreaktionen der sukzessiven CO<sub>2</sub>-Reduktion sowie der Energiekonservierung geben **Abb. 13** und **Tab. 6**.

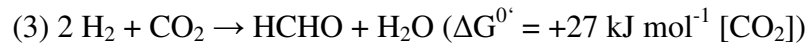


**Abb. 13: Teilreaktionen der hydrogenotrophen Methanogenese.** Angabe von Substraten und Produkten sowie der Lokalisation der katalysierenden Enzyme. Zu den Abkürzungen der Kofaktoren siehe I.2.4.1. Reduktionsstufen des C<sub>1</sub>-Restes sind rot, der Aufbau des Protonengradienten ist grün markiert.

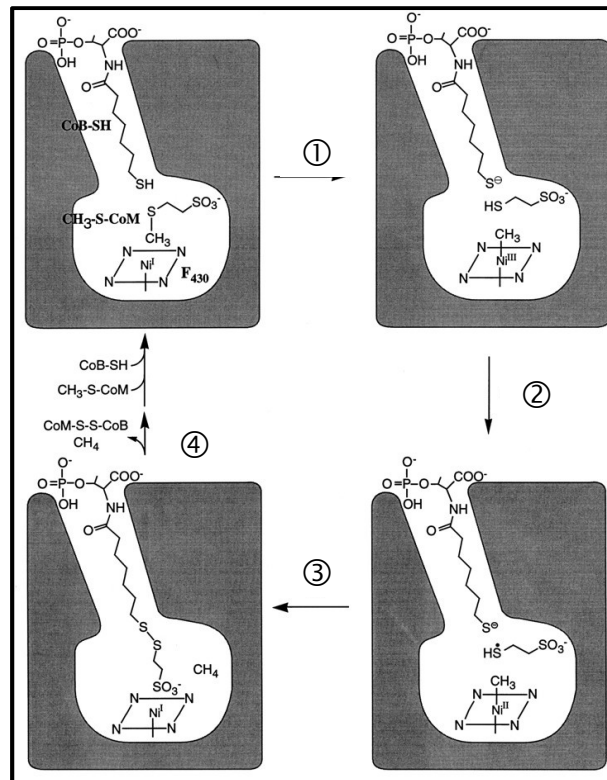
- H<sub>2</sub>ase** Ferredoxin- bzw. F<sub>420</sub>-reduzierende Hydrogenase,  
 ① Formyl-Methanofuran Dehydrogenase  
 ② Formyl-Methanofuran:H<sub>4</sub>MPT Formyltransferase  
 ③ Methenyl-H<sub>4</sub>MPT-Cyclohydrolase  
 ④ N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-H<sub>4</sub>MPT Dehydrogenase  
 ⑤ N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-H<sub>4</sub>MPT Reduktase  
 ⑥ N<sup>5</sup>-Methyl-H<sub>4</sub>MPT:CoM-Methyltransferase  
 ⑦ Methyl-CoM-Reduktase  
 ⑧ Nicht-F<sub>420</sub>-reduzierende Hydrogenase (MvhADG)  
 ⑨ Heterodisulfid-Reduktase (HdrABC)  
 ⑩ A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-Typ ATPase

Elektronen für die Reduzierung des CO<sub>2</sub> auf CH<sub>4</sub>-Niveau werden bereitgestellt durch zwei Formen membranständiger **Hydrogenasen**, die sich in dem zu reduzierenden Molekül unterscheiden: Einer ferredoxinabhängigen und einer F<sub>420</sub>-reduzierenden Hydrogenase. Unter Ausnutzung eines Na<sup>+</sup>-Gradienten bindet die MGD-haltige **Formyl-Methanofuran Dehydrogenase** (① in **Abb. 17**) in einem ersten Schritt CO<sub>2</sub> an ihren Kofaktor MF.

Die Ausnutzung des Gradienten wird nötig, da die Reduzierung von CO<sub>2</sub> auf Formyl-Niveau mit:



einen endergonen Prozess darstellt (**Kaesler und Schönheit, 1989**). Die Elektronen bezieht das membrangebundene Enzym aus reduziertem Ferredoxin. Die gebildete Formylgruppe wird durch die cytoplasmatische **Formyl-Methanofuran:H<sub>4</sub>MPT Formyltransferase** (②, Ftr) zunächst auf H<sub>4</sub>MPT übertragen. Hieran gebunden wird die C<sub>1</sub>-Gruppe durch die **Methenyl-H<sub>4</sub>MPT-Cyclohydrolase** (③, Mch) zur Methenylgruppe umgesetzt und erfährt dann eine zweifache, sukzessive Reduzierung: Zunächst auf Methylen-Niveau mittels der **N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-H<sub>4</sub>MPT Dehydrogenase** (④) und anschließend auf Methyl-Niveau. Für die Reduzierung auf Methylen-Ebene existieren zwei Isoenzyme, welche mit F<sub>420</sub> (Mtd) und molekularem Wasserstoff (Hmd) unterschiedliche e<sup>-</sup>-Donoren nutzen (**Hartmann et al., 1996; Mukhopadhyay et al., 1995**). Die abschließende Reduktion zur Methylgruppe durch die **N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-H<sub>4</sub>MPT Reduktase** (⑤, Mer) erfolgt dann wieder ausschließlich über Elektronen aus reduziertem F<sub>420</sub>. Die **N<sup>5</sup>-Methyl-H<sub>4</sub>MPT:CoM-Methyltransferase** (⑥, Mtr) stellt ein membranspannendes, auf der Zytoplasma-Seite den Factor III aufweisendes Heterooktamer dar (**Ferry, 1999**). Es katalysiert den Transfer des Methylrests von H<sub>4</sub>MPT auf Coenzym B. Dies ist assoziiert mit einem Na<sup>+</sup>-Efflux aus der Zelle (**Becher et al., 1992**). Der aufgebaute Na<sup>+</sup>-Gradient könnte durch die Formyl-Methanofuran Dehydrogenase zur Bindung von CO<sub>2</sub> genutzt werden. Der Na<sup>+</sup>-Transport wird vermutlich im Verlauf des Methylgruppentransfers durch eine Konformationsänderung induziert. Neben der Formyl-Methanofuran Dehydrogenase stellt die **Methyl-CoM Reduktase** (⑦, Mcr) das zweite Schlüsselenzym der hydrogenotrophen Methanogenese dar. Das F<sub>430</sub>-haltige α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>-Hexamer katalysiert die Oxidation von CoB und die damit einhergehende Bildung des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB unter Freisetzung von Methan. Die Kristallstruktur des Enzyms aus *Mb. thermoautotrophicum* zeigt einen Kanal von 30 Å Länge auf, in welchem CoB, CoM und der F<sub>430</sub>-Kofaktor des Enzyms räumlich nahe zueinander angeordnet sind (**Ermler et al., 1997**). Dieser von den Untereinheiten α, α', β und γ gebildete Kanal, an dessen Ende F<sub>430</sub> gebunden ist, stellt das Reaktionszentrum dar. Der postulierte Mechanismus (**Abb. 14**) setzt zunächst ein Betreten des Kanals durch methyliertes CoM und dessen räumliche Nähe zum F<sub>430</sub> voraus. In einem zweiten Schritt gelangt der aliphatische Teil von CoB in den Kanal und verschließt diesen. Ein nukleophiler Angriff des Ni(I) Zentralatoms auf das methylierte CoM führt zur Methylgruppenübertragung auf das F<sub>430</sub>-Zentral-Ni und resultiert in der H<sub>3</sub>C-Ni(III)-Form.



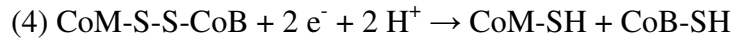
**Abb. 14: Postuliertes Modell der Methyl-CoM-Reduktasereaktion.** Abgebildet sind die zyklischen Reaktionsfolgen im zentralen Kanal des Enzyms. ① Einem nukleophilen Angriff des Ni(I) auf Methyl-CoM folgt die Bildung des H<sub>3</sub>C-Ni(III)-Zustands des F<sub>430</sub>. ② Ni(III) oxidiert CoM zum Thiyl-Radikal und nimmt die H<sub>3</sub>C-Ni(II)-Form an. ③ Spontane Protonolyse unter Freisetzung von Methan und Bildung des Heterodisulfids. ④ Das Heterodisulfid verlässt den Kanal, die unmethylierte Ni(I)-Form des Zentralatoms von F<sub>430</sub> ist regeneriert. Aus **Ermler et al., 1997**.

Die Schwefelgruppen von CoM und CoB kommen in van der Waal-Kontakt und H<sub>3</sub>C-Ni(III) oxidiert CoM zum Radikal H<sup>•</sup>S-CoM unter Annahme des H<sub>3</sub>C-Ni(II)-Zustandes. Ein von CoB stammendes H<sup>+</sup> führt zur spontanen Protonolyse der Methylgruppe als Methan. Es verbleibt S-CoB, welches vom H<sup>•</sup>S-CoM-Radikal angegriffen wird. Als Folge entsteht zunächst ein Heterodisulfidanion-Radikal CoM-S-S-CoB<sup>•-</sup>. Die Ni(II)-Gruppe oxidiert dieses dann zum CoM-S-S-CoB, wobei der Ausgangszustand Ni(I) wieder hergestellt wird. Der negativ geladene Sulfonat-Sauerstoff wird vom Zentralnickel abgestoßen und treibt das Heterodisulfid aus der Tasche heraus (**Ermler et al., 1997; Ferry und Kestead, 2007; Thauer, 1998**).

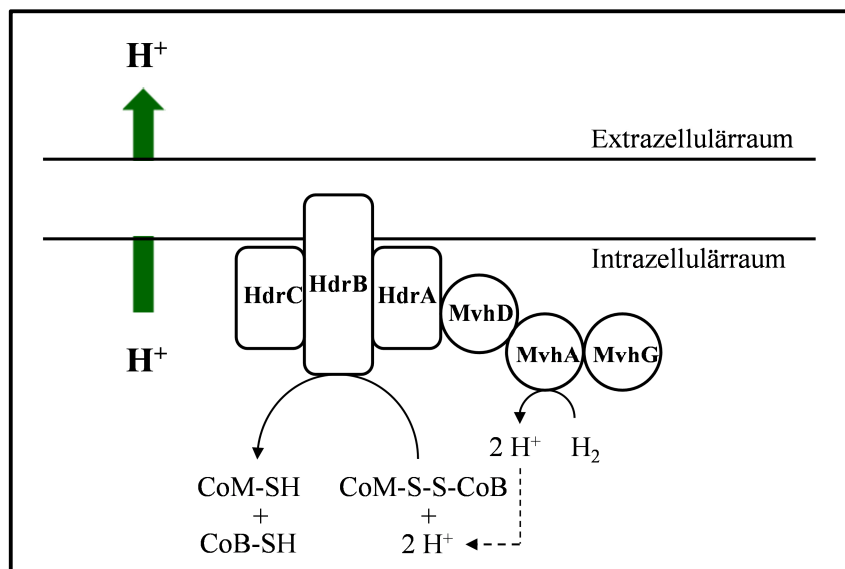
An den energiekonservierenden Schritten der reduktiven Phase der Methanogenese sind zwei Enzymkomplexe beteiligt. Zum einen das **Heterodisulfid Oxidoreduktase-System**, zum anderen eine A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-Typ ATPase. Die verschiedenen Arten der Methanogenese unterscheiden sich bezüglich Aufbau und Organisation des Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems, die katalysierte Reaktion zur Regeneration der Sulphydryl-Formen von CoM und CoB verbleibt jedoch weitgehend gleich. In obligat hydrogenotrophen Gattungen der Archaea existiert ein



H<sub>2</sub>:CoM-S-S-CoB Oxidoreduktase-System. Es besteht aus der trimeren **Nicht-F<sub>420</sub>-reduzierenden Hydrogenase MvhADG** (⊗) welche auf der zytoplasmatischen Seite an die **Heterodisulfid-Reduktase HdrABC** (⊙) gebunden ist. Die zur Reduktion des Heterodisulfids nach



nötigen Elektronen werden von der Hydrogenase aus Wasserstoff erzeugt und auf die Heterodisulfid-Reduktase übertragen, welche dann oben genannten Reduktionsprozess (4) katalysieren kann. Dazu wird eine Bindung der Hydrogenase an die H<sub>2</sub>:CoM-S-S-CoB Oxidoreduktase über Untereinheiten MvhD an HdrA vorhergesagt. Über die MvhD Untereinheit wird auch der e<sup>-</sup>-Transfer zur Heterodisulfid-Reduktase vermutet. Um an der chemiosmotischen Energiegewinnung beteiligt zu sein, muss für den gesamten HdrABC/MvhAGD-Komplex eine membranernahe Lokalisation gewährleistet sein. Für HdrB ist eine membranspannende Domäne vorhergesagt worden (**Hedderich et al., 1994**), die als Membrananker dienen könnte. Dadurch verbliebe der gesamte Komplex, im Gegensatz zur Heterodisulfid-Reduktase der acetoklastischen Methanogenese, welche die komplett in die Membran integrierte Untereinheit HdrE aufweist, nur lose membranassoziiert (**Abb. 15**).



**Abb. 15: Organisationsmodell des Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems hydrogenotropher Archaea.** Dargestellt sind die Nicht-F<sub>420</sub>-reduzierende Hydrogenase MvhADG sowie die H<sub>2</sub>: CoM-S-S-CoB Heterodisulfid-Reduktase HdrABC. Auf Basis von **Ferry und Kastead, 2007**.

Im Gegensatz zur Heterodisulfid-Reduktase nicht obligat hydrogenotropher Archaea enthält das beschriebene System eine **Cytochrom-freie Hydrogenase** (siehe **I.2.4.3, I.2.4.4**). Endpunkt der reduktiven Phase bildet die klassische Nutzung des vom Heterodisulfid

Oxidoreduktase-Systems aufgebauten Protonengradienten zur elektrochemischen Bildung von ATP aus ADP + P<sub>i</sub> durch eine **A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATPase** (Ⓢ).

**Tabelle 6** fasst die Teilreaktionen der hydrogenotrophen Methanogenese und deren katalysierende Enzyme in einer Übersicht zusammen.

**Tab. 6: Überblick über die Teilreaktionen der hydrogenotrophen Methanogenese und der daran beteiligten Enzyme.** Nach Ferry und Kastead, 2007; Thauer, 1998.

Enzym	Reaktion	$\Delta G^{0'}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
<b>C<sub>1</sub> umsetzende/ e<sup>-</sup>-zehrende Enzyme</b>		
Formyl-Methanofuran Dehydrogenase	$\text{CO}_2 + \text{MFR} + 2 \text{Fd}_{\text{red}} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Formyl-MFR} + 2 \text{Fd}_{\text{ox}} + \text{H}_2\text{O}$	+ 16/ + 27 <sup>1</sup>
Formyl-Methanofuran:H <sub>4</sub> MPT Formyltransferase	$\text{Formyl-MFR} + \text{H}_4\text{MPT} \rightarrow \text{N}^5\text{-Formyl-H}_4\text{MPT} + \text{MFR}$	- 4,4
Methenyl-H <sub>4</sub> MPT Cyclohydrolase	$\text{N}^5\text{-Formyl-H}_4\text{MPT} + \text{H}^+ \rightarrow \text{N}^5, \text{N}^{10}\text{-Methenyl-H}_4\text{MPT} + \text{H}_2\text{O}$	- 4,6
F <sub>420</sub> -abhängige N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Dehydrogenase	$\text{N}^5, \text{N}^{10}\text{-Methenyl-H}_4\text{MPT} + \text{F}_{420\text{red}} \rightarrow \text{N}^5, \text{N}^{10}\text{-Methylen-H}_4\text{MPT} + \text{F}_{420\text{ox}} + \text{H}^+$	+ 5,5
H <sub>2</sub> -abhängige N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Dehydrogenase	$\text{N}^5, \text{N}^{10}\text{-Methenyl-H}_4\text{MPT} + \text{H}_2 \rightarrow \text{N}^5, \text{N}^{10}\text{-Methylen-H}_4\text{MPT} + \text{H}^+$	- 5,5
N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylen-H <sub>4</sub> MPT Reduktase	$\text{N}^5, \text{N}^{10}\text{-Methylen-H}_4\text{MPT} + \text{F}_{420\text{red}} \rightarrow \text{N}^5\text{-Methyl-H}_4\text{MPT} + \text{F}_{420\text{ox}}$	- 6,2
N <sup>5</sup> -Methyl-H <sub>4</sub> MPT:CoM Methyltransferase	$\text{N}^5\text{-Methyl-H}_4\text{MPT} + \text{CoM-SH} \rightarrow \text{Methyl-CoM-SH} + \text{H}_4\text{MPT}$	- 30,0
Methyl-CoM Reduktase	$\text{Methyl-CoM-SH} + \text{CoB-SH} \rightarrow \text{CoM-S-S-CoB} + \text{CH}_4$	- 45,0
Heterodisulfid-Reduktase	$\text{CoM-S-S-CoB} + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{CoM-SH} + \text{CoB-SH}$	- 40,0
<b>Hydrogenasen (e<sup>-</sup>-generierend)</b>		
Ferredoxin-reduzierend	$\text{H}_2 + 2 \text{Fd}_{\text{ox}} \rightarrow 2 \text{Fd}_{\text{red}} + 2 \text{H}^+$	N/A <sup>2</sup>
F <sub>420</sub> -reduzierend	A) $2 \text{H}_2 + \text{F}_{420\text{ox}} \rightarrow 2 \text{F}_{420\text{red}}$ B) $\text{HCOOH} + \text{F}_{420\text{ox}} \rightarrow \text{F}_{420\text{red}} + \text{CO}_2$	- 11,0 <sup>3</sup> - 16,0 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>+ 16,0 kJ mol<sup>-1</sup> nach Thauer 1998, + 27,0 kJ mol<sup>-1</sup> nach Kaesler und Schönheit, 1989

<sup>2</sup>keine Angabe

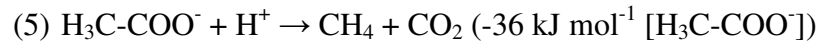
<sup>3</sup>Nach Thauer *et al.*, 1993

<sup>4</sup>Nach Müller *et al.*, 1993

Die Methyl-CoM Reduktasereaktion der oxidativen Phase sowie die Heterodisulfid-Reduktase-Reaktion zzgl. der ATPase-Aktivität der reduktiven Phase verlaufen in allen drei Wegen der Methanogenese ähnlich. Daher fokussiert sich die Beschreibung der acetoklastischen und methylotrophen Methanogenese auf diejenigen Reaktionen, Enzyme und Abläufe, welche von denen der hydrogenotrophen Methanogenese abweichen.

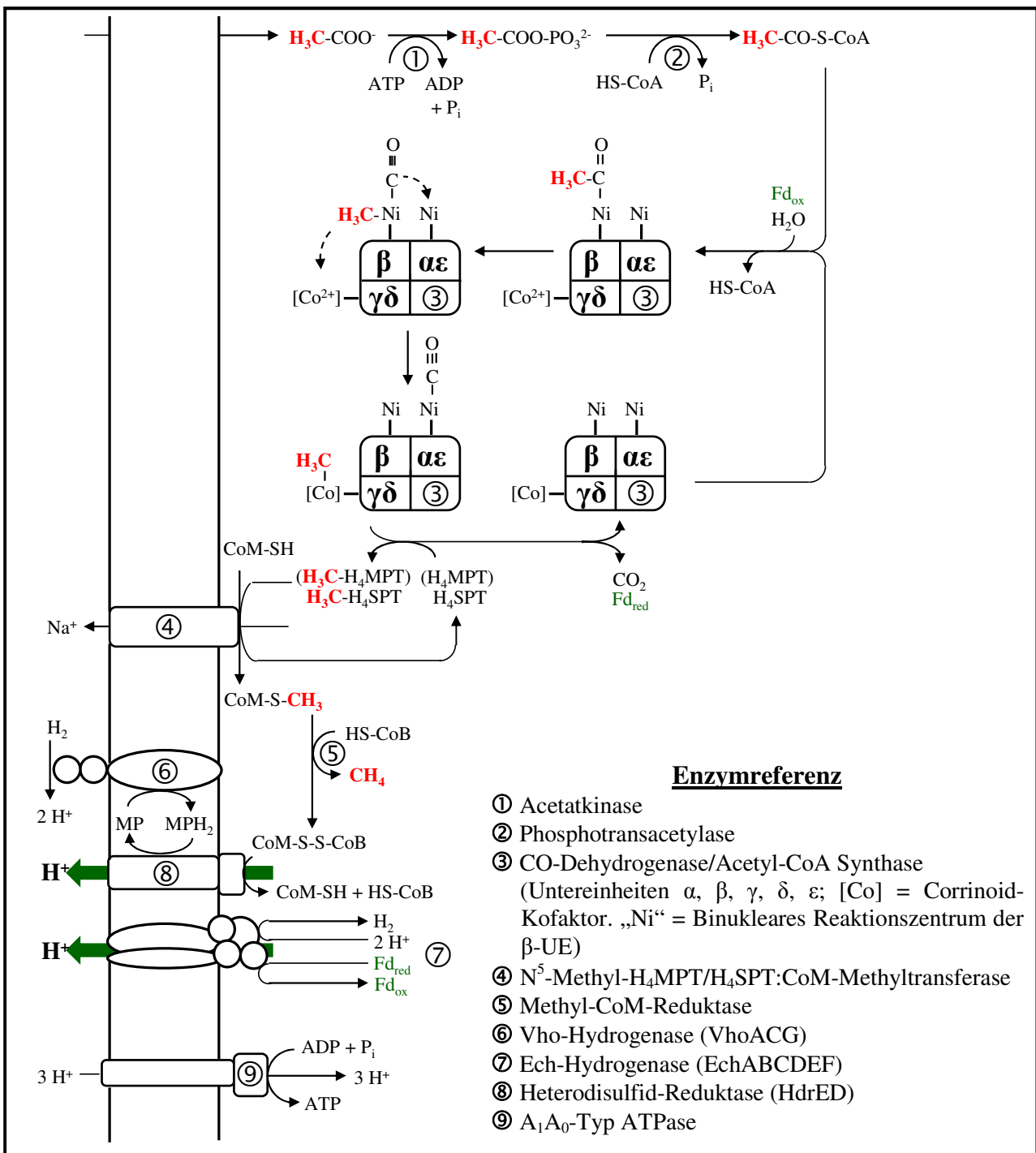
### I.2.4.3 Methan aus Acetat: Reaktionen der acetoklastischen Methanogenese

Im Gegensatz zur hydrogenotrophen Methanogenese erfolgt die Bildung von Methan im Verlauf der acetoklastischen Methanogenese (auch: acetiklastische Methanogenese) ausgehend von der Methylgruppe des Acetats (**Thauer, 1998**):



Damit handelt es sich bei dieser, von Mikroorganismen der Ordnung Methanosarcinales katalysierten, Summenreaktion um eine **Disproportionierung** des Acetats zu CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub>. Letzteres entstammt der Carbonylgruppe des Moleküls. Neben dem Methanophenazin sind bei dieser Art der Methanogenese auch Cytochrome als e<sup>-</sup>-Überträger involviert. Beide Moleküle sind auch bei der methylotrophen, nicht jedoch bei der hydrogenotrophen Reaktionskaskade zu finden. Die Teilreaktionen der Methanbildung aus Acetat sowie die daran beteiligten Enzyme fasst **Abb. 16** schematisch zusammen.

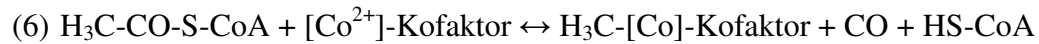
Vor der eigentlichen Disproportionierung wird Acetat zunächst zu Acetyl-CoA aktiviert. Für diesen Prozess existieren zwei Wege: Mikroorganismen der Gattung *Methanosarcina* phosphorylieren Acetat mittels der **Acetatkinase** (ⓐ, Ack) in einem ersten Schritt zunächst zu Acetyl-Phosphat. Anschließend erfolgt der Umsatz zum Acetyl-CoA durch eine **Phosphotransacetylase** (ⓑ, Pta). In *Methanosaeta* sp. erfolgt die Aktivierung in einer einzigen Reaktion, indem mittels einer **Acetyl-CoA Synthetase** (Acs) aus Acetat direkt Acetyl-CoA gebildet wird (**Eggen et al., 1991**). Die Substrataffinitäten bzw. die halbmaximalen Umsatzgeschwindigkeiten (K<sub>m</sub>-Werte) dieser beiden Enzymsysteme variieren dabei zwischen K<sub>m</sub> = 860 μM für *Methanosaeta concilii* und K<sub>m</sub> = 3 (22) mM im Falle von *Methanosarcina thermophila*. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit V<sub>max</sub> des Systemes von *Msc. thermophila* (V<sub>max</sub> = 660 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) und *Mst. concilii* (V<sub>max</sub> = 55 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, **Jetten et al., 1992**) begründen die unterschiedlichen Wachstumsvorteile der beiden Gattungen in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration: So weist *Methanosaeta* sp. insbesondere in Ökosystemen mit geringen Konzentrationen an Acetat Vorteile auf, während höhere Konzentrationen die Gattung *Methanosarcina* bevorteilen. Beiden Reaktionen gemein ist die Investition eines ATP zur Aktivierung des Acetats, welches die Nettoenergieausbeute des Gesamtsystems nochmal reduziert. Im Rahmen der Acetatkinasereaktion wird dabei ATP zu ADP + P<sub>i</sub>, im Verlauf der Acetyl-CoA Synthetasereaktion zu AMP + Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) umgesetzt. Die Reaktion zur Disproportionierung des Acetyl-CoA wird von einem multimeren α<sub>8</sub>β<sub>8</sub>γ<sub>8</sub>δ<sub>8</sub>ε<sub>8</sub>-Enzymkomplex katalysiert. Neben seiner Rolle im reduktiven Acetyl-CoA-Weg



**Abb. 16:** Übersicht über Teilreaktionen des postulierten Modells der acetoklastischen Methanogenese. Angabe von Substraten und Produkten und Lokalisation der katalysierenden Enzyme. Zu den Abkürzungen der Kofaktoren siehe I.2.4.1. Bindepositionen des **Methyl**-Restes sind rot, am Aufbau des **Protonengradienten** beteiligte Komponenten (Elektronenüberträger) grün markiert. Dargestelltes Modell postuliert für Archaea der Gattung *Methanosarcina* sp.

(Abb. 10) oder der Acetatbildung durch acetogene Bakterien, stellt der **CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplex** (③, Cdh) das Schlüsselsystem der acetoklastischen Methanogenese dar und katalysiert die eigentliche Acetatdisproportionierung (**Gencic und Grahame, 2003; Gong et al., 2008**): Zunächst bindet Acetyl-CoA an die  $\beta$ -Untereinheit (UE) des Komplexes, unter Abspaltung von CoA-SH wird der Acetylrest auf ein Metall-

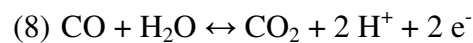
Zentralatom des binuklearen Ni-Ni- oder Ni-Cu-Metallzentrum übertragen. Nach der Disproportionierung durch Spaltung der C-C-Bindung des Acetylrestes wird die resultierende Methylgruppe auf den Corrinoid-Kofaktor der  $\gamma\delta$ -UE übertragen. Die Carbonylgruppe wird auf ein Ni-Reaktionszentrum der  $\alpha\varepsilon$ -UE transferiert. Damit katalysiert die  $\beta$ -UE des Enzyms die Acetyl-CoA-Synthaseaktivität des Komplexes mit:



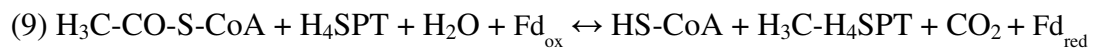
Der methylierte Corrinoid-Kofaktor stellt ein Substrat für die Methylcobamid:Tetrahydropterin-Methyltransferase-Aktivität der  $\gamma\delta$ -UE dar. Mit  $\text{H}_4\text{SPT}$  als Methylgruppenakzeptor ergibt sich:



Die  $\alpha\varepsilon$ -UE oxidiert die gebundene Carbonylgruppe zum  $\text{CO}_2$  (Reaktion 8) und setzt dieses frei



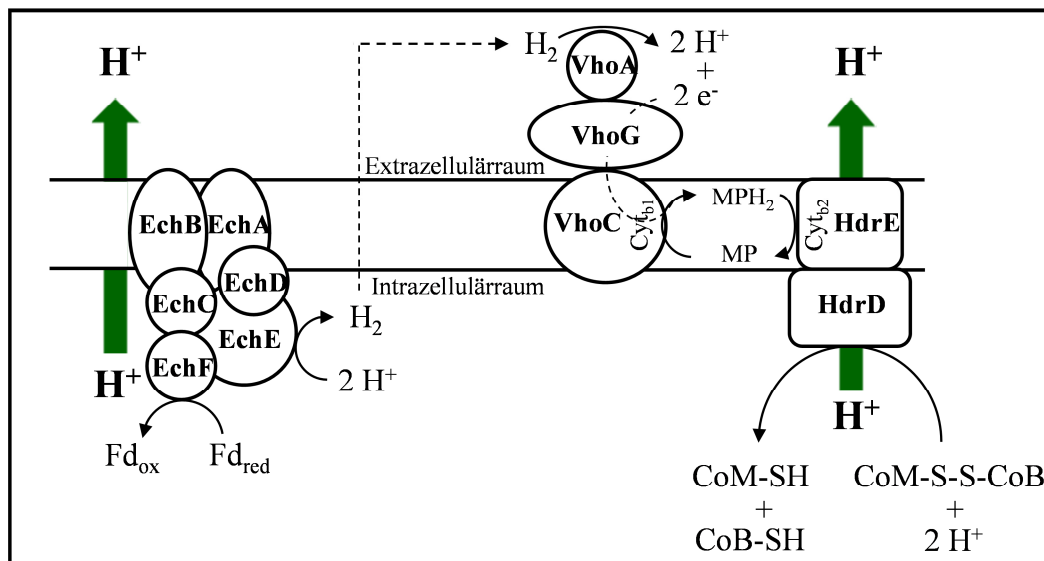
Unter Einbeziehung von Ferredoxin als  $\text{e}^-$ -Akzeptor ergibt sich damit folgende Summenreaktion für den Enzymkomplex (**Ferry und Kastead, 2007**):



Nach Durchlaufen der  $\text{N}^5$ -Methyl- $\text{H}_4\text{MPT}:\text{CoM}$ -Methyltransferase- und Methyl-CoM-Reduktase-Reaktionen analog zu den Mechanismen der hydrogenotrophen Methanogenese (**siehe I.2.4.2**) wird das Heterodisulfid-Molekül gebildet und in die reduktive Phase überführt. Für *Msc. barkeri* und *Msc. mazei* wurde ein dreiteiliges System aus **Ech-Hydrogenase**, **Vho-Hydrogenase** und Heterodisulfid-Reduktase vorgeschlagen (**Ferry und Kastead, 2007, Abb. 17**). Darin reduziert die ferredoxinabhängige, membrangebundene **Hydrogenase Ech ABCDEF** (Ⓣ, Ech) intrazelluläres  $\text{H}^+$  zu molekularem Wasserstoff, welcher die Membran permeiert. Die trimere **Hydrogenase Vho ACG** (Ⓢ, Vho) reoxidiert diesen Wasserstoff und transferiert die  $\text{e}^-$  zur Heterodisulfid-Reduktase. Im Unterschied zu Mvh weist Vho in der UE VhoC dazu ein Cytochrom  $\text{b}_1$  auf. Die Übertragung erfolgt dabei indirekt über Methanophenazin (MP). Dieses wird von der Hydrogenase reduziert und von der Heterodisulfid-Reduktase wieder oxidiert, womit ein zyklisches Überträgersystem in der Membran vorliegt. Im Gegensatz zu Mvh ist Vho direkt in der Membran gebunden. Neben Vho kann in *Msc. mazei* auch eine weitere MP-reduzierende Hydrogenase vorliegen, welche als **Vht** bezeichnet wird, jedoch nur bei Wachstum auf wenigen Substraten der methylotrophen Methanogenese

(siehe I.2.4.4) und auf  $H_2/CO_2$  exprimiert wird (Guss *et al.*, 2009). Die Cytochrom  $b_2$ -haltige, dimere **Heterodisulfid-Reduktase HdrDE** reduziert mit den vom Methanophenazin übertragenen  $e^-$  das Heterodisulfid und regeneriert die Sulfhydrylformen der Koenzyme wie oben beschrieben. Auch hier werden Protonen über die Membran transloziert. Der aufgebaute Protonengradient wird wie im Falle der hydrogenotrophen Methanogenese durch eine  **$A_1A_0$ -Typ ATPase** (©) unter ATP-Bildung aufgelöst.

**Tabelle 7** bietet eine Übersicht über die spezifischen Teilreaktionen und Enzyme des acetoklastischen Wegs der Methanogenese.



**Abb. 17: Postuliertes Modell zur Organisation des Fd:CoM-S-S-CoB Oxidoreduktase-Systems aus *Msc. barkeri*.** Überblick über das dreiteilige System aus den Hydrogenasen Ech und Vho, sowie der dimeren Heterodisulfid-Reduktase Hdr. Die protonentranslozierenden Aktivitäten von Ech und Hdr sind angedeutet. MP/MPH<sub>2</sub> = oxidiertes/reduziertes Methanophenazin, Fd<sub>ox</sub>/Fd<sub>red</sub> = oxidiertes/reduziert Ferredoxin. Auf Basis von **Ferry und Kastead, 2007**.

**Tab. 7: Überblick über die gegenüber den anderen Wegen der Methanogenese abweichenden Teilreaktionen der acetoklastischen Methanogenese sowie der daran beteiligten Enzyme.** Nach **Müller *et al.*, 1993; Thauer *et al.*, 1993**.

Enzym	Reaktion	$\Delta G^{0'}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
Acetatkinase	$CH_3COO^- + ATP \rightarrow CH_3CO_2PO_3^{2-} + ADP$	+ 13
Phosphotransacetylase	$CH_3CO_2PO_3^{2-} + CoA-SH \rightarrow CH_3CO-S-CoA + P_i$	- 9,0
Acetyl-CoA Synthetase	$CH_3COO^- + CoA-SH + ATP \rightarrow CH_3CO-S-CoA + AMP + PP_i$	- 6,0
CO-Dehydrogenase/ Acetyl-CoA-Synthase	$CH_3CO-S-CoA + H_4SPT \rightarrow CH_3-H_4SPT + CO + CoA-SH$	+ 62
Methyl-H <sub>4</sub> SPT:CoM Methyltransferase	$CH_3-H_4SPT + CoM-SH \rightarrow CH_3-S-CoM + H_4SPT$	- 29

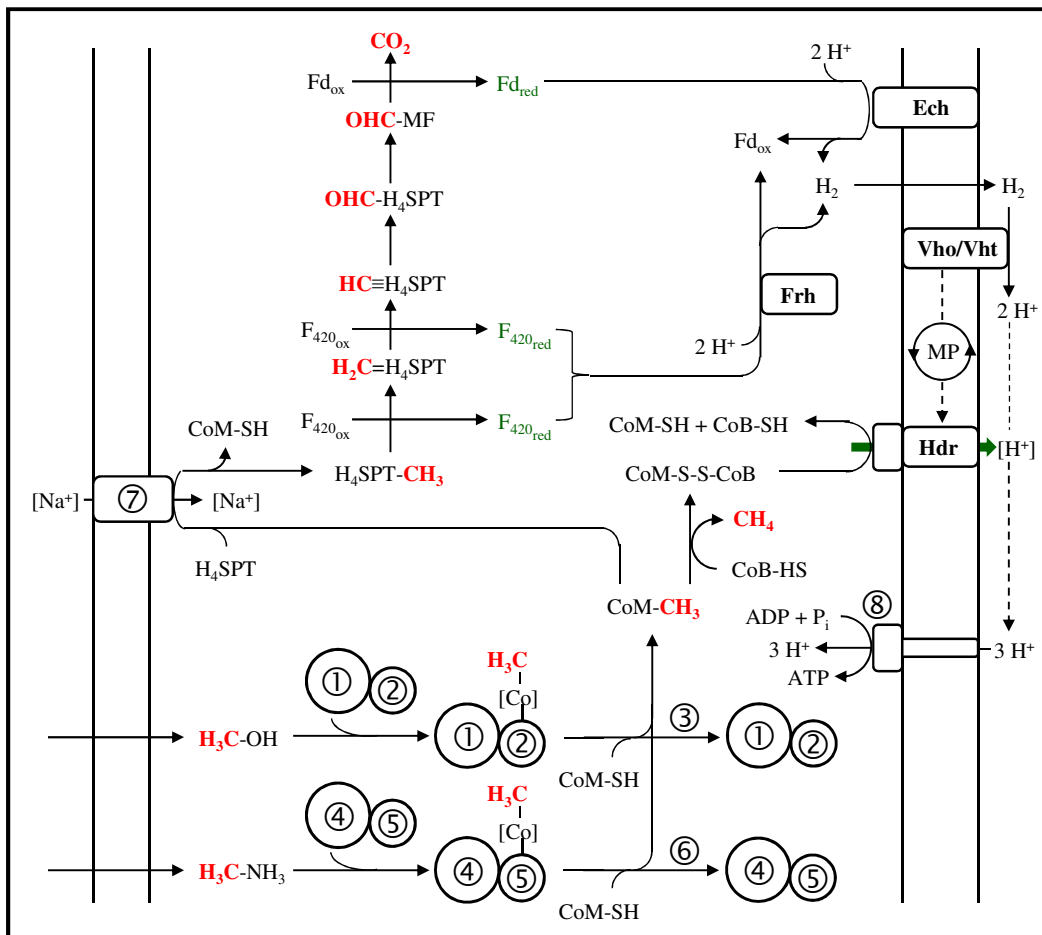
### I.2.4.4 Methan aus methylierten Verbindungen: Reaktionen der methylotrophen Methanogenese.

Die methylotrophe Methanogenese umfasst die Bildung von Methan aus methylierten Verbindungen wie Methanol, Mono-, Di- und Trimethylaminen sowie Methylsulfiden. Diese Reaktionsfolge wird vorwiegend von Mitgliedern der Familie Methanococcaceae und Methanosarcinaceae ausgeführt und konnte, aufgrund seiner Fähigkeit, alle drei Arten der Methanogenese ausführen zu können, insbesondere am Modellorganismus *Msc. barkeri* erforscht werden. **Tabelle 8** fasst beispielhaft den Umsatz einiger Substrate in der methylotrophen Methanogenese zusammen:

**Tab. 8: Ausgewählte Substrate und Umsatzreaktionen der methylotrophen Methanogenese.** Die freiwerdende Gibbs'sche Energie unter Standardbedingungen ist angegeben (aus Keltjens und Vogels, 1993).

Reaktion		$\Delta G^{0'}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
4 CH <sub>3</sub> OH	→ 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	- 106
4 CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	→ 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>3</sub>	- 76,7
2 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH + 2 H <sub>2</sub> O	→ 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 NH <sub>3</sub>	- 74,8
4 (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N + 6 H <sub>2</sub> O	→ 9 CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>3</sub>	- 75,8
2 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S + 2 H <sub>2</sub> O	→ 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> S	- 53,1
4 (CH <sub>3</sub> )SH + 2 H <sub>2</sub> O	→ 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub> S	- 51,0
(CH <sub>3</sub> )SH + H <sub>2</sub>	→ CH <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> S	- 69,3

Charakteristisch für die Disproportionierung methylierter Verbindungen im Verlaufe der methylotrophen Methanogenese ist die Übertragung einer Methylgruppe vom Substrat auf das CoM durch das sogenannte Methyltransferasesystem. Darin führt die konzertierte Aktivität zweier Methyltransferasen zunächst zur Übertragung der Methylgruppe auf ein den Factor III enthaltendes Corrinoïd-Protein. Daraufhin folgt der Transfer auf CoM. Das Funktionsprinzip soll im Folgenden exemplarisch anhand der Substrate Methanol und Monomethylamin erläutert werden. Beide Systeme bestehen aus drei Komponenten: Einer substratspezifischen Methyltransferase (für Methanol MtaB, 52 kDa, **Abb. 18**: ①; für Monomethylamin MtmB, 170 kDa, ④), einem systemsspezifischen Corrinoïd-Protein (MtaC, 33 kDa, ② bzw. MtmC, 29 kDa, ⑤) sowie der terminalen MT2-Typ Methylcobamid:CoM Methyltransferase (MtaA/MT2-M, 34 kDa, ③ bzw. MtbA/MT2-A, 40 kDa, ⑥). Die substratspezifische Methyltransferase bildet mit dem Corrinoïd-Protein einen stabilen Komplex, welcher in einem ersten Schritt die Methylgruppe zunächst unter Freisetzung von Wasser bzw. Ammoniak vom Substrat auf das assoziierte Corrinoïd-Protein überträgt. MtaA bzw. MtbA nutzt Letzteres als



**Abb. 18: Disproportionierung methylierter Verbindungen durch methylotherpe Methanogenese am Beispiel von Methanol und Monomethylamin in *Methanosarcina* sp.: Reaktionsübersicht und Lokalisation beteiligter Proteinkomplexe.** ① = methanolspezifische Methyltransferase MtaB, ② = methanolspezifisches Corrinoid-Protein MtaC, ③ = MT2-M-Typ Methylcobamid:CoM Methyltransferase MtaA, ④ = monomethylaminspezifische Methyltransferase MtmB, ⑤ = monomethylamin-spezifisches Corrinoid-Protein MtmC, ⑥ = MT2-A-Typ Methylcobamid:CoM Methyltransferase MtbA, ⑦ = Methyl-H<sub>4</sub>SPT:CoM Methyltransferase, ⑧ = A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-Typ ATPase, Ech/Vho/Vht/Frh = Hydrogenasen (siehe Text), Hdr = Heterodisulfid-Reduktase, Fd<sub>ox</sub>/Fd<sub>red</sub> = oxidiertes/reduziertes Ferredoxin, F<sub>420ox</sub>/F<sub>420red</sub> = oxidiertes/reduziertes F<sub>420</sub>, MP = membraninterner Redoxzyklus des Methanophenazins. Position und Redoxzustand der Methylgruppe ist rot, die Entstehung von Elektronen für die Hdr grün markiert.

Substrat für die Katalyse der Methylierung von CoM (**Burke et al., 1998**). Methyl-CoM nimmt nun in der Zelle eines von zwei Schicksalen an. Drei Viertel aller erzeugten Methyl-CoMs wird unter Methanfreisetzung über die Methyl-CoM Reduktasereaktion mit CoB-SH in das Heterodisulfid überführt. Für die Regeneration der Koenzyme durch die Hdr werden Elektronen benötigt, welche mithilfe des letzten Viertels der Methyl-CoM-Moleküle erzeugt wird. Hier wird die Methylgruppe in einer „inversen Methanogenese“ sukzessive zum CO<sub>2</sub> oxidiert. Die initiale Reaktion für diesen sog. oxidativen Weg der methylotherphen Methanogenese bildet die endergone Übertragung der Methylgruppe auf H<sub>4</sub>SPT durch die Methyl-H<sub>4</sub>SPT:CoM Methyltransferase (⑦). Dieser Schritt erfordert die Translokation von zwei Na<sup>+</sup>-Ionen (**Spring et al., 2010**). Der dafür benötigte Gradient wird im Laufe der normal gerichteten Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Methan oder im gegenläufigen Fall in den letzten



Reaktionsschritten der Oxidation der Methylgruppe zum  $\text{CO}_2$  generiert. Die dabei in Form von reduziertem Ferredoxin bzw. reduziertem  $\text{F}_{420}$  gewonnenen Elektronen können nun von der Ech-Hydrogenase ( $\text{Fd}_{\text{red}}$ ) oder der trimeren, cytosolischen und  $\text{F}_{420}$ -oxidierenden Hydrogenase **FrhADG** verwendet werden, um intrazellulär Protonen zu molekularem Wasserstoff umzusetzen. Nach Permeation der Membran wird dieser von der Hydrogenase Vho bzw. Vht, wie bereits für die acetoklastische Methanogenese beschrieben, genutzt, um nach der extrazellulären Rückkatalyse Methanophenazin reduzieren zu können. **Tabelle 9** stellt Energetik und Reaktionen der methylotrophen Methanogenese aus Methanol zusammenfassend dar.

**Tab. 9: Überblick über die spezifischen Reaktionen der methylotrophen Methanogenese anhand des Substrates Methanol in *Methanosarcina* sp.** Die Reaktionen involvieren die Summenreaktion des Methyltransferasesystems sowie die reversen Schritte der Methanogenese zur Gewinnung von Elektronen. Für die abschließenden Reaktionen vgl. **Tab. 6**. Nach **Thauer, 1998**.

Enzym	Reaktion	$\Delta G^{0'}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
methanolspezifisches Methyltransferasesystem (MtaABC)	$\text{CH}_3\text{-OH} + \text{HS-CoM} \rightarrow \text{H}_3\text{C-S-CoM} + \text{H}_2\text{O}$	- 27,5
Methyl- $\text{H}_4\text{SPT}:\text{CoM}$ Methyltransferase	$\text{Methyl-CoM-SH} + \text{H}_4\text{SPT} \rightarrow \text{Methyl-H}_4\text{SPT} + \text{CoM-SH}$	+ 30,0
$\text{F}_{420}$ -abhängige Methylen- $\text{H}_4\text{SPT}$ Reduktase	$\text{Methyl-H}_4\text{SPT} + \text{F}_{420\text{ox}} \rightarrow \text{Methylen-H}_4\text{SPT} + \text{F}_{420\text{red}}$	+ 6,2
$\text{F}_{420}$ -abhängige Methylen- $\text{H}_4\text{SPT}$ Dehydrogenase	$\text{Methylen-H}_4\text{SPT} + \text{F}_{420\text{ox}} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Methenyl-H}_4\text{SPT} + \text{F}_{420\text{red}}$	- 5,5

**Tab. 9 (Fortsetzung):**

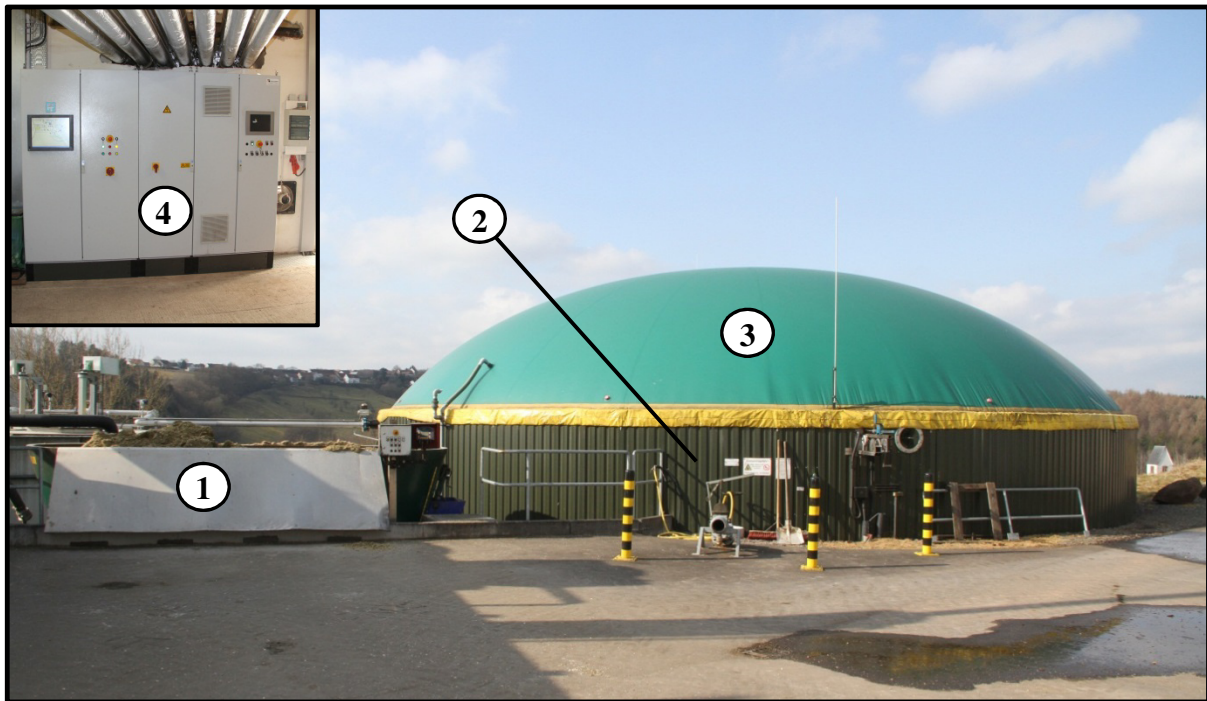
Enzym	Reaktion	$\Delta G^{0'}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
Methenyl- $\text{H}_4\text{SPT}$ Cyclohydrolase	$\text{Methenyl-H}_4\text{SPT} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Formyl-H}_4\text{SPT} + \text{H}^+$	+ 4,6
Formyl-Methanofuran: $\text{H}_4\text{SPT}$ Formyltransferase	$\text{Formyl-H}_4\text{SPT} + \text{MFR} \rightarrow \text{Formyl-MFR} + \text{H}_4\text{SPT}$	+ 4,4
Formyl-Methanofuran Dehydrogenase	$\text{Formyl-MFR} + 2 \text{Fd}_{\text{ox}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{MFR} + 2 \text{Fd}_{\text{red}} + 2 \text{H}^+$	- 16

### I.3 Gewinnung und energetische Nutzung von Biogas

Aufgrund der landwirtschaftlichen Betriebsführung und Bauweise der im Rahmen dieser Arbeit beprobten Anlagen konzentrieren sich die folgenden Erläuterungen auf **landwirtschaftliche BGA**, die **CSTR-Bauform** (continuously stirred tank reactor, dt.: volldurchmischer Standreaktor) des Fermenters und dessen Beschickung mit **NawaRo**.

#### I.3.1 Aufbau von landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Trotz mannigfaltiger Bauformen auf dem Markt bleiben die Kernelemente einer landwirtschaftlichen BGA stets dieselben. Dieses Grundgerüst kann modular erweitert werden. Das zentrale Element bildet der zumeist auf einem Stahlbetonfundament errichtete **Fermenter** (**Abb. 19,②**). Dieser stellt den Reaktionsraum für den Stoffumsatz des Substrates zum CH<sub>4</sub>-haltigen Biogas dar und ist durch eine an der Fermenterkrone angebrachte Doppelmembranfolie (**Abb. 19,③**) gasdicht abgeschlossen. Somit ergibt sich oberhalb des Pegels des eingebrachten Substratgemisches ein **Gasspeicher**-Raum, aus welchem das Biogas entnommen werden kann. Durch Anbindung an eine Messwarte (**Abb. 19,④**) und Messsonden in der Gas- und Flüssigphase des Fermenters ist eine online-**Analyse des Biogases** auf verschiedene Parameter möglich. Zwecks Aufrechterhaltung konstanter Fermentationstemperaturen sind die Edelstahl-Behälter mit wandintegrierten **Heizsystemen** und einer Wärmedämmung ausgestattet. Längsachs-, Axial- oder Paddel**rührwerke** in sog. kontinuierlichem oder quasi-kontinuierlichem Betrieb (sog. „Intermittierende Rührung“ mit ein- und abgeschalteten Rührwerken in wechselnden Zeitintervallen) stellen eine gleichmäßige Durchmischung des Substrates sowie eine homogene Temperaturverteilung sicher und ermöglichen gleichzeitig einen vereinfachten Gasaustritt in den Gasspeicherraum. Des Weiteren wird eine Bildung von Sink- oder Schwimmschichten unterbunden. Durch das EEG vorgeschriebene **Notfackeln** ermöglichen die Verbrennung des Biogases im Notfall und verhindern damit die Freisetzung von klimaschädlichem Methan. Die **Beschickung** des Fermenters erfolgt zumeist über automatisierte Zuführsysteme, welche je nach Trockensubstanzanteil (TS) des Substrats dieses entweder über Rohrleitungen oder Förderschnecken und Presskolben in den Fermenter einbringen (**Abb. 19,①**). Eine Vorvermischung in den als Flüssigphasen-Speicher ausgelegten **Vorgruben** ist ebenso möglich. In Bezug auf das Substrat werden zwei Verfahrensvarianten unterschieden. Vom „**Trockenvergärungs**“-Verfahren wird nach Definition des EEG 2004 gesprochen, wenn ein TS-Gehalt von mindestens 30 Masseprozent bei einer Faulraumbelastung von  $\geq 3,5$  kg organischer Trockensubstanz (oTS) pro m<sup>3</sup> Fermentervolumen und Tag vorliegt. Der überwiegende Anteil der landwirtschaftlichen BGA wird jedoch im



**Abb. 19: Grundaufbau einer landwirtschaftlichen Biogasanlage am Beispiel der BGA Wallhalben.** Eine Zufuhreinheit (①) fördert das Substrat in den Fermentationsbehälter (②), welcher über eine gasdichte Folie (③) abgedichtet ist und eine Speicherung des Biogases ermöglicht. Einschub: Kontrollwarte (④) zur computergestützten Überwachung von Anlage und Prozess. Stand 03.2012, Druckerlaubnis von Inhaber Peter Neumann.

„Nassvergärungs“-Verfahren betrieben, bei welchem das Substrat einen TS-Gehalt von bis zu 12 Masseprozent aufweist. Neben einem Fermenter weisen viele Anlagen einen dem Hauptbehälter nachgeschalteten **Nachgärer** auf. Dabei handelt es sich um einen weiteren Reaktionsraum, welcher meist ähnlich wie der Hauptfermenter konstruiert ist. Der Hauptteil der Substratvergasung erfolgt weiterhin im Fermenter. Nach Ablauf der Fermentierungszeit wird das Substrat jedoch in den Nachgärer überführt, wo die letzten Biogasanteile gewonnen werden, während der Hauptfermenter bereits mit frischem Substrat beschickt werden kann. Die Inokulation mit der im Fermenter etablierten Mikroflora erfolgt durch Restmengen des teilausgegasten Substrats. Auch kontinuierliche Verfahren existieren, bei denen das eingetragene Substrat der Menge an Substrat entspricht, welches den Fermenter in den Nachgärer verlässt und von diesem wiederum in Richtung eines Gärrestlagers gelangt. Da der Nachgärer ebenfalls über einen Gasspeicherraum verfügt, erhöhen sich bei dieser Konstruktionsweise gleichzeitig auch das Gasspeichervolumen, jedoch auch die Anschaffungs- und Wartungskosten. Generell wird der Prozess der Biogasgewinnung als **ein-** oder **zweiphasig** kategorisiert. Der Begriff der Phase bezieht sich dabei auf die mikrobiologischen Abbaustadien des anaeroben Substratabbaus (siehe **I.2.2, Abb. 4**). Die formalistische Begriffsumgrenzung unterscheidet die „Hydrolysephase“, welche das biologische Hydrolysestadium und die primären Gärungen umfasst (Stadien I und II), von der „Methani-

sierungsphase“. Diese wird vom Stadium der sekundären Gärungen und dem Methanogenese-Stadium (Stadien III und IV) gebildet. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen und Toleranzen der beteiligten Mikroorganismen an das Habitat bzgl. pH-Wert, Sauerstoffkonzentration oder Nährstoffen können für beide Phasen getrennte Fermenter errichtet werden. In diesem Fall läuft die Hydrolysephase in einem Fermenter, die Methanisierungsphase in einem zweiten Fermenter ab, der Prozess ist zweiphasig. Der Vorteil besteht darin, dass die Parameter an die jeweiligen Mikroorganismen angepasst und damit gezielt optimiert werden können. Im einphasigen Prozess laufen alle vier Stadien bzw. beide Phasen in einem Fermenter ab. Da die methanogenen Archaea einen Flaschenhals des Abbauprozesses darstellen, muss der gesamte Ablauf auf diese Mikroorganismen abgestimmt sein. Aufgrund des geringeren Investitionsbedarfs ist der einphasige Betrieb in der Landwirtschaft gegenwärtig noch weiter verbreitet.

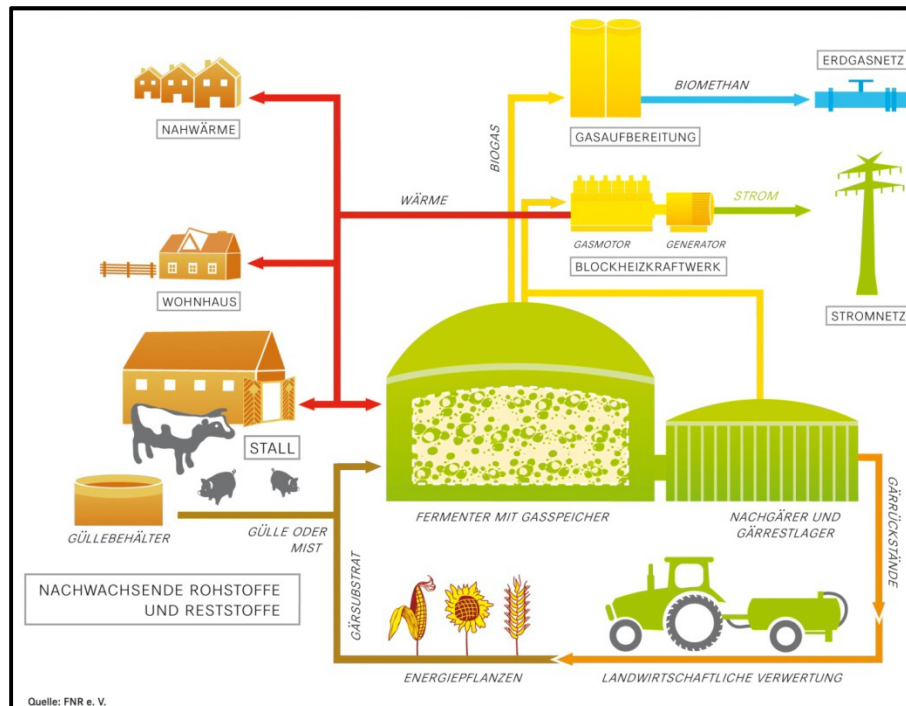
### **I.3.2 Landwirtschaftliche Gewinnung und Nutzung von Biogas**

Das Verfahren zur Umsetzung von NawaRo in Energieträger in landwirtschaftl. BGA lässt sich in zwei Prozesse unterteilen:

- I. Mikrobiologische Bildung CH<sub>4</sub>-haltigen Biogases aus dem NawaRo-Substratgemisch
- II. Energetische Nutzung oder Umwandlung des Biogases

Im Vorfeld der Biogas-Gewinnung werden die Energiepflanzen vom Feld geerntet und zerkleinert, um eine bessere Lagerung und vergrößerte Oberfläche für den mikrobiellen Zersetzungsprozess zu ermöglichen. Eine darüber hinausgehende Silierung erhöht die Haltbarkeit des geernteten Materials. Das als **Anmaischen** bezeichnete Vermengen des so vorbehandelten Festmaterials mit einer Flüssigphase ergibt ein pumpfähiges Substrat, mit welchem der Fermenter zur Einleitung von Prozess I beschickt wird. Dabei wird häufig ein im Betrieb anfallender Wirtschaftsdünger wie Rinder- und Schweinegülle oder Hühnermist eingesetzt. Auch ein Anmaischen mit flüssigen Gärrückständen ist möglich und bietet den Vorteil, dass das Substrat direkt mit der fermentereigenen Mikroflora angeimpft wird. Nach der Ausgasung des Substrats im Fermenter im mesophilen (32 - 42 °C) oder thermophilen (seltener, 50 - 57 °C) Temperaturbereich erfolgt die Überführung überzähligen Gärrests in das **Gärrückstandslager**. Das als „ausgefault“ bezeichnete, vorhydrolysierte Substrat hat hervorragende Düngeeigenschaften bei gleichzeitig durch den mikrobiellen Abbau der VFA stark reduzierter Geruchsemission und kann auf das Feld ausgebracht werden. Ökologische Vorteile ergeben sich durch den Kreisprozess aus NawaRo-Anbau, Ernte und Gärrest-rückbringung sowie der Möglichkeit, Düngemittel einzusparen und gegen selbst erzeugte

Gärreste zu ersetzen. **Abb. 20** bietet eine schematische Darstellung der Beschickung einer BGA sowie der Nutzung des Biogases als Energieträger. Das gewonnene Biogas kann auf vielfältige Weise der Energiegewinnung zugeführt werden. Da das wasserdampfgesättigte Rohbiogas neben den  $\text{CO}_2$ - und  $\text{CH}_4$ - auch noch geringere Anteile an  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{NH}_3$  aufweist (**Tab. 1**), muss es, je nach weiterer Verwendung, zuvor aufgereinigt werden. Insbesondere das



**Abb. 20: Schema einer landwirtschaftl. Biogasanlage.** Angedeutet ist die Gewinnung und energetische Nutzung von Biogas durch Beschickung eines Fermenters mit einem Gemisch aus pflanzlichen Fest-NawaRo und Gülle als Flüssigphase. Das Biogas wird entweder über Blockheizkraftwerke und Generatoren verstromt oder nach Aufbereitung in das lokale Erdgasnetz eingespeist. Die bei der Verstromung anfallende Wärmeenergie kann Nahwärmenetzen oder der eigenen Infrastruktur zugeführt werden. Der Gärrest wird auf das Feld rückgeführt. Quelle: **FNR, 2011a**.

giftige  $\text{H}_2\text{S}$ , welches sich mit dem Wasser zur hochkorrosiven Schwefelsäure verbindet, muss entfernt werden. Dafür wird im Rahmen einer **biologischen Entschwefelung** dem Gasspeicherraum eine Luftmenge von 3 - 5 % (v/v) zugeführt. Durch mikrobielle Oxidation von  $\text{H}_2\text{S}$  wird Elementarschwefel gebildet, welcher mit dem Gärrest aus dem Reaktor entfernt werden kann. Wiederholt wird in diesem Zusammenhang das ubiquitär im Fermenter und der innenliegenden Holzverstrebung ansässige Bakterium *Sulfobacter oxydans* genannt. Alternativen stellen die chemische Sulfidfällung mittels Metallverbindungen wie  $\text{Fe}_2\text{Cl}$  oder die Aktivkohle-Adsorption dar. Letzteres wird, neben Zeolithen oder Kieselgelen, auch zur **Trocknung** des Biogases durch das Adsorptionsverfahren genutzt. Das Kondensationsverfahren setzt dagegen auf eine Abkühlung des Rohbiogases unter den Kondensationspunkt und das Sammeln des Wassers in einem Kondensatabscheider (**Weithäuser et al., 2010**).

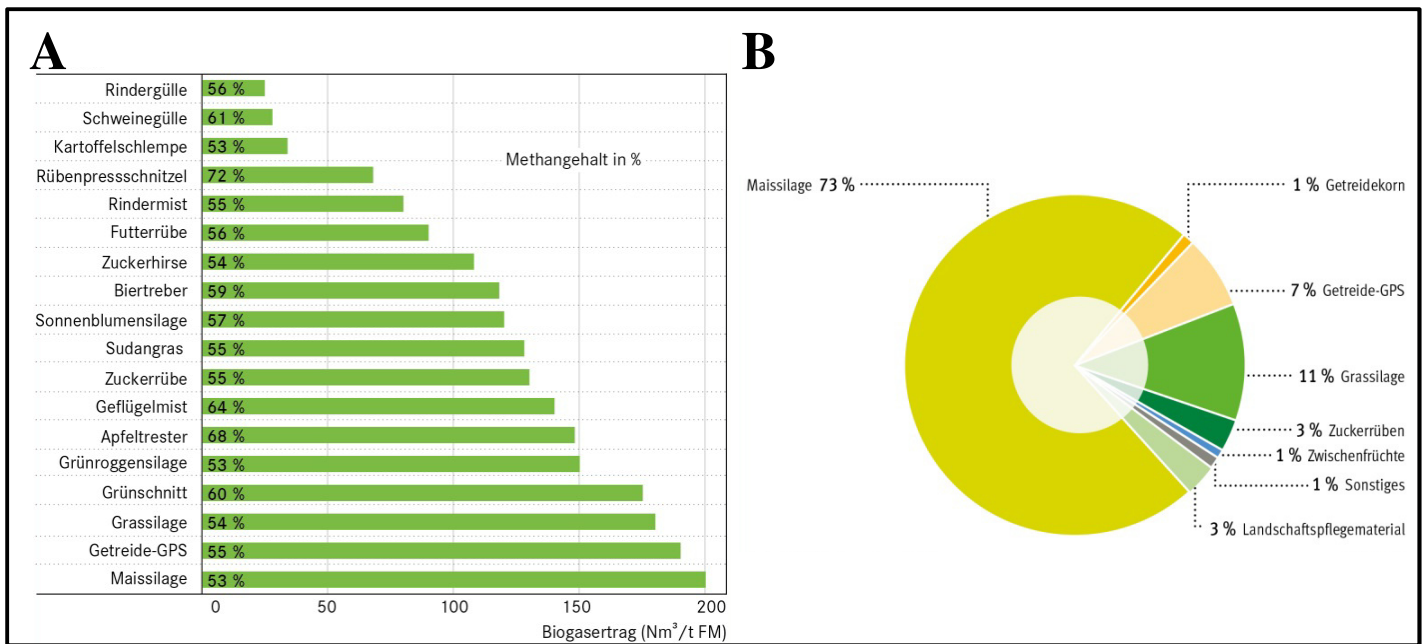
Weitere Aufreinigungsmaßnahmen stellen die CO<sub>2</sub>-Abscheidung und die Entfernung von Sauerstoff und Spurengasen dar (FNR, 2011a). Der Heizwert von zu 55 % CH<sub>4</sub>-gesättigten Biogases beträgt etwa 5,5 kWh/m<sup>3</sup>, dem Äquivalent von etwa 0,55 L Heizöl (FNR, 2012). Eine klassische Nutzungsmöglichkeit gereinigten Biogases besteht daher in der Erzeugung von Strom und Wärme durch die sog. **Kraft-Wärme-Kopplung (KWK)**. Durch die im EEG festgeschriebenen Einspeisevergütungen für den auf diese Weise gewonnenen Strom ist dies die am weitesten verbreitete Technik. Dabei wird das gereinigte Biogas in **Blockheizkraftwerken (BHKW)** verbrannt, womit ein Generator zur Stromerzeugung angetrieben wird. Geeignete Motoren für den Antrieb umfassen den Gas-Otto-Motor und den Zündstrahlmotor. Alternativen zum Antrieb des Generators stellen **Mikrogasturbinen** oder **Stirlingmotoren** dar. **Brennstoffzellen** dienen der direkten Erzeugung von Strom und Wärme. Dabei wird CH<sub>4</sub> als H<sub>2</sub>-Quelle für die elektro- und thermogene Reaktion zu Wasser verwendet. Die Nutzung der KWK-Prozesswärme kann einen großen Anteil zur Wirtschaftlichkeit einer BGA beitragen. Sie kann, ähnlich wie der erzeugte Strom, sowohl zur Eigenbedarfsdeckung auf dem Betrieb, als auch über Einspeisung in Nah- und Fernwärmeleitungen zur Beheizung von Wohnhäusern und öffentlichen Einrichtungen vermarktet werden. Eine weitere Möglichkeit zur Nutzung von Biogas liegt in der Verwendung als Erdgassubstitut. Hierfür reicht die oben beschriebene Gasreinigung nicht aus, zur Aufbereitung auf Erdgasniveau werden zusätzliche Gaswaschschritte wie die **Druckwasserwäsche**, **Aminwäschen** oder **Druckwechseladsorption** angewandt, bevor eine Brennwert- und Druckanpassung stattfinden kann. Das sog. Biomethan kann dann gegen entsprechende Rückvergütungen in das Erdgasnetz eingespeist werden. Ein Vorteil liegt darin, dass der Energieträger so bis an den Ort des Bedarfs geleitet und erst dort in die benötigte Energieform umgewandelt wird. Somit ergeben sich Energiespeicherkapazitäten und ein geringerer Energieverlust bis zum Verbraucher.

### **I.3.3 Substrate, Prozessparameter und Störungsindikatoren**

#### **I.3.3.1 Substrate für den Betrieb von NawaRo-Biogasanlagen**

Die Erzeugung von Biogas wird durch ein breites Spektrum von Substratkombinationen ermöglicht. Während für die Kompostierung überwiegend schnittfestes Material genutzt wird, sind für die Biogasgewinnung aufgrund der anaeroben Abbaukaskade insbesondere **flüssige Substrate** geeignet. Der brennwertige Anteil des Biogases (CH<sub>4</sub>) entstammt dabei überwiegend aus dem **Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidanteil** und somit aus der **organischen Trockensubstanz (oTS)** des Substrats. Rein auf den maximalen CH<sub>4</sub>-Gehalt im Biogas bezogen sind Substrate mit hohen Anteilen an Protein- (71 % CH<sub>4</sub>-Anteil) und Rohfett (68 %) gegenüber

den kohlenhydratreichen Substraten (50 %, **Eder, 2012**) zu bevorzugen. Generell umfasst die Bandbreite nutzbarer Inputstoffe Substanzen aus den Bereichen der Wirtschaftsdünger, der Energiepflanzen bzw. NawaRo, Reststoffe aus Lebensmittel- und Agroindustrie sowie kommunale und Schlachtrestoffe. Im Folgenden werden dabei vorwiegend Gegebenheiten aus der landwirtschaftlichen NawaRo-Biogaserzeugung in ihrer Substratkombination aus Wirtschaftsdünger und Energiepflanzen beschrieben. Im Jahre 2012 konnte der massebezogene Anteil dieser dominanten Substratkategorien für Deutschlands BGA auf 54 % (NawaRo) bzw. 41 % (Wirtschaftsdünger) beziffert werden (**FNR, 2013c**). Unter den Begriff **Wirtschaftsdünger** fallen mit Gülle und Mist allgemein Exkremate aus der Nutztierzucht. Sie werden vorwiegend im Anmaischprozess zur Erzeugung eines pumpfähigen Substrates genutzt, können jedoch gerade in Fällen des Abbaus mikronährstoffarmer Pflanzen, wie z.B. Mais, einer Unterversorgung der Fermenterbiologie vorbeugen (**Eder, 2012**). Aufgrund der niedrigen oTS und der daraus resultierenden, geringen CH<sub>4</sub>-Ausbeute von 11 - 21 Nm<sup>3</sup> pro t Substrat (**Friehe et al., 2010**) ist die Monovergärung von Rinder- und Schweinegülle in Deutschland selten anzutreffen. Der niedrige oTS-Anteil ermöglicht jedoch eine gute Mischbarkeit mit Kosubstraten und die Einstellung eines konkreten Gesamt-oTS im Fermentersubstrat. Die genaue Definition des Wirtschaftsdüngers in Bezug auf Nährstoffinhalt und chemische Parameter ist abhängig von einer Vielzahl an Faktoren wie der Nutztierart und Fütterungsweise. Unter ökologischen Gesichtspunkten ist beim Einsatz von Gülle die Prävention einer unkontrollierten Methanemission hervorzuheben. Im Gegensatz zur Verwendung des weitgehend ausgefaulten Gärrestes würde durch direktes Ausbringen von Wirtschaftsdüngern auf eine Agrarfläche der dortige Umsatz zu CH<sub>4</sub> und dessen Entweichen in die Atmosphäre ermöglicht. Durch den höheren pH-Wert gegenüber der Gülle reduziert ein solcher Einsatz des Gärrestes ferner die bodenschädigende Ätzwirkung. Der Hauptanteil der durch die Fermenter-Mikroorganismen anaerob zu CH<sub>4</sub> abbaubaren oTS im Substratgemisch entstammt von den sog. **Energiepflanzen**. Diese Kulturpflanzen zeichnen sich durch hohe Anteile an oTS, Rohfett, Kohlenhydraten und/oder Proteinen aus. Je nach Zusammensetzung und Volumenanteil des Pflanzenmaterials im Substratgemenge variieren der maximale Biogasertrag und dessen prozentualer CH<sub>4</sub>-Gehalt (**Abb. 21A**). Aufgrund hoher Pflanzen- und Energieerträge pro ha Anbaufläche (Ø 45 t Frischmasse [FM] pro ha bei einem Methanertrag von 106 Nm<sup>3</sup> t<sup>-1</sup>), anspruchsloser Anpflanzung und Pflege sowie guter Ernte- und Silierbarkeit bildet **Mais** das meistgenutzte Substrat in deutschen BGA (**Abb. 21B**). Der zur Biogaserzeugung genutzte Mais wird auf 800.000 ha der bundesdeutschen Agrarfläche angebaut und macht damit einen Anteil von rund 6 % aus (**Eder, 2012**). Trotz dieser geringen



**Abb. 21: Biogaserträge verschiedener Substrate (A) und massebezogener Substrateinsatz nachwachsender Rohstoffe in Biogasanlagen 2012 (B).** Angegeben sind der maximale Biogasertrag und dessen prozentualer CH<sub>4</sub>-Gehalt verschiedener Substratkomponenten; GPS = Ganzpflanzensilage (A, FNR, 2011b). Rechts: Staffellung der Gesamt-Nawaro-Substratanteile in deutschen Biogasanlagen im Jahre 2012 (B, FNR, 2013d, auf Datenbasis des DBFZ).

Anbaufläche haben die Nachteile des Maisanbaus zur Erforschung und Nutzung alternativer Energiepflanzen und Anbauformen geführt. Zur Vermeidung eines maisanbaubedingten hohen Wasserverbrauchs, der starken Humuszehrung und der Gefahr der Bodenerosion im Zusammenspiel mit einer Reduzierung der Biodiversität durch Monokulturanbau werden gegenwärtig Erfahrungen mit dem Einsatz von u.a. **Durchwachsender Silphie, Topinambur, Sorghum-Hirse** und anderen pflanzlichen Substraten gesammelt. Die Auswahl einer geeigneten Substratkombination erfolgt zumeist nicht nur anhand von maximaler Gasausbeute, sondern bezieht u.a. Aspekte der Nachhaltigkeit, Lager- und Silierfähigkeit, des prozessbiologischen Verhaltens und der Bodenökologie ein. Vor diesem Hintergrund erwies sich der wechselnde **Fruchtfolgeanbau** in Kombination mit jahreszeitlicher **Alternierung von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen** als vorteilhaft (FNR, 2010). Dabei werden die verschiedenen Energiepflanzen einer Fruchtfolge zeitlich so aufgezogen, dass die bei kühleren Temperaturen bevorteilten C<sub>3</sub>-Pflanzen (z.B. Sonnenblume, Raps) nach den Wintermonaten und die unter wärmeren Temperaturen bevorteilten C<sub>4</sub>-Pflanzen (z.B. Mais, Sorghum-Hirse) nach den Sommermonaten geerntet werden können.

Dennoch wird Mais aufgrund ökonomischer Vorteile weiterhin eine Rolle im Anbau von BGA-Substraten spielen.



### I.3.3.2 Fermentationsrelevante Verfahrensparameter: Ursachen und Indikatoren von Prozess-Störungen

Das Verfahren zur Gewinnung von Biogas aus NawaRo wird durch eine Vielzahl physikalischer und chemischer Betriebsparameter definiert. Je nach anlagenspezifischer Ausprägung können daraus Störungen des Gesamtprozesses resultieren. Zu den physikalischen Schlüsselparametern zählen u.a. die Faulraumbelastung  $B_R$ , die hydraulische Verweilzeit HRT, die Temperatur T und die Durchmischung. Die **Faulraumbelastung**  $B_R$  ist ein Maß für die dem Fermenter zuführbare Masse an oTS ( $m_{oTS}$ ) pro  $m^3$  Faulraumvolumen ( $V_{\text{Fermenter}}$ ) und Tag (t), sie ist definiert als:

$$(11) B_R = \frac{m_{oTS}}{V_{\text{Fermenter}} \cdot t} \quad [\text{kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$$

Gängige  $B_R$ -Richtwerte für NawaRo-Anlagen liegen zwischen 2 und 3 kg oTS  $m^{-3} d^{-1}$  bei reiner NawaRo-Vergärung, in Kombination mit Güllebeimengung bis 4 kg oTS  $m^{-3} d^{-1}$  (**Kaiser et al., 2007**). Oberhalb von 4 kg oTS  $m^{-3} d^{-1}$  tritt häufig eine Übersättigung des Systems und eine Ausdünnung der Fermentermikroflora ein (**Eder, 2012**). Dies resultiert aus dem Zusammenhang von Faulraumbelastung und der **hydraulischen Verweilzeit**. Sie gibt die hypothetische Zeitspanne in Tagen an, die ein Substrat vom Eintrag in den Fermenter bis zu dessen Austrag in das Gärrestlager durchschnittlich benötigt und stellt einen wichtigen Parameter bei der Dimensionierung des Faulraums dar. Formalistisch bezeichnet sie das Verhältnis von Reaktorvolumen ( $V_{\text{Fermenter}}$ , [ $m^3$ ]) zum täglichen Substratdurchsatzvolumen ( $V_d$ , [ $m^3 d^{-1}$ ]):

$$(12) HRT = \frac{V_{\text{Fermenter}}}{V_d} \quad [d]$$

Mit steigendem  $B_R$  ergibt sich eine Reduzierung der HRT. Kurze Verweilzeiten ermöglichen schnellen Zugriff auf das Gärsubstrat z.B. für den Düngemiteleinsatz und ergeben durch vorwiegenden Abbau der schnell hydrolysierbaren Substratanteile eine gute Auslastung des Faulraums pro Zeiteinheit (**Gasleistung**). Gleichzeitig sinkt jedoch die **Gasausbeute** pro kg eingesetzter oTS mit der HRT: Da eine geringere Verweildauer eines Substrats gleichbedeutend ist mit einem schnellen Substrataustrag, verbleibt der Fermentermikroflora weniger Zeit für den Abbau, was in der geringen Gasausbeute resultiert. Des Weiteren birgt dies die Gefahr einer Ausdünnung der Populationsgröße. Zur Aufrechterhaltung des Prozesses muss daher eine HRT eingestellt werden, welche ein Nachwachsen der Mikroorganismen ermöglicht, aus ökonomischen Gründen jedoch bei gleichbleibend hohem Abbaugrad

möglichst kurz ist. Dabei muss sich die HRT an den langsam wachsenden syntrophen Fettsäureoxidierern und den methanogenen Archaea orientieren. Wird die HRT in einem vorliegenden Störfall nicht wieder erhöht, ergibt sich ein selbstverstärkender Effekt, welcher auch als Resultat vom Einsatz hoher Mengen vorwiegend schnell abbaubaren Substrates bekannt ist: Die schnell proliferierenden Mikroorganismen aus der „Hydrolysephase“ erreichen einen höheren Zellzuwachs als diejenigen der „Methanisierungsphase“. VFA als Produkte der „Hydrolysephase“ können von den syntrophen Organismen nicht schnell genug prozessiert werden, sodass die Fettsäuren im Fermenter akkumulieren (sog. „Säurestau“) und der pH-Wert sinkt. Da die Methanogenese jedoch nur in einem engen pH-Bereich um den Neutralpunkt abläuft, können hydrogenotrophe methanogene Archaea ihren Energiestoffwechsel nicht aufrecht und den  $pH_2$  für die vorangehende VFA-Oxidation niedrig halten. Die Fermenterbiozönose ist gestört und die Gefahr eines Prozessausfalls gegeben. Bei der Monofermentation von Gülle im Bereich von 30-35 °C wird mit einer HRT von 30-50 Tagen gerechnet. Für die Vergärung von Energiepflanzen werden mindestens 42 Tage veranschlagt, sodass unter Einbezug einer Sicherheitsmarge die unter landwirtschaftl. Bedingungen übliche Mindest-HRT von etwa 50 Tagen erreicht wird (**Eder, 2012**). Die absolute  $B_R$ -Obergrenze Maissilage vergärender Systeme wird auch unter Einbezug alternativer Fermenterbauweisen als zwischen 6 und 10 kg oTS  $m^{-3} d^{-1}$  liegend angegeben (**Bauer et al., 2009**). Auch die **Betriebstemperatur** hat einen starken Einfluss auf die mikrobielle Population (siehe **I.3.5**). Übliche Betriebsarten decken den mesophilen (32 - 42 °C) und thermophilen Temperaturbereich (45 - 60 °C) ab. In der Regel können im thermophilen Betrieb höhere  $B_R$  erreicht werden, da durch höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und kürzere Verdopplungszeiten der Substratabbau rascher voranschreitet (**Liebetrau et al., 2010**). Es können kürzere HRT eingehalten und durch die schlechtere Löslichkeit des  $O_2$  schneller anaerobe Bedingungen geschaffen werden. Allerdings ist die allgemeine Biozönose und speziell die Diversität methanogener Archaea im Vergleich mit mesophil betriebenen Anlagen deutlich eingeschränkter (**Karakashev et al., 2005; Levén et al., 2007**). Diese reduzierte Biodiversität hat zur Folge, dass sich der thermophile Prozess langsamer an neue Temperaturbereiche anpasst und zudem empfindlicher gegenüber Temperaturschwankungen ist. Die mesophile Population toleriert dagegen Schwankungen von +/- 3 °C ohne hohe Einbußen in der  $CH_4$ -Bildung (**Liebetrau et al., 2010**). Weitere Vorteile gegenüber der thermophilen Betriebsweise bestehen u.a. in einer erhöhten Stabilität der Fermentermikroflora gegenüber Hemmstoffen wie  $NH_3$ , einem geringeren  $CO_2$ -Anteil im Gas (höhere Löslichkeit in der Flüssigphase) und dem geringeren Eigenenergiebedarf. Die Rührtechnik stellt die

homogene Verteilung von Wärme und Nährstoffen im Fermenter sicher und erleichtert den Austritt des Biogases aus dem Substrat. Einer Entmischung des Substrats wird vorgebeugt, Sink- und Schwimmschichten werden aufgebrochen sowie der Gasaustritt erleichtert. Zu starke Rühraktivität steht jedoch in dem Verdacht, über hohe Scherkräfte syntrophe Abbauprozesse durch räumliche Trennung der Partner-Mikro-organismen zu inhibieren. Dies betreffe vorwiegend die auf den Interspezies- $e^-$ -Transfer angewiesene Gemeinschaft der Fettsäure-Oxidierer mit den hydrogenotrophen methanogenen Archaea (**Bauer et al., 2009**).

Wichtige chemische Prozessparameter umfassen u. a. die Nährstoffversorgung, den pH-Wert, das Säurespektrum und die Konzentrationen von Schwefel- und  $NH_4^+$  im Substrat. Im Bereich der **Nährstoffversorgung** werden die Makronährstoffe von den Mikronährstoffen und Spurenelementen unterschieden. Der Bedarf an **Makronährstoffen** wird durch den Abbauprozess des Substrats gedeckt. Dabei fokussiert sich die Betrachtung zumeist auf Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel. Im Zusammenhang mit einer Bewertung des Fermentersubstrats im Hinblick auf die Versorgung der (methanogenen) Biozönose gilt ein Verhältnis von C:N:P:S = 600:15:5:3 als ausreichend (**Friehe et al., 2010**). Ein unausgewogenes Verhältnis, insbesondere von C:N, kann in suboptimalen Zellmasseerträgen (zuwenig N) oder erhöhtem  $NH_4^+$ -Aufkommen resultieren (zuviel N) und den Prozess inhibieren (s.u.). Ein im Bereich der **Mikronährstoffe** und **Spurenelemente** wichtiges Element stellt **Nickel** dar. Es ist u. a. das Zentralatom des Kofaktors  $F_{430}$  und damit als Kofaktor der Methyl-CoM-Reduktase an einem Schlüsselenzym der Methanogenese beteiligt. Auch in der  $\beta$ -UE des CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthasekomplexes und in Hydrogenasen ist Nickel zu finden. Cobalt ist häufig an Methylgruppenübertragungen beteiligt: Es ist das Zentralatom des Factor III von Methyltransferasen und prothetische Gruppe der  $\gamma\delta$ -UE des CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthasekomplexes. **Molybdän** wird vom MGD gebunden und ist Bestandteil der Formiat-Dehydrogenase sowie der Formyl-MF-Dehydrogenase. In deren Isoenzym ersetzt **Wolfram** Molybdän. **Eisen** wird aufgrund der vergleichsweise hohen Mindestkonzentration häufig nicht mehr zu den Spurenelementen gezählt. Als Komponente von Fe-S-Komplexen z.B. von Ferredoxinen und Cytochromen ist es an  $e^-$ -Übertragungen vieler Redox-Prozesse weit verbreitet. Für BGA-Substrate existieren Richtwert-Konzentrationen (**Tab. 10**), Literaturwerte aus verschiedenen Quellen weichen jedoch stark voneinander ab. Bei zu geringen Konzentrationen oben genannter Stoffe wird insbesondere die Methanogenese inhibiert. Eine Unterversorgung tritt bei Kofermentation von Gülle und NawaRo

**Tab. 10: Richtwerte wesentlicher Mineralstoffgehalte im Gärsubstrat von NawaRo-beschickten Biogasanlagen.** Gekürzt nach Lemmer *et al.*, 2010.

Element	Minimum [mg kg <sup>-1</sup> TM] <sup>1</sup>	Maximum [mg kg <sup>-1</sup> TM] <sup>1</sup>
Nickel	3,0	16,0
Cobalt	0,4	5,0
Molybdän	1,0	6,0
Eisen	1500	3000
Wolfram	0,1	30

<sup>1</sup>TM = Trockenmasse

selten ein, bei Monofermentationsansätzen von spurenelementarmen Energiepflanzen wie Mais ist oft der externe Zusatz von Mikronährstoffen oder eine Beimengung von Gülleanteilen nötig (Liebetrau *et al.*, 2010). Wie bereits angedeutet, ist der **pH-Wert** des Fermentermilieus von hoher Bedeutung für die Prozess-Mikroflora. Zumeist stellt sich ein passender pH-Wert selbstständig im Fermenter ein, starken Schwankungen wird durch die Ammonium- und Carbonat-Puffersysteme im Substrat vorgebeugt. Während die „Hydrolysephase“ durch die Akkumulation von VFA's aus den primären Gärungen im sauren Milieu bei pH 4,5 - 6,3 optimal abläuft, ergeben sich die besten Aktivitäten in der „Methanisierungsphase“ im leicht Alkalischen bei pH 6,5 - 8,0. Im einphasigen Betrieb ist der zu erreichende pH daher stets ein Kompromiss an die Stoffwechselaktivitäten aller vorhandenen Mikroorganismen und richtet sich an den Bedürfnissen der methanogenen Archaea aus. Daneben beeinflusst der pH zudem die Toxizität eventueller Hemmstoffe. So verlagert sich bei steigendem pH das Gleichgewicht des (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)/(NH<sub>3</sub>)-Verhältnisses stark auf Seiten des cytotoxischen NH<sub>3</sub> (s.u.), wohingegen die Hemmwirkungen der VFA's, welche auf die undissoziierte Form zurückzuführen sind, und des Schwefelwasserstoffs mit sinkendem pH zunimmt. Aufgrund der recht hohen Pufferkapazität des Substrats reagiert der pH träge, sodass eine eintretende Prozessstörung oft nur zeitverzögert erkannt wird. Zur Beurteilung des Fermentermilieus und des Prozessbetriebs wird daher vorwiegend das **Säurespektrum** herangezogen. Die Analyse der Einzelkonzentrationen von VFA wie Acetat, (Iso-)Butyrat, (Iso-)Valeriat und Propionat ermöglicht eine zeitnahe Überwachung des Prozesses und kann Hinweise auf die Art der Störung geben. So deutet eine Akkumulation von Acetat auf eine Hemmung der syntrophen Acetatoxidation hin. Reichern sich im Säurestau VFA wie Propionat und Butyrat an, so kommen weitere Störungen der sekundären Gärungsreaktionen in Betracht. In mesophilen BGA gilt eine VFA-Gesamtkonzentration von < 4 g L<sup>-1</sup> sowie eine Acetat-Konzentration von < 3 g L<sup>-1</sup> als unproblematisch. Propionat sollte dagegen eine Konzentration von 1 g L<sup>-1</sup>, Butyrat von 0,5 g L<sup>-1</sup> nicht überschreiten. In diesem Zusammenhang gilt ein Acetat/Propionat-Verhältnis von 3:1 als Richtwert (Eder, 2012; Lebuhn, 2011;

**Preißler et al., 2009**). Häufig wird auch das sog. FOS/TAC-Verhältnis (flüchtige organ. Säuren/„total anionic carbon“) zur Beurteilung der Säurelage im Fermenter herangezogen. Dabei wird die Konzentration an VFA (FOS) zur verbleibenden Pufferkapazität (TAC) ins Verhältnis gesetzt. Ein Wert von 0,8 sollte dabei nicht überschritten werden (**Liebetrau et al., 2010; Weiland, 2008**), höhere Werte stellen Indikatoren für einen gestörten Abbauprozess als Folge einer Substratüberdosierung dar.

Obwohl Stickstoff für die Proliferation der Fermentermikroflora notwendig ist, kann es bei Beschickung von BGA mit stickstoffreichen Substraten wie Hühnerkot oder Kleesilage zur Hemmung der Gasproduktion kommen. Analog zum Puffersystem steht Ammonium-Stickstoff ( $\text{NH}_4^+$ -N) mit der nichtionischen Form des **Ammoniak**-Stickstoffs ( $\text{NH}_3$ -N) im Gleichgewicht:



Durch Erhöhung der Temperatur T und des pH verschiebt sich das Gleichgewicht jedoch teils stark auf die Seite des  $\text{NH}_3$ , welches in dieser undissoziierten Form membranpermeabel (**Gallert und Winter, 1997**) und cytotoxisch wirksam ist:

$$(14) c_{\text{NH}_3} = c_{\text{NH}_4^+} \times \frac{10^{\text{pH}}}{e^{\frac{6344}{273+T}} + 10^{\text{pH}}}$$

Diese starke Abhängigkeit der Ammoniak-Konzentration von T und pH sowie die Beteiligung am notwendigen Ammonium-Puffersystem erschwert das Ermitteln einer Konzentrationsschwelle, ab welcher die Hemmwirkung durch  $\text{NH}_3$  eintritt. Daher finden sich in der Literatur je nach Betriebsart der beschriebenen BGA stark voneinander abweichende Richtwerte. In der Praxis wird häufig vom Einsatz einer Prozesshemmung ab einer Summenkonzentration beider Formen ( $c[\text{NH}_4^+] + c[\text{NH}_3]$ ) von 1,7 - 4 g L<sup>-1</sup> (80 - 250 mg L<sup>-1</sup> freies  $\text{NH}_3$ ) berichtet, durch langfristige Adaptation der Biozönose an hohe Summen-Konzentrationen scheinen jedoch auch höhere Werte mit einem weitgehend störungsfreien Betrieb vereinbar zu sein (**Bauer et al., 2009; Liebetrau et al., 2010; Gallert et al., 1998**). Der genaue Toxizitätsmechanismus von  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  ist strittig. Diskutiert wird u.a. ein zu starker Verlust an  $\text{K}^+$ -Ionen durch  $\text{K}^+$ -Efflux zur kompensatorischen Stabilisierung des intrazellulären pH-Werts trotz  $\text{NH}_3$ -Einstroms sowie eine direkte Interaktion mit membrangebundenen Enzymen der Methanogenese (**Hendriksen und Ahring, 1991**). Tabelle 11 fasst abschließend einige Richtwerte für Prozessparameter zur Biogasgewinnung aus NawaRo zusammen.

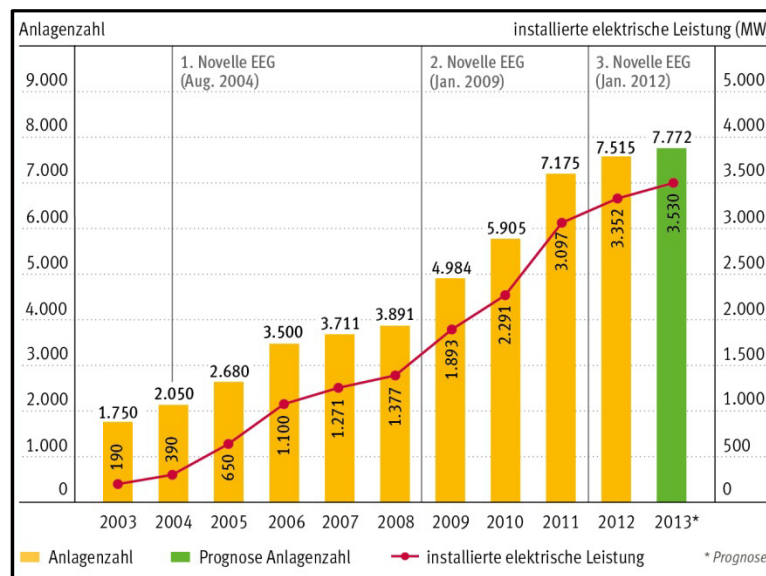
**Tab. 11: Übersicht über fermentationsbiologisch relevante Richtwerte landwirtschaftlicher NawaRo-BGA mit Güllebeimengung.** Zusammengestellt aus **Eder, 2012; Kaiser *et al.*, 2007; Lebuhn, 2011.** Literaturwerte je nach Autor, Anlagenbetrieb und Substratzusammensetzung teils stark voneinander abweichend.

Parameter	Richtwert
physikalisch	
$B_R$	$< 4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$
HRT	$> 60 \text{ d}$
TS	8 - 15 % TS
T	32 - 42 °C (mesophil) oder 45 - 60 °C (thermophil)
chemisch	
C:N:P:S	600:15:5:1
pH	7,0 - 7,5
Gesamte org. Säuren	$< 4 \text{ g L}^{-1}$
Acetat	$< 3 \text{ g L}^{-1}$
Propionat	$< 1 \text{ g L}^{-1}$
Acetat:Propionat	3:1
Iso-Butyrat	$\ll 0,5 \text{ g L}^{-1}$ bzw. nicht nachweisbar <sup>2</sup>
FOS/TAC	$< 0,8$
$\text{NH}_4^+$ -N	$< 4 \text{ g L}^{-1}$
$\text{NH}_3$ -N	$< 0,6 \text{ g L}^{-1}$
$\text{H}_2\text{S}/\text{S}^-$	$< 0,2 \text{ g L}^{-1}$
mikrobiologisch	
Zellzahl methanogener Archaea	$> 5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$
Zellzahl Bacteria	$> 10^8 \text{ mL}^{-1}$

<sup>1)</sup>Angabe in **Kaiser *et al.*, 2007.** <sup>2)</sup>Angabe in **Eder, 2012.**

### I.3.4 Fördern und Fordern: Das Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (EEG)

Deutschland ist der größte Primärproduzent von Biogas in der EU (**EurObserv'ER, 2011**). Die Zunahme der Verbreitung landwirtschaftlicher BGA bis zu diesem gegenwärtigen Status wurde unterstützt durch die Verabschiedung und regelmäßige Novellierung des Gesetzes für den Vorrang Erneuerbarer Energien (kurz: Erneuerbare Energien Gesetz - EEG). Ziel des Gesetzes ist u.a. die Erhöhung des EE-Anteils auf 35 % des Stromverbrauchs bis 2020 im Rahmen des Vorantreibens der Energiewende und der EE als Alternative zu fossilen Energieträgern. Durch gezielte finanzielle Subvention regenerativ erzeugter Energien wird der Fortschritt in der technischen Entwicklung forciert und ein Anreiz zum Aufbau umweltfreundlicher Alternativen zur konventionellen Energieerzeugung bei gleichzeitiger Risikominderung für den Anlagenbetreiber gegeben. Die Vergütungsregelung ist an verbindliche Vorgaben für den Anlagenbetreiber gekoppelt, welche Aspekte der Ökologie, Nachhaltigkeit und Prozesssicherheit berücksichtigen. Im Jahre 2000 wurde die Urform des EEG verabschiedet. Als Folge der Novellierungen im Jahre 2004 und 2009 ergab sich stets ein Anstieg der installierten elektrischen Leistung und der Anlagenanzahl (**Abb. 22**), sodass die heutige Anzahl an BGA in Deutschland über 7500 Stück beträgt.



**Abb. 22: Bestandsentwicklung von BGA in Deutschland.** Anstieg in Anlagenanzahl und installierter elektr. Leistung einhergehend mit den Novellierungen des EEG.  
Quelle: **FNR, 2013e**.

Die aktuelle, seit dem 01.01.2012 gültige, Fassung stellt die dritte Novellierung des EEG dar. Dieser sind alle Neuanlagen, die ab diesem Zeitpunkt in das Stromversorgungsnetz einspeisen, unterworfen, während für Betreiber von Bestandsanlagen die Vorgaben des EEG 2009 gelten (§ 66 Abs. 1 Nr. 3 EEG). Die vereinfachte Vergütungsstruktur im EEG 2012 reduziert die Anzahl von Bonussubventionen, sodass der **Grundvergütungssatz**, gestaffelt nach elektr.

Leistung der Anlage, nur noch durch einen Bonus für die Gasaufbereitung oder Bioabfallvergärung sowie der Art des Substrats ergänzt wird. Dabei unterscheidet die Substratvergütung zwischen zwei **Einsatzstoffklassen**: Klasse I umfasst die klassischen Energiepflanzen wie Mais und Rübe, während Substraten der Klasse II, den wertvollen, nachhaltigen Ersatzstoffen wie Schweinegülle oder Wildblumen, höhere Vergütungen zuteilwerden. Neu in das EEG 2012 aufgenommen wurde eine Sonderförderung **kleiner, auf Gülle basierender Anlagen** mit einer Maximalleistung von 75 kW<sub>el.</sub> sowie höchstens 60 % Maisanteil im Substrat. Damit soll der übermäßigen Maisnutzung und Monokulturentwicklung vorgebeugt werden. Alternativ zur Einspeisung in ein lokales Versorgernetz ermöglicht das EEG 2012 Anlagenbetreibern die **Direktvermarktung** des erzeugten Stroms. In diesem Fall entfällt eine Vergütung nach o.g. Muster, jedoch erhält der Energiewirt zusätzlich zu den Verkaufserlösen eine **Marktprämie**, die sich aus dem monatlichen Mittelwert des Strompreises an der Strombörse EPEX und einer **Managementprämie** errechnet. Somit sinkt das unternehmerische Risiko und ein Anreiz für die dezentrale Erzeugung und Vermarktung von Energie wird geschaffen. Der Anlagenbetreiber kann zudem monatlich zwischen beiden Vergütungsmodellen wechseln oder anteilig seinen erzeugten Strom nach beiden Modellen vergüten lassen. Zur Förderung marktangepasster Energieerzeugung aus EE unterliegt die EEG-Einspeisevergütung einer **Degression**, sodass die Subventionshöhe jährlich sukzessive um einen festgeschriebenen Prozentsatz sinkt.

### **I.3.5 Stand der Forschung: Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen.**

Parallel zur Verbreitung landwirtschaftlicher BGA fokussierte sich die Forschung zur Optimierung des Gasertrags lange Zeit vorwiegend auf Aspekte des Anlagenbaus. Im Verlauf dieser Entwicklung konnte die operative und prozesstechnische Ausstattung von BGA verbessert werden, eine Erforschung unter mikrobiologischen Gesichtspunkten findet jedoch erst seit etwa zwei Dekaden statt. Viele Erkenntnisse wurden zunächst aus dem schon länger erforschten Bereich der Biogas-Gewinnung aus Kommunalabfall-Vergärung und Abwasserklärung auf landwirtschaftl. BGA übertragen. Aufgrund vergleichsweise weniger Studien im Bereich der mikrobiologischen Fermenterökologie methanogener Archaea in NawaRo-BGA stellen diese Erkenntnisse trotz einer zum Teil mangelnden Übertragbarkeit auf das landwirtschaftl. System wertvolle Hinweise dar. Obwohl die am anaeroben Abbau organischer Substrate beteiligten Stoffwechsellkaskaden im Allgemeinen gut verstanden sind (**I.2.2, I.2.4**), verbleiben die genauen Abläufe im Praxisfermenter eine „Black Box“ der mikrobiellen Ökologie. Durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden, wie gel-



elektrophoretischer Fingerprint-Analysen und Klonbibliotheken-Screening, organismenspezifischer Fluoreszenzmarkierung sowie quantitativer PCR- und Metagenom-Studien erfolgte dennoch der kultivierungsunabhängige Nachweis der beteiligten Spezies.

Trotz mannigfaltiger Betriebsparameter und Substratzusammensetzungen von Laborfermentern und BGA konnten auf Ebene der methanogenen Archaea wiederholt Vertreter der Ordnungen Methanomicrobiales, Methanobacteriales und Methanosarcinales identifiziert werden. Klonbibliothek- und qPCR-Analysen auf Basis der 16S rRNA- und *mcrA*-Gene, kodierend für eine rRNA der kleinen ribosomalen UE bzw. für die  $\alpha$ -UE der Methyl-CoM Reduktase methanogener Archaea, zeigten dabei für eine mesophil betriebene BGA mit Rindergülle/Maissilage-Kofermentation die Dominanz der Methanomicrobiales vor den übrigen Ordnungen (Nettmann *et al.*, 2008). Metagenom-Analysen der Gesamtbiozönose weiterer landwirtschaftl. BGA stimmen mit diesem Ergebnis überein und ergaben *Methanoculleus bourgensis* (Jaenicke *et al.*, 2011) bzw. *Mcu. marisnigri* (Wirth *et al.*, 2012) als dominante archaeelle Spezies. In einer 16S rRNA-basierten Studie der mikrobiellen Biozönose in einer mesophil betriebenen BGA zur Monovergärung von Schweinegülle wurde diese Art ebenso in Dominanz detektiert, daneben konnten in geringerer Abundanz *Msc. barkeri* und *Methanospirillum hungatei* in den Fermenterproben nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2009). Aus Studien über Gras- (Wang *et al.*, 2010) und rübenvergärenden Systemen sowie weiteren Fermentationsarten ist neben der Gattung *Methanosarcina* sp. zudem das Vorkommen der Gattung *Methanobacterium* sp. bekannt (Klocke *et al.*, 2007; Krakat *et al.*, 2010a). Außerhalb dieser „typischen“ Vertreter der archaeellen Biozönose in BGA ergeben insbesondere die Metagenom-Analysen auch weitere, ungewöhnliche und in geringerer Abundanz vorkommende Gattungen wie *Methanocorpusculum* und *Methanococcus* (Wirth *et al.*, 2012).

Unabhängig von der experimentellen Methodik wurden in landwirtschaftl. BGA in der Regel sowohl acetoklastische als auch hydrogenotrophe methanogene Archaea gefunden. Entgegen früherer Untersuchungen (Karakashev *et al.*, 2005) und den Erkenntnissen aus der kommunalen Abfallvergärung bzw. Siedlungswasserwirtschaft deuten jüngere Studien der Population methanogener Archaea in landwirtschaftl. BGA darauf hin, dass in der mesophilen Umsetzung von NawaRo hydrogenotrophe Mikroorganismen eine größere Prozessbedeutung haben bzw. in größerer Anzahl vorkommen, als (obligat) acetoklastische Archaea (Bauer *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2009; Krakat *et al.*, 2010a; Nettmann *et al.*, 2010).

Unter wechselnden Umwelt- und Prozessbedingungen (siehe I.3.3.2) verbleibt auch die Zusammensetzung der Population methanogener Archaea in BGA nicht statisch. In

gegenseitiger Abhängigkeit beeinflussen chemische und physikalische Parameter sowie die Art und Komplexität des Fermentersubstrats die Zusammensetzung der Population methanogener Archaea in Biogas produzierenden Prozessen. So haben insbesondere die Acetat-, VFA- und Ammoniakkonzentration weitreichenden Einfluss auf die Populationsgrößen der acetoklastischen *Methanosaeta* sp. und der metabolisch versatilen Gattung *Methanosarcina* sp.: Die Untersuchung einer Mais monovergärenden Anlage unter verschiedenen Acetatkonzentrationen ergab eine Dominanz von *Methanosaeta* sp. unterhalb einer Grenzkonzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Acetat. Bei höheren Konzentrationen, jedoch noch ohne Anzeichen für eine Übersäuerung, ergab sich eine Dominanz der Gattung *Methanosarcina* sp. sowie der hydrogenotrophen Ordnung der Methanobacteriales. Im übersäuerten Prozess nahm die Gesamtzahl methanogener Archaea ab, die Dominanz lag dann auf Seiten der hydrogenotrophen Gattungen *Methanoculleus* und *Methanospirillum* (Munk *et al.*, 2010). Dieser Zusammenhang wurde zuvor bereits für Anlagen zur Methanisierung von Feststoff-Kommunalabfall gezeigt (Griffin *et al.*, 1998; McMahon *et al.*, 2001). Der Vergleich von dänischen Praxisanlagen zur Fermentation von Gülle bzw. Abwasserschlämme ergab eine ähnliche Verteilung: In VFA- und ammoniakreichen Gülleanlagen dominierten Methanosarcinaceae, während unter den niedrigen Konzentrationen in Abwasserschlämme-Fermentern Methanosaetaceae dominierten (Karakashev *et al.*, 2005). Auch für hydrogenotrophe Archaea liegen Hinweise auf eine VFA-induzierbare Veränderung der Populationszusammensetzung vor: In thermophilen Kommunalabfall-Anlagen ergab sich mit Erhöhung der VFA-Konzentration ein Übergang der Dominanz von *Methanoculleus* sp. hin zu *Methanothermobacter* sp. (Hori *et al.*, 2006).

Änderungen in der Prozess**temperatur** haben nicht nur Bedeutung für die Struktur der Gesamtbiozönose, sondern im Besonderen auch auf die der archaeellen Population. In der Praxis scheinen kurzfristige und plötzliche Schwankungen stärker zur Störung der Fermenterflora beizutragen, als eine langsame Anpassung an sukzessiv höhere Temperaturen über einen langen Zeitraum hinweg. Die Reduzierung der Temperatur von  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Laborfermenter zur thermophilen Methanerzeugung aus Rübensilage und -saft führte zu einer reversiblen Erhöhung der morphologischen Diversität in der archaeellen Population. Wurden bei  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  stäbchenförmige Archaea der Ordnung Methanobacteriales nachgewiesen, so bestand die Population nach Absenken der Temperatur zusätzlich aus Vertretern von Methanosarcinaeae und Methanomicrobiales (Krakat *et al.*, 2010b). Während in thermophilen Prozessen neben hydrogenotrophen Gattungen oft auch das hauptsächlich acetoklastische Archaeon *Msc. thermophila*, einziger bekannter thermophiler Vertreter der Gattung

*Methanosarcina* (Garcia *et al.*, 2000), gefunden wird, scheint *Methanosaeta* sp. auch unter hohen Temperaturen nicht maßgeblich an der Methanogenese in NawaRo-BGA beteiligt zu sein (Demirel und Scherer, 2008). Auch bei der Fermentierung von Haushaltsabfall wurde mit der Verschiebung von mesophilen zu thermophilen Bedingungen eine Veränderung der methanogenen Biozönose hin zur Erhöhung der Zellzahl von *Methanoculleus* sp. und *Methanobacterium* sp. festgestellt, jedoch verblieb hier mit *Methanosarcina* sp. eine acetoklastische Gattung dominant. Die unter mesophilen Bedingungen noch dominante Gattung *Methanospirillum* sp. wurde unter den höheren Temperaturen nicht mehr gefunden. Das Fehlen der üblicherweise in Haushalts- und Kommunalabfallvergärung sowie Schmutzwasserreinigung detektierten *Methanosaeta* sp. (McHugh *et al.*, 2003) wurde mit einer Acetatkonzentration oberhalb der Wachstumstoleranz dieser Gattung begründet (Levén *et al.*, 2007). Ähnliche Ergebnisse erzielte eine weitere, 16S rRNA-basierende Studie zum Einfluss einer Temperaturerhöhung im Verlaufe einer Kovergärung von Rinderfäzes und Abfallstoffen aus der Oliven-Verarbeitung bei hohen Ammonium- und Acetatkonzentrationen: *Methanosarcina* sp. verblieb sowohl bei 37 °C als auch 55 °C dominant. Die höhere Temperatur ergab jedoch eine Reduzierung der Zellzahl dieses Archaeons bei gleichzeitiger Erhöhung der Abundanz von Vertretern der hydrogenotrophen Gattungen *Methanoculleus*, *Methanobacterium* und *Methanothermobacter*. Eine geringe Anzahl von *Methanosaeta*-Sequenzen wurde jedoch unter allen getesteten Bedingungen gefunden (Goberna *et al.*, 2010). Der Anstieg der Zellzahlen hydrogenotropher Archaea bei höheren Fermentationstemperaturen wird mit der thermodynamischen Erhöhung des H<sub>2</sub>-Partialdrucks mit steigender Temperatur begründet. Nach

$$(15) \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

wird die Gibbs'sche Bildungsenergie von H<sub>2</sub> negativer mit steigender Temperatur T und konstanter Enthalpie  $\Delta H$  und Entropie  $\Delta S$  (Lee und Zinder, 1988). Mit steigendem H<sub>2</sub>-Partialdruck erhöht sich das Substratangebot für hydrogenotrophe Archaea unter geschlossenen Fermentationsbedingungen um den Faktor fünf bis zehn im Vergleich zu mesophilen Bedingungen (Zinder, 1990). Eine zweite Begründung liegt in der höheren Adaptationsfähigkeit hydrogenotropher Archaea an höhere Temperaturbereiche (Chen, 1983; Krakat *et al.*, 2010c) bzw. einer höheren Toleranz gegenüber Ammonium (Angelidaki und Ahring, 1993; Nagamani und Ramasami, 1999) und anderen inhibitorisch wirksamen Substanzen im Vergleich zu acetoklastischen Archaea. Da die Erhöhung der Temperatur eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung NH<sub>3</sub> bewirkt (siehe I.3.3.2, Gleichung 14), ergibt sich daraus ein möglicher Mechanismus zur Selektion NH<sub>3</sub>-resistenterer Spezies unter

thermophilen Bedingungen. Doch auch unter mesophilen Bedingungen wurde bei hohen  $\text{NH}_3$ -Konzentrationen für eine Monofermentation von Schweinehaltungs-Abfällen die Abnahme von *Methanosarcina* sp. bei gleichzeitiger Zunahme von Vertretern der hydrogenotrophen Ordnung Methanomicrobiales gezeigt (**Angenent et al., 2002**). Die als Stäbchen bzw. Kokken ausgeprägte Morphologie der hydrogenotrophen Archaea, sowie die Assoziation von *Methanosarcina* sp. zu dichten Zellaggregaten scheinen dabei ein günstiges Oberflächen/Volumen-Verhältnis in Gegenwart hoher Ammoniumkonzentrationen und somit einen Vorteil gegenüber der langfilamentösen Morphologie obligat acetoklastischer *Methanosaeta* sp. darzustellen (**Demirel und Scherer, 2008; Goberna et al., 2010**).

Studien zum Einfluss der HRT bzw. der  $B_R$  auf die archaeelle Populationsdynamik in NawaRo-Fermentationsprozessen wurden bislang selten durchgeführt. Für diese konnte insbesondere bei  $B_R > 3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ein Ausdünnen der acetoklastischen methanogenen Archaea festgestellt werden, wohingegen hydrogenotrophe Archaea aufgrund ihrer geringeren Generationszeit in höherer Abundanz vorlagen (**Bauer et al., 2009**). Unterschreitet die HRT langfristig die Generationszeit der langsam wachsenden syntrophen VFA-Oxidierer und methanogenen Archaea, so tritt der oben beschriebene, selbstverstärkende Mechanismus der Populationsausdünnung in Kombination mit einer daraus bedingten pH-Absenkung in Kraft. Die schnell wachsenden, säuretoleranten Mikroorganismen der „Hydrolysephase“ werden davon zunächst weniger stark beeinflusst. Eine Studie zur entkoppelten Untersuchung der Wirkung von pH und HRT unter extrem-thermophilen Bedingungen ergab den pH-Wert als primären inhibitorischen Parameter: Eine HRT zwischen 2 und 6 Tagen bei pH 7 ermöglichte weiterhin eine zeitverzögerte Methan-Produktion (**Liu et al., 2008**). Die experimentellen Rahmenbedingungen der Studie wichen jedoch deutlich von den üblichen Parametern der landwirtschaftl. Biogas-Produktion aus NawaRo ab, sodass eine direkte Übertragbarkeit weiter zu prüfen ist. Anhand einer mesophilen Langzeit-Fermentation von Rübensilage im Labormaßstab konnte innerhalb der von hydrogenotrophen Archaea dominierten archaeellen Population eine Zunahme der Artenvielfalt infolge einer Absenkung der HRT auf bis zu 7,9 Tage gezeigt werden (**Krakat et al., 2010a**). Die Analyse der Klonbibliotheken ergab trotz dieser kurzen HRT noch Sequenzen der Familie Methanosarcinales. Trotz einer HRT von 3,6 Tagen konnte auf den in die Flüssigphase eingelassene Adhäsivflächen eines thermophilen Laborfermenters noch *Methanosarcina* sp. nachgewiesen werden (**Sasaki et al., 2006**).

### **I.3.6 Ziele der Arbeit**

Ein Großteil aktueller Forschungsvorhaben zur Identifizierung der mikrobiellen Biozönose in BGA erfolgte auf Basis kultivierungsunabhängiger, molekularbiologischer Methoden. In der vorgelegten Dissertation war im Rahmen des von der Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation geförderten Forschungsprojektes „Charakterisierung der methanogenen Archaeobakterien in landwirtschaftlichen NaWaRo-Biogasanlagen“ die Biodiversität dominanter Gattungen methanogener Archaea aus laufenden Praxis-BGA über DGGE, ARDRA und 16S-rRNA-Gen basierte Klonbibliotheken zu untersuchen. Darüber hinaus sollten im kultivierungsbasierten Hauptteil der Arbeit nachfolgend Vertreter der nachgewiesenen Gattungen aus dem Fermentersubstrat angereichert und, soweit möglich, über spezifische Isolierungsstrategien in Reinkultur überführt werden. Nach taxonomischer Identifizierung und Verifizierung sollten die erhaltenen Isolate mittels Fluoreszenzmikroskopie morphologisch charakterisiert und mit Referenzstamm-Kulturen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) verglichen werden. Ausgewählte Kulturen hydrogenotropher Archaea sollten aufgrund ihrer Relevanz für die Fermentationsprozesse in NawaRo-BGA zur Konstruktion artspezifischer FISH-Oligonukleotidsonden auf Basis der Sequenz des 23S rRNA-Gens herangezogen werden. So sollte innerhalb der Arbeit die Möglichkeit eines Direktnachweises konkreter Arten methanogener Archaea im Fermentersubstrat überprüft werden. Weiterhin sollten die Isolate zur Unterstützung der Quantifizierung der verschiedenen, im ersten Schritt der Arbeit in den untersuchten Praxis-BGA identifizierten, Gattungen mittels quantitativer PCR (qPCR) eingesetzt werden. Damit sollten die Grundlage für ein molekularbiologisches Schnellmonitoring mit Quantifizierung der Populationsgrößen für den Fermentationsprozess wichtiger Archaea geschaffen werden.

## Kapitel II - Material und Methoden

### II.1 Mikrobiologische Methoden

#### II.1.1 Laborinventar und Hilfsmittel

Zur Durchführung der experimentellen Arbeiten wurden die folgenden Laborgeräte der aufgeführten Hersteller genutzt:

Gerät	Hersteller	Modell(e)
Anaerobenzelt	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA</li> </ul>	Vinyl anaerobic chamber, Type B
Autoklaven	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald (Integra Biosciences GmbH)</li> <li>Systec GmbH, Wettenberg</li> </ul>	FVS/1 VX
Einstabmesskette (pH-Metrie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mettler Toledo GmbH, Gießen</li> </ul>	Inlab Expert
Elektrophoresekammer (Agarose-GE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biorad, Laboratories GmbH, München</li> </ul>	- Sub-Cell <sup>®</sup> Model 96 - Wide Mini-Sub
Elektrophoresekammer (DGGE)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biorad, Laboratories GmbH, München</li> </ul>	D GENE <sup>™</sup> System
Exsikkator	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oerlikon Leybold Vacuum GmbH, Köln</li> </ul>	Trivac D 4B
Fluoreszenzmikroskope	<ul style="list-style-type: none"> <li>Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena</li> <li>Keyence Deutschland, Neu-Isenburg</li> </ul>	Axioplan/Axiophot 2 mit Fluoreszenzfilter 395-44, FT460, LP470 Biozero BZ8000 mit Fluoreszenzfilter HC-434/17, HC-BS 452, HC-458RS (AHF Analysetechnik, Tübingen)
Geldokumentationseinheit	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vilber Lourmat, Eberhardzell</li> </ul>	CN-3000-WL/LC Infinity
Heizrührplatte	<ul style="list-style-type: none"> <li>Variomag, Daytona Beach, USA</li> </ul>	Multitherm
Hybridisierungssofen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sheldon Manufacturing Inc, Cornelius, USA</li> </ul>	Shel Lab Model 1012
Inkubationsschüttler	<ul style="list-style-type: none"> <li>New Brunswick Scientific, Nürtingen (Eppendorf AG, Hamburg)</li> </ul>	- G-25 - Innova 4340 - Excella E24

Kolbenhubpipetten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf AG, Hamburg</li> </ul>	research
Kühlzentrifuge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heraeus Christ, Hanau</li> </ul>	Cryofuge 5000, Rotor 5260
Labor- & Feinwaagen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sartorius AG, Göttingen</li> </ul>	- Laboratory L610 - Analytic A120S
Reinstwasseranlage	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Merck-Millipore, Darmstadt</li> </ul>	RiOs 30 mit Milli-Q Plus 185
Phasenkontrastmikroskop	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leitz, Wetzlar</li> </ul>	SM LUX
pH-Meter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schott, Hofheim</li> </ul>	CG840
Schüttelagitatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IKA®-Werke GmbH &amp; CO. KG, Staufen</li> <li>• Scientific Industries Inc, Bohemia, USA</li> <li>• Starlab GmbH, Hamburg</li> </ul>	Vibrofix VF1 Electronic  Vortex Genie 2  Vortex Wizard
Schüttel-Heizblöcke	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HLC BioTech, Bovenden</li> <li>• Eppendorf AG, Hamburg</li> </ul>	HTM 130 Thermomixer Comfort
Software <sup>1)</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CLC bio, Aarhus, Dänemark</li> <li>• Vilber Lourmat, Eberhardzell</li> <li>• Geospiza Inc., Seattle, USA</li> <li>• <b>Tamura <i>et al.</i>, 2011</b></li> <li>• <b>Chun <i>et al.</i>, 2007</b></li> <li>• <b>Kim <i>et al.</i>, 2011</b></li> <li>• U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA</li> </ul>	CLC Sequence Viewer 5.8 und 6.7.1 Bio1D 15.02 FinchTV 1.4.0 MEGA 5.1 EzTaxon Server 2.1 EzTaxon-e cloud NCBI MegaBLAST
Spannungsquelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VWR International GmbH, Darmstadt</li> </ul>	- Power Source 300V - Power Source 250V
Thermocycler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biorad, Laboratories GmbH, München</li> <li>• Eppendorf AG, Hamburg</li> </ul>	S1000 <sup>TM</sup> Thermal Cycler  Mastercycler gradient
Thermocycler (qPCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf AG, Hamburg</li> </ul>	Realplex <sup>2</sup> ep gradient Mastercycler
Tiefkühltruhen (-70 °C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heraeus Instruments, Osterode</li> <li>• Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss</li> </ul>	Herafreeze HFC386STD-V14 Comfort GT, 572 L
Tischzentrifuge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eppendorf AG, Hamburg</li> </ul>	5415D
Trockenschränke	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Binder GmbH, Tuttlingen</li> <li>• Köttermann GmbH &amp; Co KG, Uetze/Hänigsen</li> </ul>	FD 53 L 2736

Ultraschallbad	• Bandelin Electronics, Berlin	Sonorex RK 106
Vakuum-Zentrifuge	• Eppendorf AG, Hamburg	Concentrator 5301
Wasserbad	• PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal-Zellerfeld	Haake C10

<sup>1</sup>ausgenommen Betriebssoftware: Alle Laborgeräte wurden mit der vom Hersteller mitgelieferten Betriebssoftware angesteuert.

### II.1.2 Chemische Substanzen

Folgende Chemikalien der angegebenen Hersteller wurden verwendet:

Chemische Substanz	Hersteller
• Acrylamid, Bisacrylamid (37%)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
• Acrylamid, Rotiphorese 40 (40%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• <i>p</i> -Aminobenzoesäure (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (ehemals Fluka, Neu-Ulm)
• Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Biotin (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• <i>D</i> -Calciumpantothenat (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
• Cystein-Hydrochlorid (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> ClNO <sub>2</sub> S)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Eisensulfat (FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
• Eisessig (CH <sub>3</sub> COOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Ethanol, reinst (99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Ficoll 400	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Folsäure (C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Harnstoff (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Hefeextrakt	Marcor, New Jersey, USA
• Isopropanol (2-Propanol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Kaliumaluminiumsulfat (KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
• <i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Kalium( <i>di</i> -)hydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Kobaltsulfat (CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
• Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Liponsäure (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe



• Mangansulfat ( $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Natriumacetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Natriumformiat ( $\text{HCOONa}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
• Natriumsulfid ( $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Natriumselenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Natronwasserglas	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Niacin ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Nickelchlorid ( $\text{NiCl} \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA, Darmstadt
• Nitrilotriessigsäure ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Nonidet P40	AppliChem GmbH, Darmstadt
• PVPP K25	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Pyridoxin-HCl ( $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt
• Resazurin ( $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_4$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (ehemals Riedel-deHaën, Seelze)
• Riboflavin ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ )	Merck KGaA, Darmstadt
• Schwefelsäure (96 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Thiamin-HCl ( $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Vitamin B <sub>12</sub> ( $\text{C}_{63}\text{H}_{91}\text{CoN}_{13}\text{O}_{14}\text{P}$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem allgemeinen Laborstandard und wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim oder Merck KGaA, Darmstadt im analytischen Reinheitsgrad bezogen.

### II.1.3 Biochemikalien und Enzyme

Es fanden folgende Biochemikalien Verwendung innerhalb der experimentellen Arbeiten:

<b>Biochemikalie/Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
• Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Desoxynukleotidmix (je 2,5 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
• DNA-Ladepuffer, 6 x	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• DNA-Größenstandard GeneRuler™	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• $\text{MgCl}_2$ (PCR-fähige Lösung)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

• Reaktionspuffer Y for high yields	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
• Restriktionsendonuklease <i>HaeII</i> , (20000 U mL <sup>-1</sup> )	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
• Restriktionsendonuklease <i>HaeIII</i> , (20000 U mL <sup>-1</sup> )	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
• Restriktionsendonuklease <i>SmaI</i> , (10000 U mL <sup>-1</sup> )	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• Restriktionsendonuklease <i>XhoI</i> , (10000 U mL <sup>-1</sup> )	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• Restriktionspuffer NEB4	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
• Restriktionspuffer Tango	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• Rinderserumalbumin (Fraktion V Albumin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Roti®-Mount FluorCare	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
• Taq DNA-Polymerase Gold, 5 U µL <sup>-1</sup>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
• Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
• Universal-Agarose peqGold	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

### II.1.4 Verbrauchsmaterialien und Reaktionskits

Folgende Reaktionskits und Einwegmaterialien wurden verwendet:

<b>Reaktionskit/Einwegware</b>	<b>Hersteller</b>
• DNA-Aufreinigungskit	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• DNA-Extraktionskit GeneMATRIX Stool Purification Kit	EUR <sub>X</sub> Ltd., Danzig, Polen
• DNA-Gelextraktionskit QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
• Kanülen, Ø verschieden	Rose GmbH, Trier
• Klonierungskit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Carlsbad, USA
• Pipettenspitzen, für die DGGE-Beladung	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• Pipettenspitzen, verschiedene Volumina	Starlab GmbH, Hamburg
• PCR-Gefäße, V = 200 µL	Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA
• qPCR-Gefäße, 8er-Streifen, klar, V = 200 µL	Corning Inc., Tewksbury, USA
• qPCR-Gefäße, 8er-Streifen, weiß, V = 200 µL	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot
• qPCR Maxima SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St-Leon-Rot

- |  |   |
|--|---|
| • Reaktionsgefäße, V = 1,5 mL & 2,0 mL   | Eppendorf AG, Hamburg   |
| • Schlauchverbindungen, Tygon <sup>®</sup> - und Noreprene <sup>®</sup> -Serie | MG Silikon GmbH, Wiesbaden<br>(Saint-Gobain Performance Plastics) |
| • Spritzen, gasdicht, V = 1 mL   | Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien                               |
| • Spritzen-Vorsatzfilter, Ø = 0,2 µm   | VWR International GmbH, Darmstadt                                 |
| • Vakuum-Filtrationseinheit, PES-Membran, Ø = 0,2 µm                           | VWR International GmbH, Darmstadt                                 |

### II.1.5 Gase für die anaerobe Kultivierung

Sämtliche hier aufgeführte Gase wurden von der Firma **Westfalen AG, Münster** bezogen, vertreten durch die Logistikdistribution Worms. Bei kultivierungsrelevanten Gasen wurde ein Sauerstoffgehalt von 100 ppm nicht überschritten

Gas	Zusammensetzung und Reinheit
• Gemisch Wasserstoff/Kohlendioxid	80 % H <sub>2</sub> , 20 % CO <sub>2</sub> , (v/v)
• Stickstoff	100% N <sub>2</sub> 4.5 (= 99,995 %, v/v)
• Formiergas	95 % N <sub>2</sub> , 5 % H <sub>2</sub>
• Formiergas	80 % N <sub>2</sub> , 20 % H <sub>2</sub>

### II.1.6 Antibiotika

Zur Erstellung von Reinkulturen und Schutz vor Kontaminationen durch bakterielle Populationen wurden die folgenden Antibiotika in den aufgelisteten Stammlösungskonzentrationen angefertigt. Die Endkonzentration im Medium war gegenüber dieser 1:1000 verdünnt.

Antibiotikum	Hersteller	Konzentration [mg mL <sup>-1</sup> ] (Lösungsmittel)
• Ampicillin (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	100 (H <sub>2</sub> O <sub>Reinst</sub> )
• Bacitracin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	50(H <sub>2</sub> O <sub>Reinst</sub> )
• Cycloserin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	20 – 100 (H <sub>2</sub> O <sub>Reinst</sub> )
• Erythromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	20 (Ethanol)
• Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	100 (H <sub>2</sub> O <sub>Reinst</sub> )
• Rifampicin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	20 – 100 (Methanol)
• Tetracyclin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	15 (DMSO)
• Vancomycin-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	50 (DMSO)

### II.1.7 Referenzorganismen und Kulturbedingungen

Zur Gewinnung von Referenzmaterial für molekularbiologische Untersuchungen und zum Einsatz in morphologischen Vergleichen wurden Typstämme methanogener Archaea von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) bezogen. Die als Aktivkulturen vorliegenden Referenzstämme wurden anaerob mit einem Überimpfvolumen von 10 % [v/v] in flüssiges Nährmedium überführt, um eine Zellproliferation und einen konstanten Vorrat zu gewährleisten. Passende Flüssigkulturmedien wurden anhand des DSMZ-Katalogs ausgewählt und zum Teil so modifiziert, dass sie sich auch für eine Anwendung als Selektivmedien eigneten (siehe **II.1.9**). Ein Überblick über die im Einzelnen im Verlauf der vorliegenden Arbeit Stämme bezogenen Referenzstämme bietet **Tabelle 12**. *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>, *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>, *Mm. hollandica* DMS1<sup>T</sup> und *Mm. thermophila* L2FAW<sup>T</sup> wurden in DSM-Medium 318 kultiviert. Dieses wurde spezifisch für die Isolierung methylotropher Archaea modifiziert (im Folgenden als DSM 318P bezeichnet). Für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> wurde das für die Anreicherung hydrogenotropher Archaea modifizierte DSM-Medium 287 eingesetzt. *Mst. concilii* DSM 3013 und *Mcu. bourgensis* DSM 3045<sup>T</sup> wurden in den unmodifizierten DSM-Medien 334 bzw. 332 angezogen. In allen Medien, denen laut DSMZ-Vorgaben eine Schlammkomponente (das sog. "sludge fluid") als komplexe Nährflüssigkeit zuzugeben werden sollte, wurde dieses gegen 5 % [v/v] steriles Filtrat der Fermenterflüssigkeit aus BGA ersetzt. Das Wachstum der mesophilen Typstämme erfolgte durch Inkubation bei 39 °C, während *Mm. thermophila* DSM 17232<sup>T</sup> eine Temperatur von 50 °C benötigte. Im Fall der hydrogenotrophen Typstämme der Gattung *Methanobacterium* sowie bei *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> erfolgte die Inkubation dabei unter kontinuierlichem Schütteln mit 120 U min<sup>-1</sup>. Die methylotrphen bzw. acetoklastischen Referenzstämme wurden statisch inkubiert.

**Tab. 12: Überblick über die im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenzorganismen.** Sämtliche methanogenen Archaea wurden als Aktivkultur in Flüssigmedium von der DSMZ bezogen.

Referenzorganismus	DSMZ-Nummer <sup>1)</sup>	Medium <sup>2)</sup>	T [°C]	Morphologie	Methanogenese <sup>3)</sup>
<i>Methanobacterium aarhusense</i> H2-LR <sup>T</sup>	15219 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium alcaliphilum</i> WeN4 <sup>T</sup>	3387	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium bryantii</i> M.o.H. <sup>T</sup>	863 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium congolense</i> C <sup>T</sup>	7095 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium ferruginis</i> Mic6c05 <sup>T</sup>	21974 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium formicicum</i> MF <sup>T</sup>	1535 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	22026 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium oryzae</i> FPi <sup>T</sup>	11106 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium palustre</i> F <sup>T</sup>	3108 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	22353 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium subteraneum</i> A8p <sup>T</sup>	11074 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanobacterium uliginosum</i> P2St <sup>T</sup>	2656 <sup>T</sup>	mod. 287	39	Stäbchen in Ketten	H
<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	3045 <sup>T</sup>	332	39	Irreguläre, solitäre Kokken	H
<i>Methanosaeta concilii</i> FE	3013	334	39	lange Filamente	A
<i>Methanosarcina barkeri</i> MS <sup>T</sup>	800 <sup>T</sup>	mod. 318	39	Pakete in Zellhaufen	H, M, A
<i>Methanosarcina mazei</i> S-6 <sup>T</sup>	2053 <sup>T</sup>	mod. 318	39	Pakete in Zellhaufen	H, M, A
<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DMS1 <sup>T</sup>	15978 <sup>T</sup>	mod. 318	39	Kokken	M
<i>Methanomethylovorans thermophila</i> L2FAW <sup>T</sup>	17232 <sup>T</sup>	mod. 318	50	Kokken	M

<sup>1)</sup>T = Typstamm

<sup>2)</sup>DSMZ-Medienkatalognummer

<sup>3)</sup>hydrogenotropher (H), methylotropher (M) oder acetoklastischer (A) Pfad der Methanogenese

### II.1.8 NaWaRo-Biogasanlagen und Probennahme

Im Rahmen der Arbeit wurden fünf landwirtschaftliche Praxis-Biogasanlagen beprobt. Es handelte sich dabei um einstufige Anlagen, in denen sämtliche Stoffwechselprozesse der Substratvergasung parallel zueinander in einem Kompartiment abliefen. Des Weiteren gehören die Fermenter aller Anlagen zu dem komplett durchmischten Typ (CSTR). Die jeweiligen Betriebsparameter im Beprobungszeitraum sind in **Tab. 13** zusammengefasst. Eine Gemeinsamkeit aller Anlagen bestand hinsichtlich der Substratmischung. Die Beschickung der Fermenter erfolgte mit Rindergülle als Flüssigkomponente und Maissilage als NawaRo-Festkomponente. Daneben wurden verschiedene Substrate in wechselnden Anteilen zugefügt. Fermenterproben für die Anreicherung und Kultivierung von methanogenen Archaea wurden aus dem Probenauslass entnommen und vor Ort in gasdichte, sterile Gefäße überführt und für die weitere Bearbeitung direkt ins Labor verbracht. Hier wurden die Proben unmittelbar aufgearbeitet und geeignete Wachstumsmedien mit dem Material angeimpft (siehe **II.1.9**). Weiterhin wurden Reaktorproben mittels eines temperierbaren Wasserbads zur Entnahme von Aliquots für Laborarbeiten bei 39 °C in Serumflaschen gelagert. Die Gasproduktion durch Methanogenese lief hierbei weiterhin ab. Um eine Gasakkumulation in Laborräumlichkeiten zu vermeiden, wurden die Probengefäße über gasdichte Schläuche mit der Abluftanlage verbunden, sodass während der Lagerung produziertes Gas abgeleitet werden konnte. Aliquots von Fermenterproben wurden parallel dazu bei -18 °C (kurzfristige Aufbewahrung bis zu einem Monat) und bei -70 °C (Langzeitlagerung) eingefroren. Diese Proben dienten als Ausgangsmaterial für die Extraktion genomischer Gesamt-DNA.

### II.1.9 Nährmedien

Das Erstellen von Anreicherungs- und Reinkulturen methanogener Archaea aus dem Fermentersubstrat beprobter Praxis-Biogasanlagen erfolgte auf Basis verschiedener, von der DSMZ empfohlenen, Nährmedien. Diese wurden in Bezug auf die C-Quelle so modifiziert, dass die Nährstoffanforderungen jeweils eines spezifischen methanogenen Zielorganismus erfüllt wurden. Jedes Wachstumsmedium wurde in zwei Varianten erstellt: Einer Anreicherungs- und einer Selektivvariante. Für die Anreicherung methanogener Archaea allgemein oder spezifischer Gattungen wurde eine Vollmedium-Variante entwickelt. Bei dieser erfolgte die Zugabe von 5 % [v/v] steril filtriertem Fermentersubstrat als komplexer Zusatz. Dadurch konnten zum einen Fermenter- bzw. Substratbedingungen in den Batch-Kultivierungen simuliert und zum anderen wachstumsfördernde Effekte, welche in Vorabexperimenten ermittelt wurden, ausgenutzt werden. Wie in den Medien zur Kultivierung von DSMZ-Typstämmen

**Tab. 13: Anlagenparameter der untersuchten NaWaRo-Praxis-Biogasanlagen.** Angaben Erfassungsstand Oktober 2008 (initiale Probennahme).

	BGA Arenrath	BGA Kaschenbach	BGA Wallhalben	BGA Niederweiler	BGA Obere Blies
<b>Fermenter</b>	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	LRW/TMRW <sup>1)</sup>	TMRW <sup>1)</sup>	TMRW <sup>1)</sup>	LRW/TMRW <sup>1)</sup>	LRW/TMRW <sup>1)</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.400	1 x 700	1 x 1.200	1 x 1.250	2 x 1.260
<b>Nachgärer</b>	Rührkessel	Rührkessel	Entfällt	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	TMRW <sup>1)</sup>	LRW/SM <sup>1)</sup>	Entfällt	TMRW <sup>1)</sup>	TMRW <sup>1)</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.400	1 x 1.100	Entfällt	1 x 1.250	1 x 1.260
<b>Inputstoffe<sup>2)</sup></b>					
fest [t d <sup>-1</sup> ]	MS/ GS/ SBS/ HM [15/8/2/3]	MS/GS [17/1]	MS/ GS/ FM [8/1,5/1,5]	MS/ GS/ FM [8/3/1]	MS/ GS/ FM [10/5/3,5]
flüssig [m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup> ]	RG [14]	RG [11]	RG [8]	RG [15]	RG [8]
<b>BHKW<sup>1)</sup> Leistung</b>	535 kW P <sub>el</sub>	300 kW P <sub>el</sub>	190 kW P <sub>el</sub>	345 kW P <sub>el</sub>	345 kW P <sub>el</sub>
<b>pH</b>	7,7	7,6	7,6	7,8	7,7
<b>T [°C]</b>	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C
<b>NH<sub>4</sub>-N [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	250 - 13000	< 100 - 500	200 - 2000	NB <sup>1)</sup>	< 100 - 300
<b>Gesamtsäure [mg kg<sup>-1</sup>]</b>	1800-3400	NB <sup>1)</sup>	1500-1800	NB <sup>1)</sup>	1600-1800

<sup>1)</sup>LRW = Längsachsrührwerk, SM = Stabmixer, TMRW = Tauchmotorrührwerk, BHKW = Blockheizkraftwerk, NB = nicht bestimmt

<sup>2)</sup>HM = Hühnermist, FM = Festmist, GS = Grassilage, MS = Maissilage, RG = Rindergülle, SBS = Sonnenblumensilage

(siehe II.1.7) wurden jegliche Schlammzusätze gegen dieses Reaktorfiltrat ersetzt. Auch komplexe Zusätze wie Hefeextrakt oder tryptisch verdaute Peptone konnten für eine allgemeine Anzucht durch Zugabe des Reaktorfiltrats ersetzt werden. Zur Anfertigung des Reaktorfiltrats wurde zunächst Fermentersubstrat für 4 h bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, um eine Sedimentierung grober Pflanzenpartikel zu erreichen. Der viskose Überstand wurde dann mittels Vakuum-Filtrationseinheiten steril filtriert. Das Filtrat wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gekühlt aufbewahrt. Sämtliche als komplexe Vollmedienvarianten erstellten Nährmedien wurden mit dem Namenszusatz "F" gekennzeichnet (z.B. DSM 287F). Sämtliche Medien des DSMZ-Katalogs sind für die Kultivierung der entsprechenden, kommerziell erhältlichen Mikroorganismen-Typstämme ausgelegt. Aufgrund komplexer Zusätze sind sie jedoch als heterotrophe Nährmedien in unmodifiziertem Zustand für Isolierungszwecke nicht geeignet, da keine spezifische Selektivität gegeben ist. Um selektive Varianten herzustellen, wurden sämtliche komplexe Zusätze entfernt und die Einwaage auf ein methanogenes Substrat begrenzt. So konnte das Medium auf die Nährstoffanforderungen spezifischer Gattungen zugeschnitten werden. Um einem Mangel an Spurenelementen oder Vitaminen in solchen Selektivmedien entgegenzuwirken, wurde je 1 % [v/v] der Spurenelement- und Vitamin-Stammlösung nach Vorgaben des DSMZ-Mediums 141 (Tab. 14) hinzugefügt. Solcherart modifizierte Nährmedien wurden mit dem Namenszusatz "P" gekennzeichnet (z.B. DSM 287P).

**Tab. 14: Spurenelement- und Vitaminlösungen als Flüssignährmedienzusatz zur Kultivierung methanogener Archaea.** Einwaagen nach DSMZ Medium 141

Spurenelement-Lösung <sup>1)</sup>		Vitaminlösung <sup>1)</sup>	
Chemische Substanz	Einwaage (g L <sup>-1</sup> )	Chemische Substanz	Einwaage (mg L <sup>-1</sup> )
Nitrilotriessigsäure	1,50	Biotin	2,00
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	3,00	Folsäure	2,00
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,50	Pyridoxin-HCl	10,00
NaCl	1,00	Thiamin-HCl	5,00
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,10	Riboflavin	5,00
CoSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,18	Niacin	5,00
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,10	D-Ca-Pantothenat	5,00
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,18	Vitamin B <sub>12</sub>	0,10
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,01	p-Aminobenzoesäure	5,00
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	0,02	Liponsäure	5,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,01		
NiCl × 6 H <sub>2</sub> O	0,03		
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,30		

<sup>1)</sup>Lösungsmittel vollentsalztes Wasser



Das Zusammenführen der flüssigen und festen Nährmedienbestandteile erfolgte zunächst unter Ausschluss der benötigten reduzierenden Agenzien Cystein-HCl und  $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ . Nach Entgasung im Vakuum-Exsikkator für 30 min erfolgte das Einstellen des pH-Wertes auf pH 6,5 - 6,8 durch Titration mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Unter strikt anaerober 95 %  $\text{N}_2$ / 5 %  $\text{H}_2$ -Atmosphäre erfolgte daraufhin in einem Anaerobenzelt die Zugabe der reduzierenden Agenzien. Eine ausreichende Reduzierung des Nährmediums wurde durch den Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin ins Farblose angezeigt. Dabei wird das dunkelblaue Resazurin in einer zweistufigen Reaktion zunächst zum rosafarbenen Resorufin irreversibel reduziert. Bei weiterer Reduzierung entsteht daraus dann reversibel das farblose Dihydroresorufin (**Twigg, 1945**). Ein späteres Eindringen von Sauerstoff in die Kulturgefäße würde mit einer starken Rosafärbung einhergehen, da  $\text{O}_2$  als starker Elektronenakzeptor die Rückreaktion bzw. Oxidation zum Resorufin bewirkt. Sämtlichen Nährmedien wurde der Indikator in einer Endkonzentration von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  zugefügt. Nach Aliquotierung des Mediums in Anaeroben-Kulturröhrchen nach Hungate (**Attebery und Finegold, 1969**) und Serum- bzw. Injektionsflaschen (**Miller und Wolin, 1974**) wurden die Kulturgefäße mit Butylsepten gasdicht verschlossen und mit Loch-Gewindekappen bzw. Aluminium-Bördelkappen gesichert (alle Kulturgefäße und Butylsepten: Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden-Lenglern). In einem zweiten Entgasungsschritt wurde an einer Begasungsstation in jedem Kulturgefäß individuell Vakuum erzeugt, um sowohl die Formiergasatmosphäre, als auch gelöste Restsauerstoffmengen zu entfernen. Diese Unterdruckbehandlung wurde so lange fortgesetzt, bis keine Gasbläschen mehr aus der Flüssigphase austraten. Anschließend wurde auf Medien zur Kultivierung hydrogenotropher Archaea (Medium DSMZ 287, **DSMZ, 2007a** und Medium DSMZ 332, **DSMZ, 2007b**) 1,2 bar 80 %  $\text{H}_2$ / 20 %  $\text{CO}_2$ , auf Medien zur Kultivierung acetoklastischer oder methylotropher Archaea, wie DSMZ 318 (**DSMZ, 2007c**) und DSMZ 334 (**DSMZ, 2007d**), 0,5 bar  $\text{N}_2$  aufgespresst. Im Verlauf der Herstellung strikt anaerober Medien für hydrogenotrophe Archaea wurde das Mediumvolumen so gewählt, dass stets eine 1:4 Volumenverteilung zwischen Flüssig- und Gasphase im Kulturgefäß erhalten blieb. Diese Verteilung und die Zusammensetzung der Gasphase ist der Stöchiometrie der hydrogenotrophen Methanogenese geschuldet. In deren Verlauf wird ein Molekül  $\text{CO}_2$  mit den Elektronen aus vier Wasserstoffmolekülen reduziert, um ein Molekül Methan zu erzeugen. Abschließend wurden die Kulturgefäße durch feuchte Hitze im Autoklaven bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 min sterilisiert. Als Basis für die Kultivierung acetoklastischer methanogener Archaea wurden die Medien DSMZ 318 und DSMZ 334b verwendet (**Tab. 15**). Medium 318 enthielt als Kohlenstoffquelle Methanol und diente der selektiven Anreicherung von Vertre-

tern der Gattung *Methanosarcina*. Weiterhin sind Spezies dieser Gattung in der Lage, sowohl  $H_2/CO_2$  (hydrogenotroph) als auch Acetat (acetoklastisch) zu verwerten, ebenfalls ein besonderes Kennzeichen dieser Gruppe.

Das Medium DSMZ 318 wurde noch in weiteren Modifikationen eingesetzt, um einerseits Kulturen genauer auf Substratspezifität untersuchen zu können, andererseits Substratpräferenzen einzelner Gattungen in einer Anreicherungskultur für die Erstellung von Reinkulturen selektiv nutzen zu können. Dabei wurde in der als Medium 318A bezeichneten Modifikation Methanol und Hefeextrakt durch  $2\text{ g L}^{-1}$  Acetat ersetzt. Es erfolgte keine Zugabe von Reaktorfiltrat, um zu gewährleisten, dass Acetat als einzige Kohlenstoffquelle vorlag. Da auch einige Eubakterien Methanol als Wachstumssubstrat nutzen können, wurde in der Modifikation 318B Methanol durch Dimethylamin ersetzt. Schließlich wurde im Medium 318P auf die Zugabe von Reaktorfiltrat und Hefeextrakt verzichtet, so dass Methanol als einzig mögliche Energiequelle verblieb. Die durch den Verzicht auf komplexe Supplemente erzeugten selektiveren Kultivierungsbedingungen führten zu einer signifikanten Verminderung der Begleitflora in den Anreicherungsansätzen. Allerdings war häufig auch ein deutlich vermindertes Wachstum der Zielorganismen zu beobachten. Auch war festzustellen, dass Kulturen nach mehrmaligem Überimpfen in Minimalmedien nicht mehr anwuchsen. Daher wurde im weiteren Verlauf verstärkt auf den Einsatz von Antibiotika gesetzt, um die Begleitflora zu inhibieren.

Das Medium DSMZ 334 diente der Anreicherung obligat acetoklastischer Methanbakterien aus der Gattung *Methanosaeta*. Das Medium ist allerdings nur bedingt selektiv, da die eingesetzte Energiequelle Acetat, wie oben beschrieben, auch von Mikroorganismen der Gattung *Methanosarcina* als Wachstumssubstrat genutzt werden kann. Da *Methanosaeta* jedoch eine höhere Affinität zu Natriumacetat aufweist, hat diese Gattung in Medien mit geringeren Natriumacetat-Konzentrationen einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Gattungen methanogener Archaea, insbesondere gegenüber *Methanosarcina* sp.

**Tab. 15: Zur Kultivierung methanogener Archaea verwendete Nährmedien (modifiziert nach DSMZ).** Sämtliche Medien beinhalteten je 0,5 g L<sup>-1</sup> Cystein-HCl und NaS<sub>2</sub> x 9 H<sub>2</sub>O, 1 mL L<sup>-1</sup> einer 0,1 % [w/v] Resazurin-Lösung sowie in der Anreicherungsvariante („F“) 5 % [v/v] Reaktorfiltrat.

Chemikalie/Lösungsmittel	Nährmedium (V = 1 L) <sup>3)</sup>			
	DSM 287 <sup>1)</sup>	DSM 318 <sup>2)</sup>	DSM 332 <sup>1)</sup>	DSM 334b <sup>2)</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,300 g	0,300 g		0,300 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,300 g		0,400 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,300 g			
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,150 g			
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O		0,100 g	0,100 g	0,100 g
NaCl	0,500 g	0,600 g		0,600 g
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,100 g			
NH <sub>4</sub> Cl	2,000 g	1,000 g	1,000 g	1,000 g
NaHCO <sub>3</sub>	4,000 g			4,000 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>			1,500 g	
Natriumacetat	2,000 g		1,000 g	6,000 g
Natriumformiat			5,000 g	
Methanol		5,000 mL		
Hefeextrakt <sup>4)</sup>		0,500 g	1,000 g	
Tryptikase <sup>4)</sup>			1,000 g	
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,002 g			
Spurenelementlösung (DSMZ-Medium 141)	5,000 mL	10,000 mL	10,000 mL	10,000 mL
Vitaminlösung (DSMZ-Medium 141)	5,000 mL	10,000 mL	10,000 mL	10,000 mL

<sup>1)</sup>Gasphase 1 bar 80% H<sub>2</sub>/ 20% CO<sub>2</sub>; <sup>2)</sup>Gasphase 1 bar N<sub>2</sub>; <sup>3)</sup>Lösungsmittel vollentsalztes Wasser

<sup>4)</sup>Nicht in den Selektivvarianten (Namenszusatz „P“) zur Isolierung spezifischer methanogener Archaea

### **II.1.10 Methoden für die Isolierung methanogener Archaea aus BGA- Fermenter-substrat**

Der Prozess zur Gewinnung von Reinkulturen methanogener Archaea ist in zwei Teile zu unterteilen. In einem ersten Schritt erfolgte die allgemeine Anreicherung archaeeller Mikroorganismen aus dem Fermentersubstrat der beprobten Praxis-Biogasanlagen. Anschließend fand durch an die Genus- oder speziesspezifischen physiologischen Anforderungen angepasste Nährmedien die Selektion und Isolierung einzelner methanogener Archaea statt. Dabei wurden drei Isolierungsstrategien verfolgt und miteinander kombiniert, um Reinkulturen methanogener Archaeen zu erhalten.

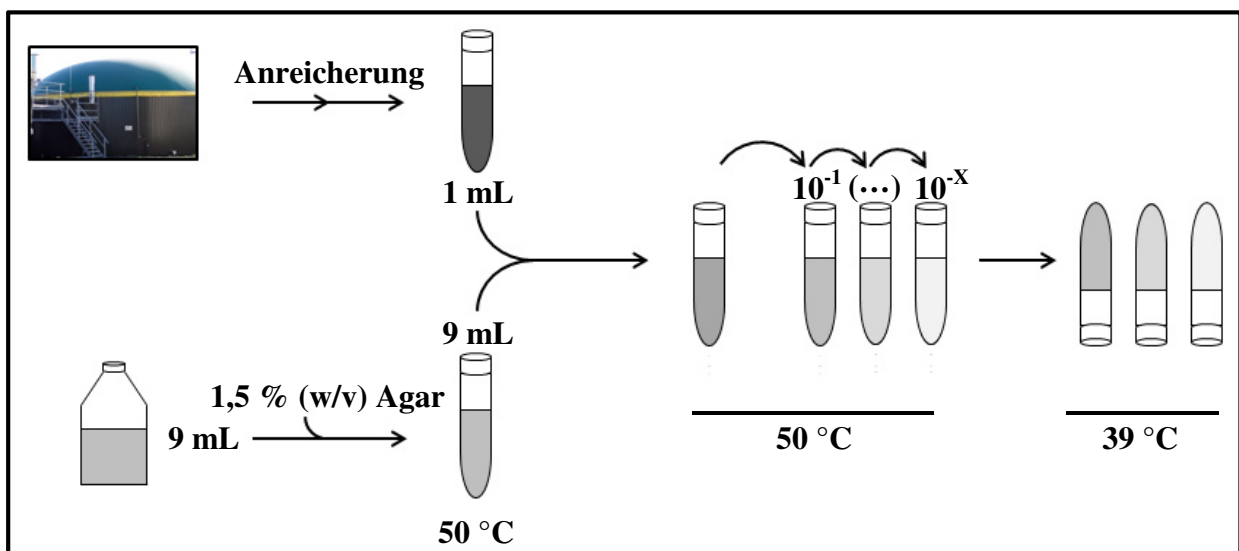
Die allgemeine Anreicherung hydrogenotropher methanogener Archaea erfolgte in DSMZ 287F-, die Anreicherung der methylotrophen methanogenen Archaea in DSMZ 318F-Flüssigmedium. In Vorbereitung auf das Animpfen wurden zunächst die Pflanzenreste und andere Grobpartikel des Fermentersubstrats durch niedertourige Zentrifugation bei  $< 1000 \times g$  sedimentiert. Je nach Viskosität und Grobpartikel-Anteil variierte die Zentrifugationsdauer zwischen 3 min und 30 min. Anschließend wurden die Flüssigmedien zu 2,5 %, 5,0 % und 10,0 % [v/v] mit dem Fermentersubstrat-Überstand inokuliert. Die Inkubation wurde unter stetigem Schütteln ( $200 \text{ U min}^{-1}$ ) bei  $39 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt, um die Betriebstemperatur der Biogasanlage zu simulieren. Im Falle hydrogenotropher Anreicherungskulturen wurde die Gasphase im Kulturröhrchen wöchentlich erneuert. Da die  $\text{N}_2$ -Gasphase methylotropher oder acetoklastischer Anreicherungskulturen nicht metabolisiert wird, war hier eine Erneuerung nicht notwendig.

Um den Reinheitsgrad ausgehend von den Anreicherungs-Flüssigkulturen zu erhöhen, wurden drei Optionen verfolgt und miteinander kombiniert: Die Tiefagar-Verdünnungsmethode, anaerobes Ausplattieren und die serielle Verdünnung in Flüssigmedium.

#### **II.1.10.1 Die Tiefagar-Verdünnungsmethode**

Zur Durchführung der Tiefagar-Verdünnungsmethode wurde zunächst das Flüssig-Nährmedium nach oben aufgeführten Vorgaben erstellt. In Rollrand-Reagenzgläsern (20 mm Verschlussdurchmesser) wurde je 135 mg Agar für eine Endkonzentration von 1,5 % [w/v] vorgelegt. Anschließend erfolgte die Aliquotierung des Flüssigmediums in diese Rollrand-Reagenzgläser unter 95 %  $\text{N}_2$ / 5 %  $\text{H}_2$ -Formiergas-Atmosphäre in Volumina von  $V = 9 \text{ mL}$  sowie der Verschluss mit Butylsepten und Aluminium-Bördelkappen. Nach dem Autoklavieren konnten die Medien im noch flüssigen Zustand anaerob inokuliert werden. Dazu erfolgte ausgehend von  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  verdünnten Anreicherungskulturen oder BGA-Fermenterflüssigkeit eine weitere serielle Verdünnung in den auf  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  temperierten

Reagenzgläsern. Diese wurden nach der Beimpfung mehrfach gewendet, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu gewährleisten und anschließend zum schnellen Aushärten des Agars in einem (Eis-)Wasserbad abgekühlt. In einem Folgeschritt wurde die Formiergasatmosphäre gegen die benötigte Gasphase ( $H_2/CO_2$  oder  $N_2$ , siehe II.1.9) ausgetauscht und die Ansätze kopfüber bei  $39\text{ °C}$  im Brutschrank inkubiert, um Kontakt von Kondenswasser mit dem Agar zu vermeiden (Abb. 23). Im Agar gebildete Kolonien wurden unter dem Anaerobenzelt mit einer Kanüle steril entnommen und in Flüssigkultur überführt. Nach fortgesetzter Inkubation bei  $39\text{ °C}$  und  $200\text{ U min}^{-1}$  im Falle hydrogenotropher Archaea erfolgte die Kontrolle der Uniformität bzw. des Reinheitsgrades der Kultur durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (siehe II.1.12).

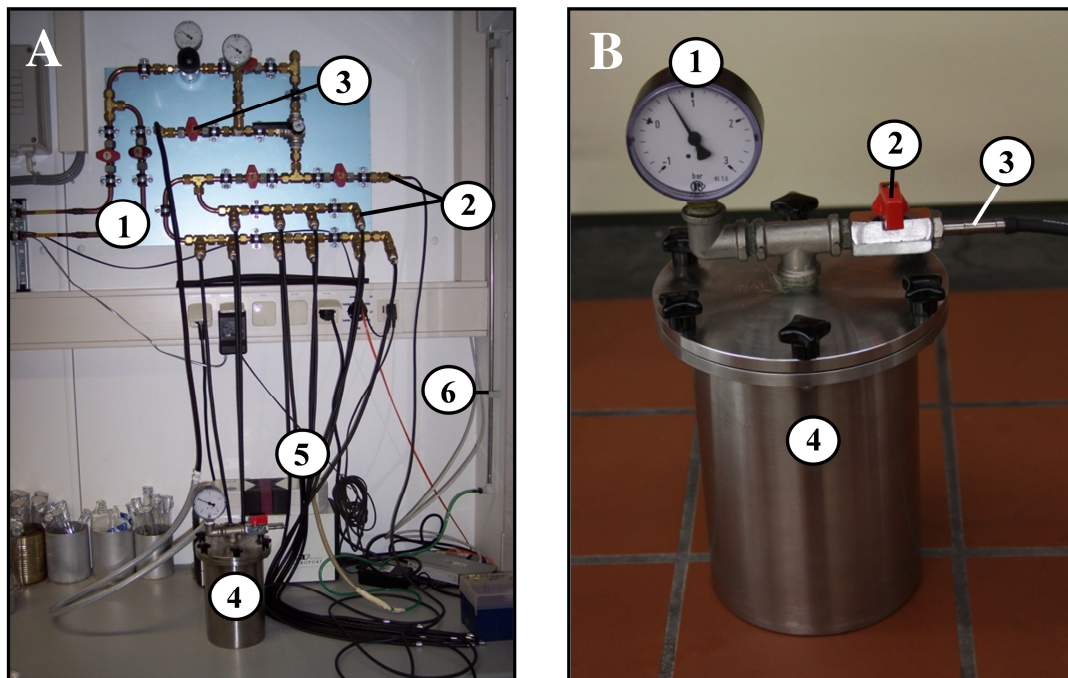


**Abb. 23:** Schematische Darstellung der Tiefagar-Verdünnungsmethode am Beispiel des modifizierten DSMZ-Mediums 287F. Neun mL Flüssigmedium wurde in Anaeroben-Rollrandröhrchen mit 135 mg vorgelegtem Agar (1,5 % [w/v]) gefüllt und autoklaviert. In einem Wasserbad bei  $50\text{ °C}$  flüssig gehalten, wurde 1 mL einer Anreicherungskultur zugegeben und durchmischt. Nach Anfertigung weiterer  $10^{-1}$ -Verdünnungsschritte und Abkühlen des Agars erfolgte die Inkubation kopfüber im Brutschrank.

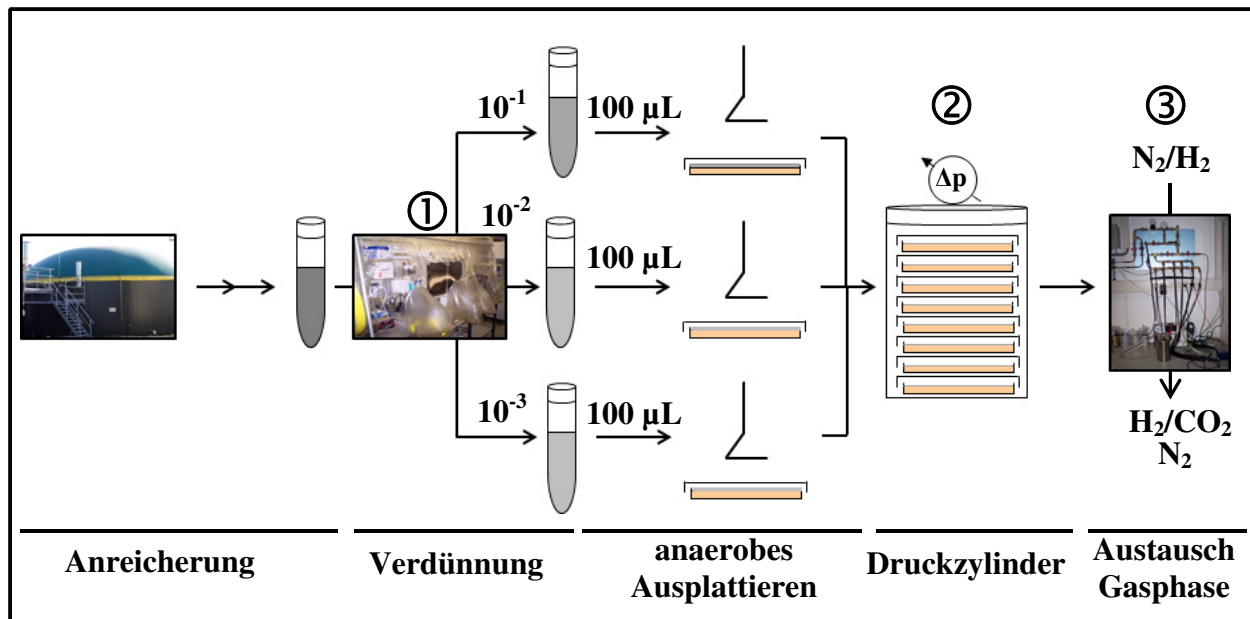
### II.1.10.2 Festmedien-Kultivierung durch anaerobes Ausplattieren

Anaerobes Ausplattieren wurde analog zur Standardtechnik für das Ausbreiten aerober Mikroorganismen auf Festnährmediumplatten durchgeführt. Das Protokoll wurde an einigen Punkten modifiziert, um auch das Wachstum von strikt anaeroben methanogenen Archaea zu ermöglichen. So erfolgte der Plattenguß stets unter dem Anaerobenzelt unter Formiergasatmosphäre. Um einen Gasaustausch der ausplattierten Mikroorganismen mit der Umwelt zu gewährleisten, wurden Petrischalen mit Belüftungsnocken eingesetzt. Nach 10 h Äquilibriumsdauer unter der anaeroben Atmosphäre wurde je ein Volumen von  $100\text{ }\mu\text{L}$  einer  $10^{-1}$ - $10^{-3}$ -Verdünnung von Anreicherungskulturen im identischen Medium mittels steriler

Einwegspatel auf die Festmedienplatten ausplattiert. Zur Inkubation wurden die Platten für 4 - 8 Wochen bei 39 °C in gasdichte V2A-Edelstahlzylinder (Johannes Gutenberg-Universität Mainz Eigenbauten, **Abb. 24B**) verbracht und die Formiergasatmosphäre gegen die passende Gasatmosphäre ausgetauscht. Diese wurde bei Absinken des Gasdrucks oder nach Kontrollöffnungen des Stahlzylinders an der Begasungsstation (**Abb. 24A**) erneuert (**Abb. 25**). Einzelkolonien wurden mit sterilen Pipettenspitzen von der Oberfläche des Festmediums aufgenommen und in Anaeroben-Kulturröhrchen mit entsprechendem Flüssigmedium überführt. Die Inkubation und Kontrolle der Flüssigkultur wurde wie bereits für die Tiefagar-Verdünnungsmethode beschrieben, durchgeführt. Nach Anwachsen der Kultur wurde durch erneute 1:80-Verdünnung (50 µL Inokulum in 4 mL Medium) eine Folgekultur erstellt.



**Abb. 24: Aufbau der Begasungsstation des IMW Mainz (A) und des Anaerobenzylinders im Detail (B).** Gaszulauf (A①) und Gasverteiler (A②) leiteten das Gas in die Kulturgefäße (hier Anaeroben-Stahlzylinder A④, vgl. B). Abzug der Gasatmosphäre wurde über den Vakuumschluss (A③) und die Vakuumpumpe (A⑤) ermöglicht. Ein Gasabzug ermöglichte das Ableiten von Altgas (A⑥). Zur Gewährleistung eines sterilen Gases standen autoklavierte Sterilfilter zur Verfügung. Aufbau des Anaeroben-Stahlzylinders: Ein Manometer (B①) zeigte gegenwärtigen Innendruck an. Über den Gaszulauf (B③) und Sperrventil (B②) wurde die benötigte Gasatmosphäre in den V2A-Stahlzylinder (B④) geführt



**Abb. 25: Anaerobes Ausplattieren methanogener Anreicherungs- und Flüssigkulturen.** Verdünnung der Kultur im Anaerobenzell (①) und Ausplattierung eines  $100\ \mu\text{L}$ -Aliquots mit sterilen Einwegspateln. Nach Verbringen der belüfteten Nährmedienplatten in einen Anaeroben-Stahlzylinder (②) erfolgte der Austausch der Gasphase von Formiergas gegen  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (hydrogenotrophe Zielorganismen) oder  $\text{N}_2$  (methylotrophe und acetoklastische Methanogene) an der Gasanlage (③)

### II.1.10.3 Reinkultivierung dominanter anaerober Mikroorganismen durch serielle Verdünnung

Für die Methode der anaeroben, seriellen Verdünnung in Flüssigmedien ergaben sich zwei Anwendungsgebiete. Sie wurde als weiterer Aufreinigungsschritt entweder direkt im Anschluss an die Etablierung einer Anreicherungskultur oder in Kombination mit der Tiefagar-Verdünnung oder dem anaeroben Ausplattieren durchgeführt. Generell konnte mittels anaerober serieller Verdünnung eine Ausgangskultur aus wenigen Morphologien, von denen eine in klarer Dominanz vorkam, in eine Reinkultur überführt werden, indem die Begleitflora sukzessive aus der Flüssigkultur herausverdünnt wurde. Dazu wurde zunächst aus der Ausgangskultur eine  $10^{-1}$ -Verdünnung im identischen Nährmedium angesetzt, von der die Verdünnungsreihe bis  $10^{-6}$  fortgesetzt wurde. Inkubationsdauer, Schüttelgeschwindigkeit und Temperatur wurden identisch zu den für die Etablierung von Anreicherungskulturen beschriebenen Parametern gewählt. In den höheren Verdünnungsstufen zeigten sich nach Ablauf der Inkubationsdauer die dominanten Morphotypen in hoher Uniformität. Die einzige Ausnahme bildeten die Kultivierungsansätze zur Anreicherung und Aufreinigung von methanogenen Archaea der Gattung *Methanoculleus*. Hier musste die Verdünnung zur Vermeidung von Ko-Kulturen in weiter modifizierten Medien durchgeführt und die Inkubation bei niedrigen Temperaturen fortgesetzt werden (siehe II.1.11.4). Um die positive Selektion des dominanten Morphotyps aus einer Ausgangskultur weiter zu forcieren, wurden Verdünnungsreihen in den "P"-Varianten der beschriebenen Nährmedien mit nur einer

definierten C-Quelle durchgeführt. Das Wachstum von Organismen aus der Domäne der Eubakterien wurde durch Zugabe von  $50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  Vancomycin und  $15 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  Tetracyclin inhibiert. Alternativ wurde Rifampicin in einer Konzentration  $100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  verwendet.

### **II.1.11 Strategien zur Reinkultivierung spezifischer Gattungen methanogener Archaea aus BGA-Fermenterproben**

Nach initialer Anreicherung methanogener Archaea aus einer BGA-Fermenterprobe erfolgte zur Gewinnung einer Reinkultur die Anwendung einer je nach Zielgattung variierenden Kombination der oben vorgestellten Medien und Aufreinigungsmethoden (siehe **II.1.10**). Im Folgenden sind daher die verschiedenen Isolierungsstrategien nach Zielgattung geordnet aufgeführt:

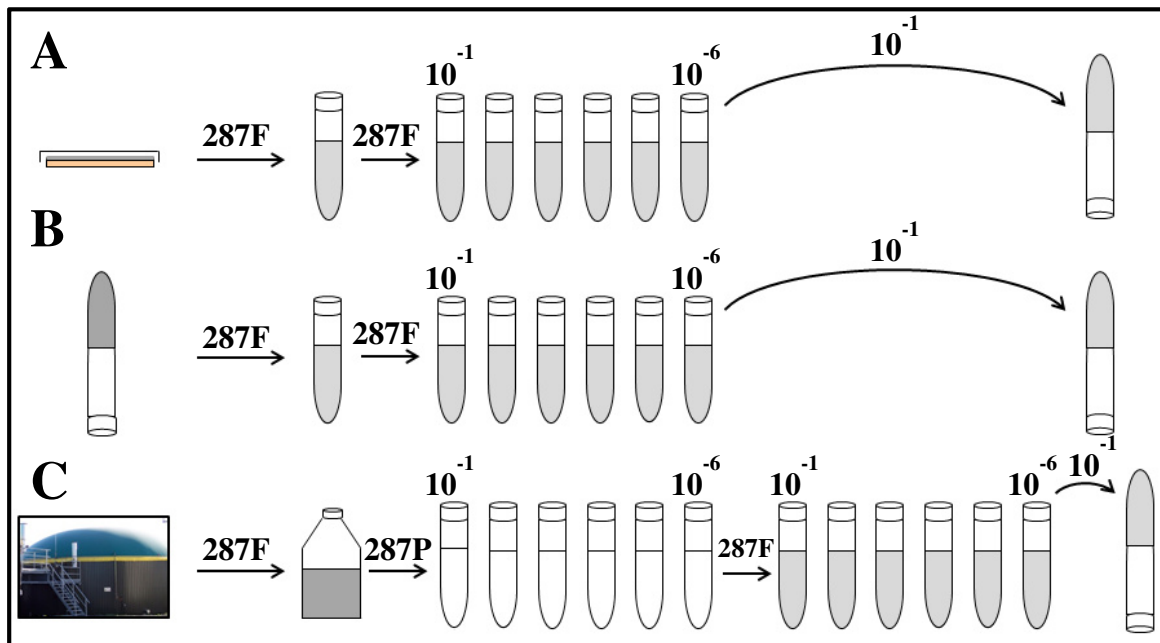
#### **II.1.11.1 Isolierung von Mikroorganismen der hydrogenotrophen Gattung *Methanobacterium***

Eine Reinkultivierung von *Methanobacterium* sp. konnte im Anschluss an verschiedenste experimentelle Vorarbeiten erfolgen (**Abb. 26**). Die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit und kurzen Generationszeiten bei Wachstum auf  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  erlaubten eine flexible Isolierungsstrategie insbesondere für die Art *Mb. formicicum*. So war im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Isolierung sowohl ausgehend von einer Reinigung durch Tiefagar-Verdünnung, als auch durch anaerobes Ausplattieren sowie durch Ansetzen von Verdünnungsreihen direkt aus der Anreicherungskultur möglich. Dabei wurde die Flüssigkultur, welche durch Transfer einer Kolonie den Abschluss der Tiefagar-Verdünnungsmethode bzw. des anaeroben Ausplattierens bildete, für eine weitere serielle Verdünnung in modifiziertem Medium DSM287F eingesetzt. Abschließend wurde aus der letzten bewachsenen Kultur erneut eine  $10^{-1}$ -Tiefagar-Verdünnung erstellt. So konnten auch durch ins Flüssigmedium transferierte, ineinander verwachsene Kolonien gebildete Mischpopulationen getrennt werden.

Ausgehend von einer direkten Anreicherungskultur wurden zwei Verdünnungsreihen nacheinander geschaltet. Die Anreicherungskultur wurde zunächst seriell in mod. DSM287P wie oben beschrieben verdünnt. Nach (fluoreszenz-)mikroskopischer Auswertung wurde die höchste noch bewachsene Verdünnungsstufe als Ausgangspunkt für eine weitere Verdünnungsreihe eingesetzt. Da zu diesem Zeitpunkt zumeist schon eine hohe morphologische Uniformität in der Kultur zu beobachten war, wurde zwecks Stabilisierung der dominanten, doch ausgedünnten *Methanobacterium* sp. diese anschließende, zweite Verdünnungsreihe in mod. DSM287F durchgeführt. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, wurden die oben angegebenen Antibiotika-Zugaben beibehalten. Die Inkubation



der Verdünnungsreihen erfolgte dabei für 5 - 7 Tage im Falle von mod. DSM287F und 7 - 14 Tagen in mod. DSM287P-Minimalmedium bei 39 °C. Zum Aufrechterhalten der Reinkultur wurde diese alle 4 - 6 Wochen zu 5 % (v/v) in antibiotikafreies, mod. DSM287F-Medium beimpft. Als Gasphase über alle Flüssig-Kultivierungsansätze wurde 1,2 bar 80 % H<sub>2</sub>/ 20% CO<sub>2</sub> aufgegeben. Nach ausreichendem Bewuchs wurden unabhängig von der Isolierungsmethode Tiefagar-Verdünnungen angesetzt und aus deren Kolonien Reinkulturen erstellt.

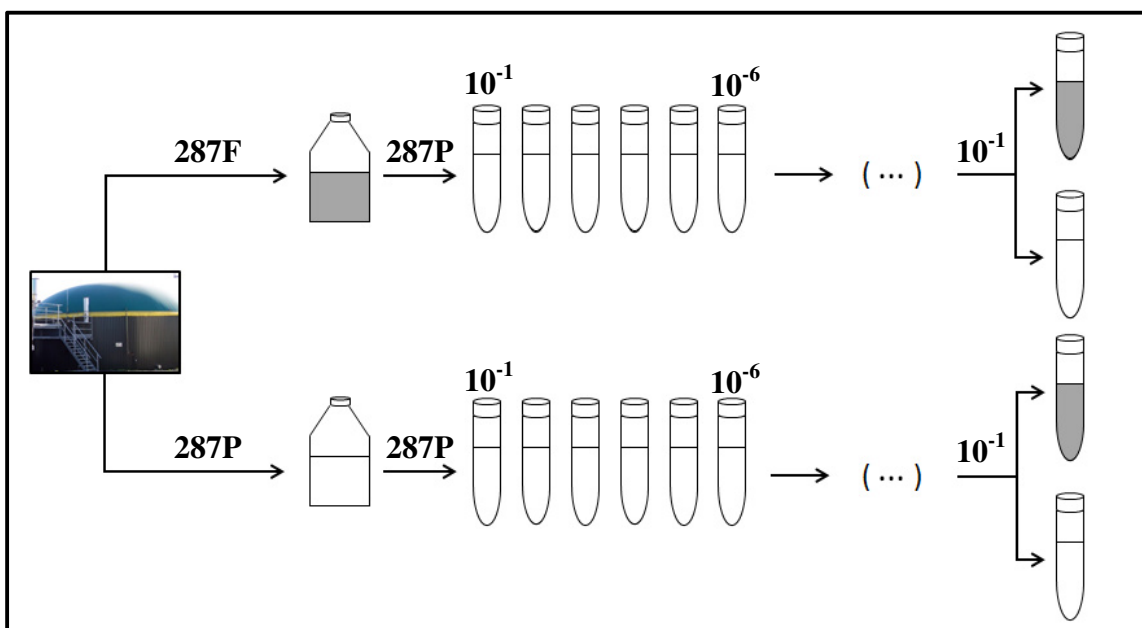


**Abb. 26: Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Methanobacterium* ausgehend von anaerober Plattierung (A), der Tiefagar-Verdünnungsmethode (B) oder einer Anreicherungskultur methanogener Archaea aus BGA (C).** Transfer einer Kolonie von einer Nährmediumplatte oder aus Tiefagar in mod. DSM287F-Medium führte zu Wachstum nach 5 - 7 Tagen, danach erfolgte eine serielle Verdünnung in selbigem Medium in Gegenwart von Antibiotika. Aus der höchsten Verdünnungsstufe wurde nach erneuten 5 - 7 Tagen ein Tiefagar-Ansatz erstellt (A, B). Ausgehend von einer allgemeinen Anreicherung in mod. DSM287F folgte nach 5 - 7 Tagen zunächst eine Verdünnungsserie in mod. DSM287P-Medium, danach aus der höchsten Verdünnungsstufe nochmals eine Verdünnungsreihe in DSM287F-Medium für 7 - 14 Tage (C, beide Reihen in Antibiotika-Gegenwart). Abschluss fand diese Aufreinigungsmethode analog zu A und B in einer finalen 10<sup>-1</sup>-Tiefagar-Verdünnung.

### II.1.11.2 Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Methanosarcina*

Archaea der Gattung *Methanosarcina* weisen mit der Fähigkeit zur hydrogenotrophen, acetoklastischen und methylotrophen Methanogenese das größte Spektrum an Ausgangsverbindungen zur Synthese von CH<sub>4</sub> auf. Um möglichst geringe Ko-Kultivierungen zu ermöglichen fand die allgemeine Anreicherung aus BGA Fermenterproben in mod. Medium DSM318F unter 0,5 bar N<sub>2</sub>-Atmosphäre statisch für 14 Tage bei 39 °C statt. Im Gegensatz zum mod. DSM287F-Medium lag als einzige Energiequelle Methanol vor, sodass von Anfang an auf methylotrophe Organismen selektiert wurde. An diese Anreicherung wurde eine serielle Verdünnung in mod. Medium 318P unter selbigen Bedingungen angeschlossen.

Bakterielle Kontaminanten wurden durch Zugabe der oben beschriebenen Antibiotika am Wachstum gehindert. Waren auch in hohen Verdünnungsstufen noch Kontaminationen zu finden, so wurde eine weitere Verdünnungsreihe erstellt und die Konzentration der eingesetzten Antibiotika verdoppelt. Die gewonnenen Reinkulturen wurden dann 1:10 in antibiotikafreien mod. 318F- und 318P-Medien überimpft (**Abb. 27**), aufrecht erhalten und alle 28 Tage in frische Medien überführt, wobei durch visuelle Überprüfung der Transfer von *Methanosarcina* sp.-Aggregaten sichergestellt wurde. Alternativ zu einem ersten Anreicherungsschritt in der F-Variante des Mediums konnte auch ein direktes Überimpfen in mod. 318P-Medium erfolgen, die Inkubationsdauer verlängerte sich dann von 14 auf 28 Tage.

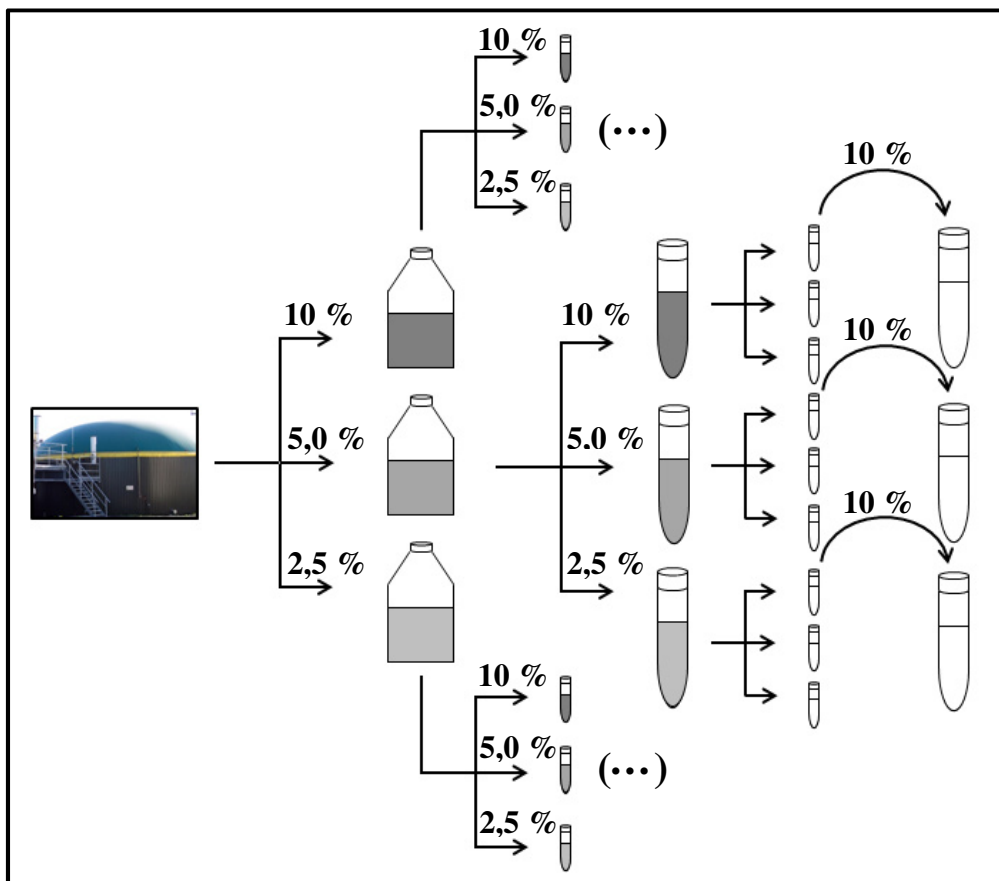


**Abb. 27: Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Methanosarcina*.** Eine erste Anreicherung erfolgte entweder in mod. Medium DSM318F oder DSM318P. Nach 14 (DSM318F) bzw. 28 Tagen (DSM318P) erfolgte die erste serielle Verdünnung in Antibiotika-Gegenwart für 28 Tage. Je nach Bedarf wurden die seriellen Verdünnungsschritte bei doppelter Antibiotikakonzentration wiederholt. Abschließend wurde die höchste Verdünnungsstufe jeweils 1:10 in mod. Medium DSM318F und DSM318P aufgenommen.

### II.1.11.3 Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Methanosaeta*

Mikroorganismen der Gattung *Methanosaeta* (vormals *Methanothrix*) zählen zu den-jenigen methanogenen Archaea mit den längsten Generationszeiten. Je nach Substrat und Wachstumsbedingungen ergeben sich rechnerisch Verdopplungszeiten von 70 bis über 300 Stunden. Aufgrund der Tatsache, dass alle übrigen in einer BGA durch kultivierungs-unabhängige Methoden nachgewiesenen Mikroorganismen in den „F“-Medien deutlich kürzere Generationszeiten aufwiesen, musste die grundlegende Strategie einer allgemeinen Anreicherung mit nachfolgender Ausverdünnung in Selektivmedien abgewandelt werden. So wurde in einem ersten Schritt 20 mL mod. DSMZ 334P-Medium zu 10 %, 5 % und 2,5 %

[v/v] mit BGA-Reaktorflüssigkeit angeimpft und mit 0,5 bar N<sub>2</sub>-Atmosphäre überschichtet. Nach statischer Inkubation bei 39 °C für 4 Wochen erfolgte aus dieser Vorstufe eine weitere Überimpfung zu gleichen prozentualen Anteilen, jedoch in Anaeroben-Kulturröhrchen nach Hungate mit 10 mL DSMZ 334P-Medium. Nach einer Inkubationsphase von 1 – 3 Monaten wurden im gleichen Volumen mehrere Parallelen mit 10 % [v/v] Inokulum überimpft (**Abb. 28**). Erfolgreiche Kultivierung von *Methanosaeta* sp. deutete sich durch einen milchig-trüben Bodensatz im Kultivierungsansatz an. Wiederholung der Überimpfungsschritte erhöhte sukzessive den Reinheitsgrad, die Zugabe antibakterieller Antibiotika unterstützte diesen Prozess. Da eine erfolgreiche Kultivierung bei Unterschreitung der Inokulumsvolumen von 10 % [v/v] aus den jeweiligen Vorkulturen nicht gelang, konnte mit einer seriellen Verdünnung keine schnellere Aufreinigung erreicht werden. Die benötigten Inkubationszeiten lagen in dieser Phase zwischen ein bis sechs Monaten.



**Abb. 28: Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Methanosaeta*.** Zwanzig mL mod. DSMZ 334-Medium wurde mit BGA Reaktorflüssigkeit zu 10 %, 5 % und 2,5 % (v/v) inokuliert. Diese Vorkulturen wurden nach einer 4-wöchigen Inkubation bei 39 °C zu gleichen prozentualen Anteilen in Anaeroben-Kulturröhrchen mit 10 mL des Mediums überführt. Nach 1 – 3 Monaten wurden daraus jeweils mehrere Parallelen zu 10 % inokuliert. Zeigte sich in einem der Röhrchen während einer 1-6-monatigen Inkubationsphase ein weißlich-trüber Niederschlag, so wurde ein Volumenanteil von 10 % in frisches Medium überführt. Zugabe von Antibiotika verhinderte das Aufkommen bakterieller Kontaminanten, verlängerte aber z.T. die Inkubationsphasen.

#### II.1.11.4 Isolierung von Mikroorganismen der Gattung *Methanoculleus*

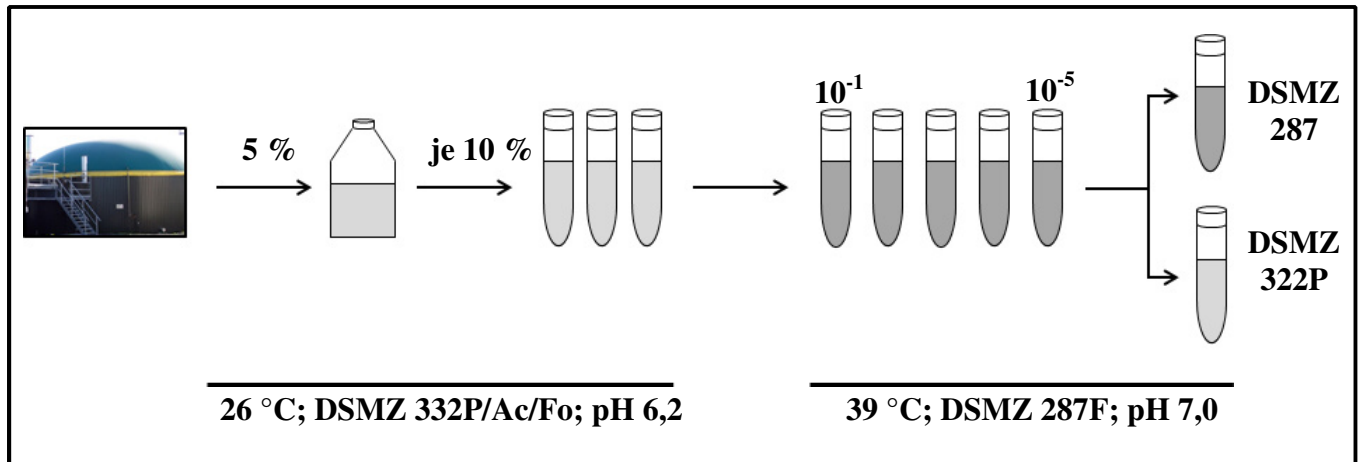
Für die Isolierung von Mikroorganismen dieser Gattung wurden zunächst Anreicherungskulturen durch Inokulierung von DSMZ-Medium 332 mit Reaktorflüssigkeit angesetzt, welche, wie oben beschrieben, die Ausgangskulturen für serielle Verdünnungen im gleichen Medium darstellten. Die H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre sowie die Gegenwart von Natriumformiat in diesem Medium bot *Mb. formicicum* jedoch ebenso gute Wachstumsbedingungen (Tab. 16).

**Tab. 16: Vergleich ausgewählter physiologischer Parameter von *Methanobacterium formicicum* und *Methanoculleus bourgensis*. Verändert nach Boone, 2001; Chong und Boone, 2001.**

Parameter	<i>Methanobacterium formicicum</i> MF <sup>T</sup>	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>
T [°C]	30 - 45	25 - 45
Substrat	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Formiat
pH	7 – 7,5	6,2 – 8,0

Um das Problem einer Ko-Kultivierung, insbesondere von Organismen der Art *Mb. formicicum* zu vermeiden, wurde der Fokus zunächst auf das Erreichen einer Dominanz von *Methanoculleus* sp. auf archaeeller Ebene gelegt. Dafür wurde das unmodifizierte Medium nach Vorgaben der DSMZ gegen Varianten ersetzt, die ausschließlich eine Energiequelle enthielten (DSMZ 332Ac mit Natriumacetat und 332Fo mit Natriumformiat) und keinerlei komplexe Zusätze aufwiesen. Die Inkubationstemperatur wurde auf 26 °C und der pH-Wert des Medium vor dem Autoklavieren auf 6,2 herabgesetzt. Diese Faktoren in Summe sollten die Populationszusammensetzung zugunsten von *Mcu. bourgensis* beeinflussen, dessen Wachstum bereits bei etwa pH 5,3 und 25 °C starten kann. Tatsächlich war eine Kultivierung unter diesen Umständen möglich, jedoch wurde die Kultivierungsdauer dadurch spürbar verlängert. Dennoch ermöglichte die oben beschriebene Methodik eine bessere Isolierung von *Mcu. bourgensis* aus Reaktorflüssigkeit als die herkömmliche serielle Verdünnung. Eine Anreicherungskultur wurde durch eine erste Beimpfung des selektiven Mediums mit 5 % BGA-Reaktorflüssigkeit erstellt und für mind. vier Wochen unter den oben aufgeführten, restriktiveren Bedingungen inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden drei Parallelen in Anaeroben-Röhrchen mit zur Anreicherung identischem Medium zu 10 % inokuliert und die Inkubation für vier bis acht Wochen in Gegenwart der aufgeführten Antibiotika fortgesetzt. Konnte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen die Dominanz irregulärer *Methanoculleus* sp.-Morphologien bestätigt werden, wurde zwecks schnelleren Wachstums eine Parallelkultur zur Inkubation unter Standardbedingungen (39 °C, pH 7,0, DSMZ 287F) oder, für weitere Aufreinigungen, serielle Verdünnungen bis zu einer Höchststufe von 10<sup>-5</sup> erstellt.

Aus dieser höchsten Verdünnungsstufe wurde entweder eine weitere Verdünnungsreihe angesetzt, oder, im Falle hoher Reinheitsgrade, je 10 % Inokulum in Medium DSMZ 287F und DSMZ 332F überimpft (**Abb. 29**).

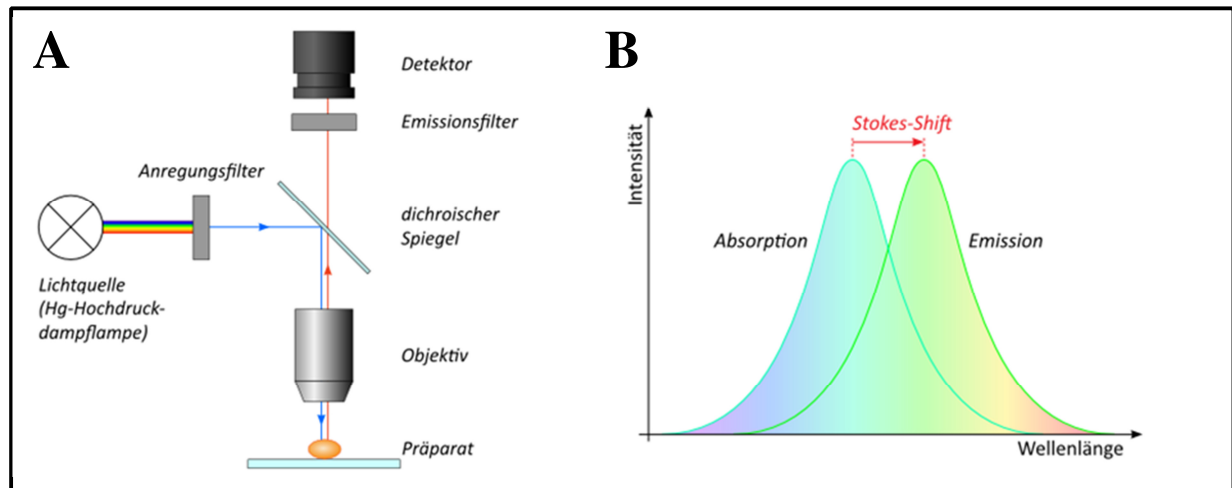


**Abb. 29: Isolierung von Stämmen der Gattung *Methanoculleus*.** Die Kultivierung von Mikroorganismen dieser Gattung wurde zur Vermeidung von Ko-Kultivierung von Fremdorganismen wie *Methanobacterium* sp. in zwei Phasen unterteilt. In einer Anreicherungsphase wurden 20 mL-Vorkulturen zu 5 % [v/v] mit BGA-Fermenterflüssigkeit in mod. Medium DSMZ 332P, DSMZ Ac oder DSMZ 332Fo angeimpft und 4 – 8 Wochen bei  $26\text{ °C}$ , pH 6,2 inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden mehrere Parallelen zu je 10 % in Anaeroben-Kulturröhrchen zu identischen Bedingungen angeimpft. Nach fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung wurde die Kultur mit der größten Dominanz an *Methanoculleus* sp.-Morphologien für die zweite Phase ausgewählt. Hier wurden serielle Verdünnungen in mod. DSMZ 287F-Medium durchgeführt, bis Kulturreinheit erreicht wurde. Es erfolgte der Transfer von je 10 % Kulturvolumen in die Medien DMZ 287F und DSMZ 322P. Zur Unterstützung der Aufreinigungsschritte wurden die Antibiotika Bacitracin und Cycloserin zugegeben.

### II.1.12 Fluoreszenzmikroskopie

Als Fluoreszenz bezeichnet man die Emission von Licht einer definierten Wellenlänge  $\lambda_{em}$  als Folge des Rückfalls von angeregten Elektronen in ihren energieärmeren, unangeregten Grundzustand. Solche zur Fluoreszenz befähigte, physikochemische Systeme wie Atome, Ionen oder Moleküle nennt man Fluorophore. Zur Auslösung der Fluoreszenz wird ein Fluorophor mittels Photonen (sog. Photofluoreszenz) oder anderer elektromagnetischer Strahlung auf ein transientes, energiereicheres Niveau angeregt. Das beim Rückfall auf das energieärmere Grundniveau emittierte Licht zeichnet sich dabei in der Regel durch eine höhere Wellenlänge aus, als die des anregenden, absorbierten Lichtphotons  $\lambda_{ex}$ . Die aus der Wellenlängenvergrößerung resultierende Energiedifferenz zwischen  $\lambda_{ex}$  und  $\lambda_{em}$  wird als Stokes-Shift bezeichnet und führt visuell zu einer Farbänderung des emittierten Lichts im Vergleich zum anregenden Licht. Diese Farbänderung wird in vielen molekularbiologischen Untersuchungen und Experimenten ausgenutzt. So ermöglicht das Markieren von Oligonukleotiden mit Fluorophoren die Konstruktion spezifischer Sonden für *in situ*-Hybridisierungsexperimente oder quantitativer PCR. Auch im Bereich der (Fluoreszenz-) Mikroskopie finden Fluorophormarkierungen Anwendung. Markierte Proteine bzw. Protein-Polymere erlauben z.B. struktu-

relle Untersuchungen des eukaryotischen Zytoskeletts oder allgemein die subzelluläre Lokalisation von Proteinkomplexen. Dabei filtert ein im Fluoreszenzmikroskop verbauter Anregungsfilter aus einer Lichtquelle diejenige Wellenlänge heraus, welche zur Anregung des ausgewählten Fluorophors benötigt wird. Über einen auch als „dichroischer Spiegel“ bezeichneten Strahlenteiler wird das Anregungslicht zum Objekt geleitet und vom resultierenden, langwelligeren Emissionslicht getrennt. Letzteres wird über das Objektiv in das Okular oder eine angeschlossene Kamera geleitet (**Abb. 30**).



**Abb. 30: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Epifluoreszenzmikroskop und Wellenlängenverhalten beteiligter Photonen.** Die Anregungswellenlänge wird aus der Lichtquellenemission herausgefiltert und über einen Strahlenteiler auf das Präparat geleitet, wo das Fluorophor Licht einer größeren Wellenlänge emittiert. Dieses tritt durch das Objektiv zum Strahlenteiler zurück und wird nach Zwischenfilterung zum Okular oder Detektor (z.B. Kamera) geleitet (A). Die Wellenlängenverschiebung des vom Fluorophor absorbierten und emittierten Lichts resultiert in einer Farb- und Energieverschiebung, dem „Stokes-Shift“(B). Nach: Portal LP der Georg-August-Universität Göttingen, <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>; Autor Anja Niedermayr

In der vorliegenden Arbeit wurden Überprüfungen des Reinheitsgrades der Kulturen sowie die morphologische Charakterisierung fluorezenzmikroskopisch vorgenommen. Dazu wurde der bei methanogenen Archaea vorkommende Enzym-Kofaktor  $F_{420}$  ausgenutzt. Dieser essentielle Kofaktor dient u.a. als Elektronencarrier und –überträger für die Reduktion von  $CO_2$  auf Methen- und Methyl-Niveau im Verlauf der Methanogenese (**siehe I.2.4.1**). Bei Bestrahlung der Zelle mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 420$  nm fluoresziert der Enzym-Kofaktor bläulich-grün (**Cheeseman et al., 1972**) mit  $\lambda_{em} = 520$  nm. Eine Identifizierung und morphologische Charakterisierung methanogener Archaea mittels Fluoreszenzmikroskopie wird dadurch möglich und vereinfacht, da ein Markierungsprozess mit (Fluoreszenz-) Farbstoffen entfällt. Zur Identifizierung von Vertretern der Gattung *Methanosaeta* ist die Methode allerdings nur bedingt geeignet, da diese Organismen im Vergleich zu anderen methanogenen Archaea nur sehr geringe Konzentrationen des Kofaktors  $F_{420}$  in der Zelle aufweisen und dementsprechend typischerweise nur eine schwache Fluoreszenz zeigen.

Alternativ musste in diesem Bereich auf Phasenkontrastmikroskopie zurückgegriffen werden. Neben der morphologischen Routinekontrolle von Anreicherungs- und Reinkulturen kam Fluoreszenzmikroskopie zur Auswertung von Hybridisierungsexperimenten mit FISH-Sonden (II.2.6) zum Einsatz. Dabei wurde insbesondere die Fluoreszenz der Cy3-/Cy3.5-markierten Oligonukleotidsonden und der DAPI-Gegenfärbung (Tab. 17) den in der Materialliste aufgeführten Mikroskopen aufgenommen.

**Tab. 17: Charakteristika genutzter Fluorophore und deren Einsatzgebiete in der vorliegenden Arbeit.**

Emissionsquelle	$\lambda$ Absorption <sub>max.</sub>	$\lambda$ Emission <sub>max.</sub>	Nutzung
Koenzym F <sub>420</sub>	420 nm	520 nm	Kontrolle und Dokumentation von Kulturen methanogener Archaea
Cy3 (Indocarbocyanin)	550 nm	570 nm	FISH-Sonden-Markierung
Cy3.5	588 nm	604 nm	FISH-Sonden-Markierung
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	359 nm	461 nm	FISH-Gegenfärbung; Gesamtorganismenfärbung

## II.2 Molekularbiologische Methoden

### II.2.1 DNA-Extraktion aus BGA-Fermenterproben

Die archaeele Biodiversität in landwirtschaftlichen Biogas-Praxisanlagen wurde zunächst anhand von kultivierungsunabhängigen, auf dem 16S rRNA-Gen basierenden, molekularbiologischen Methoden taxonomisch erfasst. Zur Vorbereitung auf nachfolgende "downstream"-Anwendungen war in einem ersten Schritt ein Gesamt-Extrakt genomischer DNA von hoher Reinheit und Konzentration zu gewinnen. Basierend auf klassischen Methoden der DNA-Extraktion wurde ein Protokoll etabliert, welches die Gewinnung gereinigter genomischer Gesamt-DNA aus kleinen Volumina von Fermenterproben erlaubte. Hierbei wurden Fermenterproben bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert, um grobe Pflanzenpartikel vom Überstand zu separieren. Dieser wurde anschließend bei 16100 x g und Raumtemperatur (RT) in einer Tischzentrifuge für 30 min abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in 1300  $\mu$ L Puffer (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, 35 mg Polyvinylpolypyrrolidin [PVPP]) aufgenommen. Nach einer Inkubationsperiode von 30 min bei 37 °C in Gegenwart von 20  $\mu$ L Lysozym (10 mg mL<sup>-1</sup>) wurden 20  $\mu$ L einer 1 % (w/v) Proteinase K-Lösung und 100  $\mu$ L einer 10 % (w/v) SDS-Lösung zugefügt und die Ansätze im Wasserbad oder Thermomixer bei 65 °C für 30 min inkubiert. Die so präparierten Proben wurden

fünfmal in Folge abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 65 °C aufgetaut (freeze-thaw-Methode). Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 7500 g und RT. Der Überstand wurde mit 0,7 M NaCl und 4 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) versetzt. Nach einer Inkubation für weitere 10 min bei 65 °C erfolgte eine Chloroformfällung und anschließend die DNA-Fällung in der wässrigen Phase mit Isopropanol. Der Niederschlag wurde zweimalig mit kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Aufgrund des viskosen Charakters von BGA-Fermenterproben und den darin vorkommenden DNA-Polymerase-Inhibitoren wie Huminsäuren war eine Anwendung klassischer, kommerzieller Reaktionskits zur DNA-Extraktion nur sehr eingeschränkt und unzuverlässig möglich. Daher wurden verschiedene DNA-Schnellextraktionskits für diverse, dem BGA-Fermentersubstrat ähnlichen, Matrizes auf ihre Eignung geprüft. Insbesondere Reaktionskits zur Extraktion von DNA aus Stuhlproben konnten erfolgreich auf Fermenterproben angewandt werden. Bei großer Anzahl von Proben wurde daher alternativ zur klassischen Extraktionsmethode das GeneMATRIX Stool Purification Kit (**II.2.2**) eingesetzt. Wie im klassischen DNA-Extraktionsprotokoll beschrieben, wurden grobe Pflanzenpartikel von einem durch Zentrifugation entstandenen, mikroorganismenhaltigen Überstand getrennt. Ein Volumen von 200 µL wurde für die eigentliche DNA-Extraktion nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

### **II.2.2 DNA-Extraktion aus Flüssigkulturen**

Die Extraktion genomischer DNA aus flüssigen Misch- oder Reinkulturen erfolgte mittels des GeneMATRIX Stool Purification Reaktionskits (EURx Ltd., Gdansk, Polen). Zur Probenvorbereitung wurde der Kultur ein Volumen von 2-4 mL steril entnommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und darin die Mikroorganismen in einer Tischzentrifuge für 3 min bei 16100 x g abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 200 µL sterilem Reinstwasser aufgenommen und entsprechend des Herstellerprotokolls für die DNA-Extraktion behandelt. Der DNA-Extrakt wurde entweder direkt als Template in einer PCR eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.



### II.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

#### II.2.3.1 Präparative Amplifikation von Fragmenten des 16S rRNA-Gens

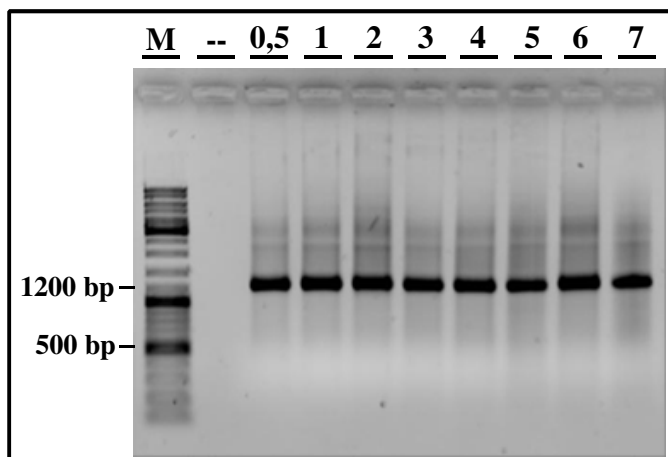
Die Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte für analytische und präparative Anwendungen erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für einleitende Diversitätsanalysen mittels DGGE (**II.2.4**), Klonierungsreaktionen im Vorfeld von ARDRA-Analysen und die taxonomische Identifizierung von (Rein-)Kulturen wurden Teilsequenzen des etwa 1500 bp langen 16S rRNA-Gens mittels PCR amplifiziert. Aufgrund der hochkonservierten Basensequenz bei gleichzeitiger ubiquitärer Verbreitung sind die amplifizierten Nukleinsäureabschnitte als phylogenetische Marker in Diversitätsanalysen von Ökosystemen einsetzbar. In den PCR-Ansätzen wurden Teilbereiche von 500 bp bzw. 1254 bp Länge anhand von Oligonukleotid-Primern mit Spezifität für methanogene Archaea amplifiziert (**Tab. 18**). Das 500 bp-Amplifikat wurde dabei mittels DGGE untersucht, während das 1254 bp-Amplifikat für Klonierungsreaktionen und ARDRA-Analysen oder zur Direktidentifikation von Reinkulturen verwendet wurde. Nach einer Überarbeitung des ARDRA-Protokolls wurde hierfür ein 1440 bp-Amplifikat mittels der Primerpaarung Met86f/AR1530R amplifiziert und eingesetzt (siehe **II.2.5**). Es ersetzte für diese Anwendung das Amplifikat, welches weiterhin standardmäßig für taxonomische Untersuchungen herangezogen wurde. Die Etablierung eines geeigneten Amplifikationsprogramms für die Nutzung von DNA-Extrakten aus BGA-Fermenterproben erfolgte auf Basis der für die jeweiligen Primerkombinationen in der Literatur publizierten Bedingungen. Durch Testreihen wurde ein Mindesteinsatzvolumen von 0,5 µL des mittels des Reaktionskits gewonnenen DNA-Extraktes bestimmt (**Abb. 31**). Aufgrund geringerer DNA-Konzentrationen wurde für eine erfolgreiche Amplifikation ein Volumen von 5 µL des durch das klassische Fällungsprotokoll aus BGA-Fermenterproben gewonnenen Extraktes benötigt. Um die Polymerisierungsreaktion gegen etwaige verbleibende Spuren von Inhibitorstoffen abzusichern, wurde jedem Reaktionsansatz  $2 \times 10^{-5}$  g Rinderserumalbumin (BSA) zugefügt. Alle Komponenten des PCR-Ansatzes sind in **Tab. 19** zusammengefasst. Die Amplifikation wurde in Thermocyclern der Marke Mastercycler gradient mit zwei verschiedenen Temperaturprogrammen durchgeführt: Für die Amplifikation der 500 bp- und 1254 bp-Fragmente kam das in **Tabelle 20** aufgeführte touch-down-Programm zum Einsatz. Die Amplifikation eines durch das Primerpaar Met86f/AR1530R definierten 1444 bp-Fragments wurde mittels des Temperaturprogrammes TDX vorgenommen (**Tab. 21**)

**Tab. 18: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung von archaeellen 16S rDNA-Fragmenten.**

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge	T <sub>M</sub> [°C]	Größe <sub>Amplifikat</sub> [bp]	Referenz
Ar1000f	AGT CAG GCA ACG AGC GAG A	19-mer	60		
Ar1500r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	19-mer	53		
Ar1000f-GC <sup>1)</sup>	[CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CGG CCG CC] AGT CAG GCA ACG AGC GAG A	[57] 19-mer	60	500	Tatsuoka <i>et al.</i> , 2007
Met86f	GCT CAG TAA CAC GTG G	16-mer	51	1254	Wright und Pimm, 2003
Met1340r	CGG TGT GTG CAA GGA G	16-mer	53		
AR1530R <sup>2)</sup>	GGA GGT GAT CCA GCC G	16-mer	56	1444 <sup>2)</sup>	Mori <i>et al.</i> , 2008

<sup>1)</sup>Primer mit GC-Klammer zur partiellen Amplifikation des archaeellen 16S rRNA-Gens für den Einsatz in einer DGGE-Analyse. Ersetzt dort den Primer Ar1000f.

<sup>2)</sup>Verwendet in Primerpaarung Met86f/AR1530R.



**Abb. 31: Testreihe zur Ermittlung des minimalen DNA-Extraktvolumens für erfolgreiche Amplifikation.** DNA-Extrakt aus BGA Arenrath (Fermenter), Präparation per Reaktionskit. Angegeben sind die eingesetzten Volumina in  $\mu\text{L}$  pro 50  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz. M = GeneRuler<sup>TM</sup>

**Tab. 19: Reaktionsansatz zur Amplifikation von 16S rDNA aus Gesamt-DNA-Extrakten aus Biogas-Reaktorproben.**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Reinstwasser (steril)	32,7
High Yield Buffer <sup>1)</sup>	5
DNA-Extrakt	5 <sup>2)</sup>
Primer, forward (c = 10 pM)	2
Primer, reverse (c = 10 pM)	2
dNTP-Mix (c = 10 mM) <sup>1)</sup>	2
Rinderserumalbumin (BSA; c = 20 mg mL <sup>-1</sup> )	1
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (c = 5 U $\mu\text{L}^{-1}$ ) <sup>1)</sup>	0,3

<sup>1)</sup>PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

<sup>2)</sup>0,5  $\mu\text{L}$ , wenn der DNA-Extrakt mittels GeneMATRIX Stool Purification Reaktionskit hergestellt wurde. Die daraus resultierende Volumendifferenz wurde durch zusätzliche Zugabe von 4,5  $\mu\text{L}$  sterilem Reinstwasser kompensiert.

**Tab. 20: „Touch-down“-Temperaturprogramm zur PCR-Amplifikation archaeeller 16S rRNA-Genfragmente mittels der Primerpaare Ar1000f/Ar1500r und Met86f/Met1340r.**

Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung I	95	60	15
Hybridisierung I	57 - 53	60	
Elongation I	72	60	
Denaturierung II	95	60	20
Hybridisierung II	53	60	
Elongation II	72	60	
finale Elongation	72	600	1

**Tab. 21: Temperaturprogramm TDX zur PCR-Amplifikation archaeeller 16S rRNA-Genfragmente mittels des Primerpaars Met86f/AR1530.**

Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	900	1
Denaturierung	95	30	16
Hybridisierung	55 – 56,5	45	
Elongation	72	90	
Denaturierung	95	30	21
Hybridisierung	56	45	
Elongation	72	90	
finale Elongation	72	300	1

### II.2.3.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) von 16S rRNA-Genfragmenten

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) stellt ein molekularbiologisches Verfahren zur Quantifizierung von Genen und Genfragmenten sowie deren Expression in Zell- und Mikroorganismenkulturen dar. Es findet im biomedizinischen Bereich u.a. Anwendung in der Untersuchung von Genregulationsmustern, der Pathogendetektion und der Genotypisierung. Daneben ermöglicht die qPCR die quantitative Bestimmung der Zusammensetzung von Mikroorganismen-Populationen in Proben aus Umwelt-Biozönosen. Grundprinzip des Nachweises bildet eine Amplifikation kurzer Zielgenfragmente (< 500 bp, meist etwa 200 bp) in Kombination mit der Zunahme eines Fluoreszenzsignales proportional zum Amplifizierungsgrad. Die Fluoreszenzemission kann dabei entweder sequenzspezifisch oder -unspezifisch erfolgen. In einem Versuchsaufbau mit sequenzspezifischer Fluoreszenzemission werden zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotid-Sonden entworfen, an deren 3'-Ende ein Fluorophor gebunden ist. An das 5'-Ende wird ein Quencher-molekül synthetisiert, welches im Förster-Radius die Fluoreszenzemission des Fluorophors inhibiert. Im Verlauf der Amplifikation mittels Primer, welche stromauf- und stromabwärts der Sonde

binden, stösst nun eine DNA-abhängige DNA-Polymerase auf das 5'-Ende der an die Template-DNA gebundenen Sonde. Die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase baut die Sonde ab, wodurch das Fluorophor freigesetzt, aus dem Förster-Radius des Quenchers entfernt und die Fluoreszenzemission initiiert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine sequenzunspezifische, sondenfreie qPCR zur Quantifizierung methanogener Archaea in BGA-Fermentersubstrat über einen Zellzahlstandard aus Kulturen angewandt. Dabei wurde das Fluorophor SYBR<sup>®</sup> Green eingesetzt, welches an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Dadurch kommt es zur Zunahme der Fluoreszenzemission etwa um den Faktor  $10^3$ , sodass mit zunehmender Anzahl an doppelsträngigen Amplifikaten eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz erreicht wird.

Im Vorfeld zu qPCR-Experimenten erfolgte die einmalige Eichung des Mastercycler ep realplex<sup>2</sup> auf die verwendeten Plastik-Reaktionsgefässe (II.1.4). Die Zuordnung von Fluoreszenzintensitäten zu Zellzahlen wurde durch Erstellen einer Kalibrierungsgerade erreicht. Dafür wurden Kulturen von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> und *Msc. mazei* Gö in den beschriebenen Medien angezogen. Um *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> in auszählbarer Form als Einzelstäbchen oder Kurzketten zu erhalten, wurde dieser Organismus in 287P Medium mit einer NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration von 4 g L<sup>-1</sup> kultiviert. Mittels einer Thoma-Zählkammer mit einer Kammertiefe  $D$  von 0,02 mm und einer Kleinquadratfläche von 0,0025 mm<sup>2</sup> wurden die Kulturen ausgezählt und der Zelltiter  $T$  mit dem Mittelwert aus zwei mal fünf ausgezählten Großquadraten ( $MW_{(5 \times 2)}$ ), dem Verdünnungsfaktor  $F$  und der ausgezählten Großquadratfläche  $A$  (entspricht 16facher Kleinquadratfläche) nach

$$(15) T = \frac{MW_{(5 \times 2)} \times F}{A \times D} \times 1000 \text{ [Zellen mL}^{-1}\text{]}$$

bestimmt. Aus einem Kulturvolumen entsprechend  $10^9$  Zellen bzw.  $10^8$  Zellen (im Fall von *Msc. mazei* Gö) wurde die genomische DNA extrahiert, in 100 µL Elutionspuffer aufgenommen und dekadisch mit PCR-fähigem Wasser bis auf eine Äquivalenzkonzentration von  $10^4$  Zellen verdünnt. Sowohl die Standards der Kalibrierungsgerade als auch die zu untersuchenden Extrakte aus BGA-Fermentern oder Kulturen wurden jeweils in dreifacher Ausführung erstellt. Zur Amplifikation eines 16S rRNA-Genfragments wurden ordnungsspezifische Primer (Tab. 24) nach Yu *et al.* (2005), Yu *et al.* (2006) und Sawayama *et al.* (2006) im Maxima SYBR Green Master Mix für ein Ansatzvolumen von 25 µL eingesetzt (Tab. 22). Die Temperaturprogramme nach eingesetztem Primerpaar sind in Tab. 23 dargestellt. Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve der amplifizierten

Fragmente aufgenommen. Dafür wurde die Reaktionstemperatur über einen Zeitraum von 30 min kontinuierlich in 20-Sekunden-Schritten gesteigert. Nach jedem Schritt erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzintensität und das automatische Auftragen gegen die korrespondierende Temperatur. Anhand dieser Schmelzkurve konnte nachvollzogen werden, ob die während der Amplifikationszyklen aufgenommenen Signale auf das gewünschte Amplifikat oder auf unspezifische Bindungen des Fluorophors zurückzuführen waren. Zur Korrelation von Fluoreszenzintensität und Zellzahl wurde der Zyklus des Übertritts eines experimentspezifischen, relativen Fluoreszenzintensitäts-Schwellenwertes ( $c_t$ , engl. *cycle threshold*) gegen die jeweilige Zellzahl der Standardprobe aufgetragen. Der  $c_t$ -Wert bezeichnet dabei denjenigen Amplifikationszyklus, bei dem sich die Fluoreszenzintensität zum ersten Mal signifikant über das Hintergrundrauschen abhebt. Je höher die Zellzahl und damit die Anzahl an 16S rRNA-Zielsequenzen, desto eher wird der Schwellenwert überschritten (**Abb. 32A**). Damit steht der  $c_t$ -Wert in direktem Zusammenhang mit der Quantität des zu untersuchenden Genfragments und bildet über die Kalibrierungsgerade ein Maß zu deren Bestimmung. Nach Bereinigung der Kalibrierungsgerade von eventuellen Ausreißerwerten wurde die Geradengleichung ermittelt und zur Berechnung der Zellzahl über den Vergleich aufgenommener  $c_t$ -Werte der unbekannteren Proben mit denen der Kalibrierungsgerade eingesetzt (**Abb. 32B**). Es gilt für den einem gegebenen  $c_t$ -Wert zugehörigen Zelltiter  $T_{qPCR}$  mit der Steigung  $m$  und dem konstanten Faktor  $b$  der Kalibrierungsgeraden

$$(16) T_{qPCR} = 10^{\frac{c_t - b}{m}} \quad [\text{Zellen mL}^{-1}].$$

Ferner erfolgte mithilfe der Kalibrierungsgeraden die Berechnung der PCR-Effizienz  $E$  nach

$$(17) E = 10^{\frac{-1}{m}} - 1 \quad [\%]$$

sowie die Kontrolle des Bestimmtheitsmaßes. Nur Kalibrierungsgeraden mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 \geq 0,95$  wurden verwendet.

**Tab. 22: Reaktionsansatz zur quantitativen Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten mittels qPCR.** Das Gesamtansatzvolumen betrug 25  $\mu$ L. Alle Proben wurden in Triplikaten erstellt.

Komponente	Volumen [ $\mu$ L]
Maxima SYBR Green Master Mix	12,50
Primer, forward (c = 10 pM)	0,75
Primer, reverse (c = 10 pM)	0,75
DNA-Extrakt	2,00
Reinstwasser (steril, Nuklease-frei)	9,00

**Tab. 23: Temperaturprogramm zur quantitativen Amplifikation von 16S rRNA-Genfragmenten methanogener Archaea**

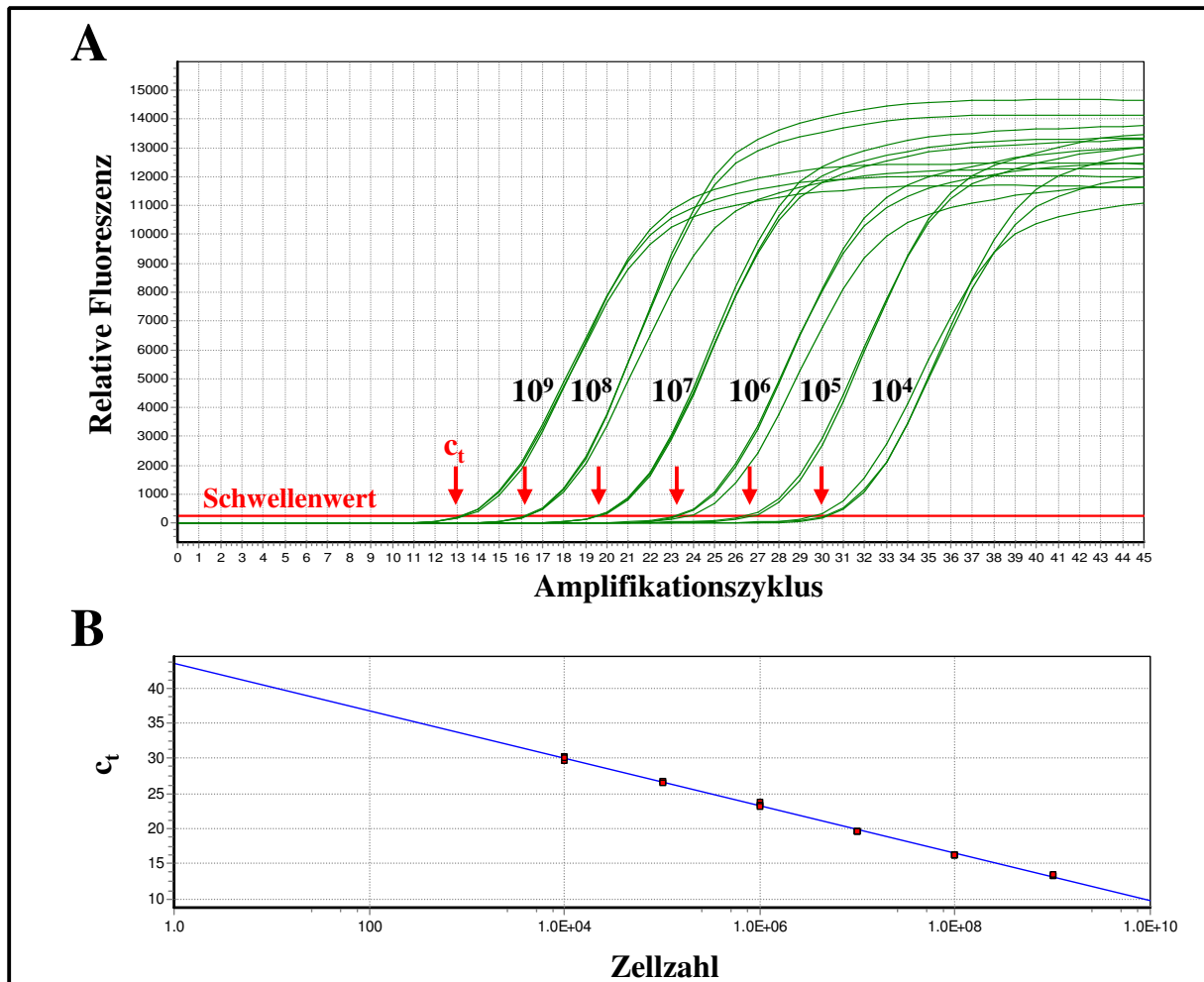
Phase	T [ $^{\circ}$ C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	10	
Hybridisierung	55,2 (MMB, MBT, Mst) 61 (Msar)	30	45
Elongation	72	30	
Schmelzkurve			
Starttemperatur	60	20	1
Endtemperatur	95	20	(1800 s) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>kontinuierliche Erhöhung der Temperatur in 20-Sekunden-Schritten über 30 min.

**Tab. 24: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer zur quantitativen Amplifizierung von 16S rRNA-Genfragmenten methanogener Archaea.**

Name	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	Länge	T <sub>M</sub> [ $^{\circ}$ C]	Größe <sub>Amplifikat</sub> [bp]	Spezifität
Msar450F <sup>1)</sup>	TAG CAA GGG CCG GGC AAG A	19-mer	62	139	<i>Methanosarcina</i> sp
Msar589R <sup>1)</sup>	ATC CCG GAG GAC TGA CCA AA	20-mer	61		<b>Sawayama et al. (2006)</b>
Mst702F	TAATC CTYGA RGGAC CACCA	20-mer	61	160	<i>Methanosaeta</i> sp.
Mst862R	CCTAC GGCAC CRACM AC	17-mer	62		<b>Yu et al. (2005)</b>
MMB282F	ATC GRT ACG GGT TGT AAG T	19-mer	64	550	Methanomicrobiales
MMB832R	CAC CTA ACG CRC ATH GTT TAC	21-mer	62		<b>Yu et al. (2005)</b>
MBT857F	CGW AGG GAA GCT GTT AAG T	19-mer	61	339	Methanobacterales
MBT1196R	TAC CGT CGT CCA CTC CTT	18-mer	63		<b>Yu et al. (2005)</b>
MSL812F	GTAAA CGATR YTCGC TAGGT	20-mer	57	354	Methanosarcinales
MSL1159R	GGTCC CCACA GWGTA CC	17-mer	59		<b>Yu et al. (2006)</b>

<sup>1</sup>Vollständige Namen: Msar450F = S-G-Msar-0450-S-a-19; Msar589R = S-G-Msar0589-S-a-20.



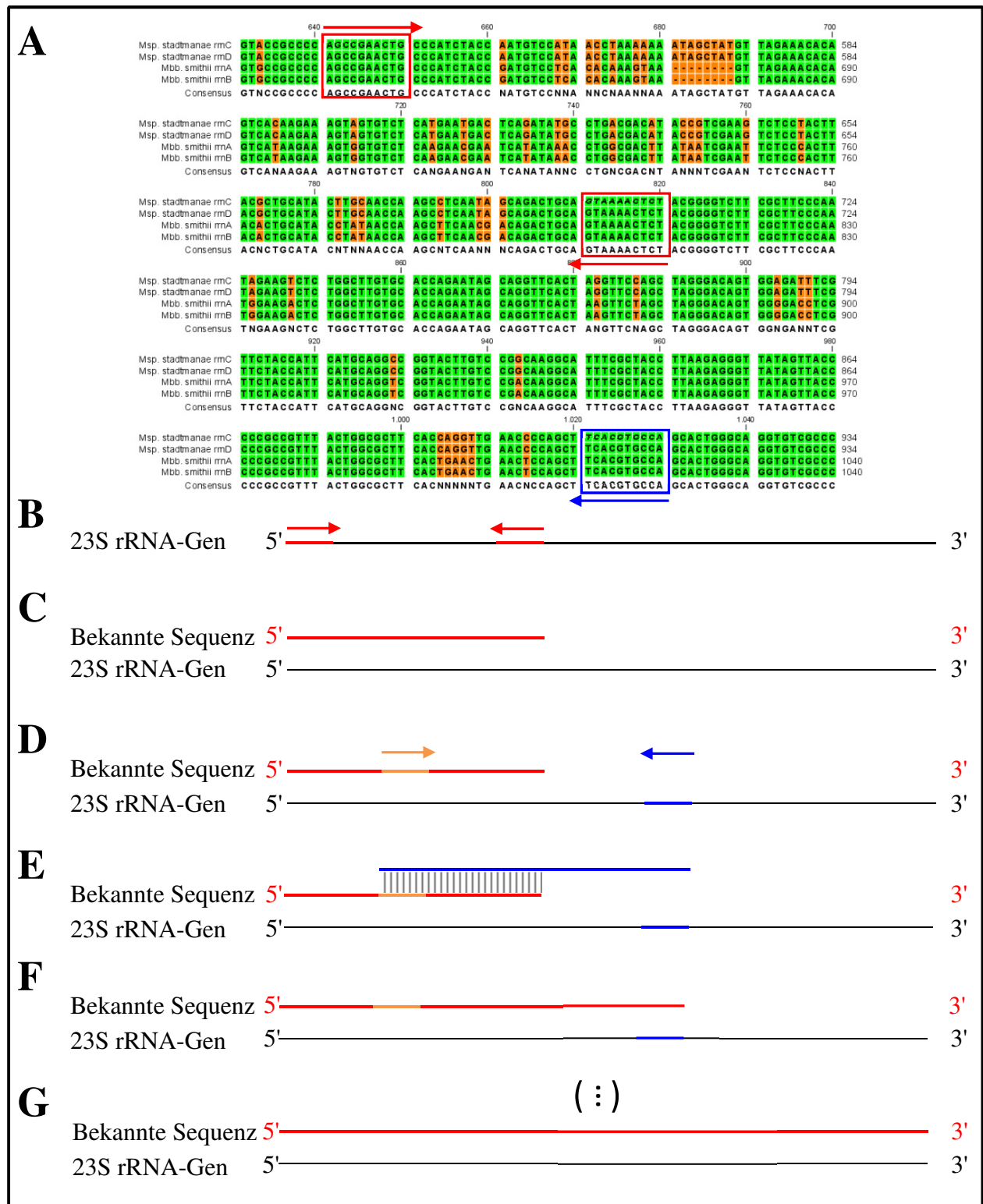
**Abb. 32: Beispielhafte Aufnahme einer Kalibrierungsgeraden zur Quantifizierung methanogener Archaea mittels qPCR.** Gezeigt sind die Kurvenverläufe der Fluoreszenzsignalentwicklung von Zellzahlstandards von  $10^4$  bis  $10^9$ . Die rote Linie bezeichnet die Hintergrund-Fluoreszenzschwelle (231 relative Einheiten). Rote Pfeile ( $\rightarrow$ ) markieren mit dem  $c_t$ -Wert den Zyklus des erstmaligen Übertritts der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Standards aufgrund zunehmender Amplifikation (A). Die Aufnahme einer Standard-Eichgerade durch Auftragen der  $c_t$ -Werte gegen die jeweils korrelierende Zellzahl ermöglicht über die Berechnung der Geradengleichung die Bestimmung der Zellzahl aus dem  $c_t$ -Wert der unbekannt Probe (B).

### II.2.3.3 Amplifikation und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens von Vertretern der Gattung *Methanobacterium*

Um eine Detektion bzw. Quantifizierung spezifischer Gattungen oder Arten methanogener Archaea in Flüssigkultur und Fermenterflüssigkeit zu ermöglichen, wurden zwei Ansätze verfolgt. In Ergänzung zu qPCR-basierten Analysen (siehe II.2.3.2) wurde die Anwendung von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) mittels spezifischer Sonden geprüft. Als Grundlage der *in situ*-Hybridisierung wurde das 23S rRNA-Gen gewählt, welches im Vergleich zum Leserahmen der 16S rRNA sowohl eine längere Sequenz (etwa 3 kb) und damit höheren Informationsgehalt aufweist, als auch von höherer Diversität ist. Der Fokus der Arbeiten lag zunächst auf *Mb formicicum* MF<sup>T</sup> und wurde später auf das 23S rRNA-Gen anderer Vertreter der Gattung *Methanobacterium* ausgeweitet. Da für diese Organismen keine

23S rDNA-Sequenzen bekannt waren, wurde dieser Leserahmen zunächst über einen Primer-walking-Ansatz sequenziert. Dazu wurden *in silico* mittels eines Alignments konservierte Regionen in den bekannten 23S rRNA-Leserahmen nahe verwandter Organismen ermittelt (**Abb. 33A**) und anhand dieser eine erste Primerpaarung für die Amplifikation des entsprechenden Genlocus von *Mb. formicicum* MS<sup>T</sup> erstellt (**Abb. 33B**). Das daraus entstandene Amplifikat wurde sequenziert (LGC Genomics GmbH, Berlin) und stellte den ersten Teilabschnitt des Leserahmens dar (**Abb. 33C**). Auf Basis dieser resultierenden Teilsequenz wurde anschließend ein forward-Primer entwickelt (**Abb. 33D, orange**). Parallel dazu erfolgte erneut die Ableitung eines kompatiblen, reversen Primers aus konservierten Regionen des Gesamtalignments bekannter 23S rRNA-Gensequenzen, der stromabwärts des für die Amplifikation des ersten Teilabschnittes benötigten revers-Primers hybridisierte (**Abb. 33A, D, blau**). Die aus diesem zweiten Primerpaar resultierende Sequenz bestand daher aus dem 3'-Bereich der ersten Teilsequenz und dem im unbekanntem Leserahmen folgenden Abschnitt. Ausreichend große, überlappende Sequenzbereiche (**Abb. 33E**) vorausgesetzt, konnten die zwei Sequenzen *in silico* zu einer Gesamtsequenz vereinigt werden (**Abb. 33F**). Die Wiederholung dieser Schritte ermöglichte die sukzessive Sequenzierung des gesamten Leserahmens (**Abb. 33G**). Zur Verfolgung dieser Strategie wurde zunächst mittels des Programms CLC Sequence Viewer 5.8 ein Alignment von 36 23S rRNA-Leserahmen aus 16 verschiedenen methanogenen Archaea konstruiert und zwecks Entwurf eines ersten Primerpaares auf konservierte Regionen hin untersucht. Aufgrund zu starker Sequenz-diversität wurde der Umfang des Alignments auf nah verwandte Spezies reduziert. Aus diesen Alignments heraus gelang die Sequenzierung des 23S rRNA-Leserahmens von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und weiteren Arten der Gattung *Methanobacterium* (**III.5.5**). Die dafür eingesetzten Oligonukleotid-Primer sind in **Tab. 25** zusammengefasst. Zwei verschiedene Temperaturprogramme wurden zur Amplifizierung entworfen: MBFOR1 und MBFOR232. MBFOR1 stellt eine Kombination aus Touch-down- und Gradienten-PCR dar (**Tab. 26**). Es wurde zum Ermitteln der besten Amplifikationsbedingungen nach Erhalt einer neuen Primerkombination angewandt. So konnte ein Spektrum von 55 °C bis 59 °C auf eine ideale Hybridisierungstemperatur überprüft werden. Zur schnellen Amplifikation mittels etablierter Primerkombinationen kam dann das nach dieser Temperatur modifizierte Programm MBFOR232 zum Einsatz (**Tab. 27**).





**Abb. 33: Prinzip des „primer walking“-Verfahrens zur Sequenzierung unbekannter Gene am Beispiel des 23S rRNA-Leserahmens (Schema).** Über ein Alignment wurden zunächst konservierte Regionen für das Design des ersten Primerpaares (rote Pfeile) genutzt (A, B). Das Amplifikat wurde sequenziert und stellt den ersten Abschnitt des Leserahmens dar (C). Aus dieser Sequenz wurde ein neuer Primer abgeleitet (orange) und mit einer aus dem Alignment abgeleiteten Primersequenz (blau) gepaart (D). Nach der Sequenzierung konnten beide Teilsequenzen dank überlappender Zwischensequenz (E) zu einer großen Sequenz verbunden werden (F). Nach gleichem Prinzip wurden weitere Primerpaare für die nächsten Sequenzabschnitte gebildet. Sukzessive ergänzten sich so die Teilsequenzen zur Gesamtsequenz des gesuchten Leserahmens (G).

**Tabelle 25: Übersicht über die eingesetzten Primerkombinationen zur 23S rDNA Sequenzierung von Arten der Gattung *Methanobacterium*.**

Name	Sequenz (5'→3')	Länge	T <sub>M</sub> [°C]	Größe <sub>Amplifikat</sub> [bp]	Fragment <sup>1)</sup>	Referenz
<b>Leserahmen A von <i>Mb. formicicum</i> MF<sup>T</sup></b>						
Mbfo5fwA	ACC TCA GGC TTA GAT GCT TT	20-mer	55,3	1686	I	diese Arbeit
Mbfo4rvA	CAC CCT TTA ACG AGT TCG TAA	21-mer	55,9			
Mbfo5fwE	CTA CCA GGA TCC GCA TTC	18-mer	56,0	1075	II	diese Arbeit
Mbfo4rvD	CCG TAG AGG GTG ATA GTC	18-mer	56,0			
Mbfo6fwA	ATC TGG TTT CAG GTT CTT TTC	21-mer	54,0	500	III	diese Arbeit
Mbfo6rvAT/C	TCG TGG YAA GCT GCG ATA	18-mer	54,8			
<b>Leserahmen B von <i>Mb. formicicum</i> MF<sup>T</sup></b>						
MbfoII1f	TCG CGG CAA GCA GCG A	16-mer	56,9	1194	1	diese Arbeit
MbfoII1r	CTG CTT CTA AGC CCA CCT	18-mer	56,0			
MbfoII2f	CTC GGC ATC CTG TAA AAC	18-mer	53,7	1611	2	diese Arbeit
MbfoII2r	GAA CCG ACA TCG AAG TAG	18-mer	53,7			
MbfoII2Bf	GGT GAC AGC TGG TTC C	16-mer	54,3	1669	2b	diese Arbeit
MbfoII2Br	CTC TTG CCT GCG ACC A	16-mer	54,3			
MbfoII3bf	AAA CAT AGC TCC TAG CAA G	19-mer	52,4	1017	3	diese Arbeit
MbfoII3r	ACA GGT CTT CTA CCC ATG	18-mer	53,7			
<b>Fragment II-Homologe in weiteren Vertretern der Gattung <i>Methanobacterium</i><sup>2)</sup></b>						
Mbfo5fwD	CAG GAA TAT TAA CCT GTT TCC	21-mer	54,0	1469	IIb	diese Arbeit
Mbfo6rvAT/C	TCG TGG YAA GCT GCG ATA	18-mer	54,8			
Mbfo5fwE	CTA CCA GGA TCC GCA TTC	18-mer	56,0	1361	IIc	diese Arbeit
Mbfo6rvAT/C	TCG TGG YAA GCT GCG ATA	18-mer	54,8			

<sup>1)</sup>Bezeichnung des Fragmentes<sup>2)</sup>Umfassen und ersetzen Fragment II und III zur Sequenzierung von weiteren Arten der Gattung *Methanobacterium* in Überlappung mit Fragment I

**Tabelle 26: Temperaturprogramm MBFOR1 zur Amplifikation von 23S rDNA-Fragmenten von Vertretern der Gattung *Methanobacterium*.**

Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung I	94	70	15
Hybridisierung I	59 – 54,5 <sup>1)</sup>	70	
Elongation I	72	90	
Denaturierung II	94	70	25
Hybridisierung II	57 +/-2 <sup>2)</sup>	70	
Elongation II	72	90	
finale Elongation	72	600	1

<sup>1)</sup>Touch-down-Phase: Reduzierung der Temperatur um 0,3 °C pro Zyklus

<sup>2)</sup>Hybridisierungstemperatur-Gradient von 55 °C bis 59 °C.

**Tabelle 27: Temperaturprogramm MBFOR232 zur Amplifikation von 23S rDNA-Fragmenten von Vertretern der Gattung *Methanobacterium*.**

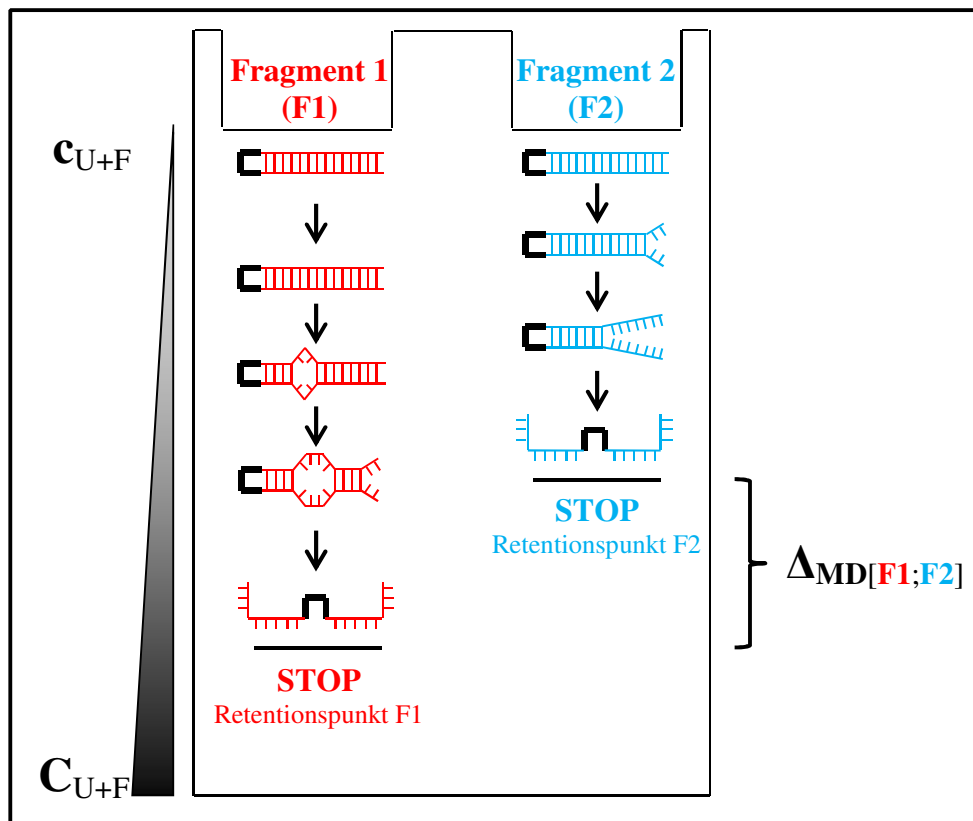
Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung I	94	70	15
Hybridisierung I	59 – 54,5	70	
Elongation I	72	100	
Denaturierung II	94	70	20
Hybridisierung II	56 <sup>1)</sup>	70	
Elongation II	72	100	
finale Elongation	72	600	1

<sup>1)</sup>Individuelle Anpassung an verwendete Primerkombination nach Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur mittels Temperaturprogramm MBFOR1 (Tab. 26).

#### II.2.4 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Bei der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) handelt es sich um eine Fingerprint-Methode zur elektrophoretischen Separation eines Nukleinsäure-Gemischs in einzelne Fraktionen. Das von **Muyzer *et al.*, 1993** beschriebene Verfahren resultiert zwar, analog zur klassischen Agarose-Gelelektrophorese (Agarose-GE), ebenso in DNA-Banden, jedoch liegt hier ein anderes Separationsprinzip zugrunde. Finden sich im herkömmlichen Agarose-GE-Verfahren die Fraktionen in DNA-Banden identischer Fragmentlängen wieder, so resultiert die Separation per DGGE in Banden identischer prozentualer GC-Basenzusammensetzung. Dabei besteht die Matrix für die Nukleinsäure-Auftrennung nicht in einem Agarosegel von konstanter Konzentration, sondern in einem Polyacrylamidgel, in welchem ein Gradient der chemischen, denaturierenden Agenzien Harnstoff und Formamid vorliegt. So befindet sich in der Regel die geringste Konzentration der Agenzien auf Höhe der Startfront und steigt dann linear mit der Gellänge. Die Retentionszeit und -strecke eines gegebenen

Nukleinsäure-Fragments hängt dabei von der Nukleotidzusammensetzung ab: Aufgrund der durch nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Adenin-Thymidin Basenpaarungen (A=T) benötigen diese im Vergleich zu den durch drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Guanin-Cytosin (G≡C) Basenpaarungen weniger Energie zur Aufschmelzung innerhalb eines Nukleinsäuremoleküls. Bewegt sich ein DNA-Molekül nun im Spannungsfeld in Richtung der Kathode, so bewegt es sich parallel auch innerhalb des denaturierenden Gradienten in Richtung höherer Konzentrationen. Mit fortschreitender Bewegung in der Matrix schmelzen daher sukzessive immer mehr Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaarungen auf. Insbesondere A=T-reiche Regionen bilden aufgrund der niedrigeren Schmelzenergie  $E_M$  Startpunkte lokal einzelsträngiger Domänen, während G≡C-reiche Teilsequenzen über höhere Stabilität verfügen und länger in doppelsträngiger Anordnung (dsDNA) verbleiben. Die dreidimensionale Konformation des nahezu vollständig einzelsträngig (ssDNA) vorliegenden Moleküls führt zu einer Retention an einem spezifischen Punkt innerhalb des Gradienten, von dem aus es nicht weiter in Richtung der Kathode „gezogen“ wird. Hier neutralisiert die Interaktion der Summe aller einzelsträngigen Bereiche in einem Molekül mit der Gelmatrix exakt das Bewegungsbestreben während der Elektrophorese. Ein über PCR-Primer an das Amplifikat angefügtes polyG≡C-Fragment von 30-40 bp Länge, die sog. GC-Klammer, verhindert die vollständige Denaturierung des DNA-Fragments in zwei ssDNA-Stränge und damit ein ungehindertes Durchwandern der Polyacrylamidgel-Matrix. Dadurch liegt am Ende der Migrationsweite eines gegebenen DNA-Moleküls ein bis auf den Bereich der GC-Klammer einzelsträngiges Molekül vor, bei dem auch die letzten G≡C-reichen Sequenzinseln aufgeschmolzen sind (**Abb. 34**). Amplifiziert man das 16S rRNA-Gen aus einem Gesamt-DNA-Extrakt einer Umweltprobe mithilfe einer spezifischen und zudem GC-Klammer codierenden Primerpaarung, so erhält man eine Mischung einer Anzahl von Fragmenten verschiedener Sequenz analog zur Anzahl der in der Umweltprobe vorhandenen Organismen (so die Primer an die 16S rDNA-Leserahmen aller dieser Organismen binden können). Da sich die Sequenzen aller Organismen sowohl in prozentualer G≡C-Zusammensetzung, als auch in Position der jeweiligen G≡C-Paarungen unterscheiden, bilden sich zu Beginn der Elektrophorese bereits verschiedene partiell denaturierte Domänen. Diese schmelzen nun proportional mit der Migrationsweite im Gel weiter auf, bis die durch die GC-Klammer vorgegebene, maximal-einzelsträngige Konformation vorliegt. Dieser Zustand wird abhängig vom prozentualen G≡C-Anteil früher oder später im denaturierenden Gradienten erreicht. Dementsprechend ergeben sich für jedes Fragment unterschiedliche Retentionspositionen. Jede Bande im resultierenden Fingerprint-



**Abb. 34: Separationsprinzip der DGGE.** Beispielhafte Elektrophorese eines G=C-reichen Fragments (F1, rot) im Vergleich zu einem G=C-ärmeren Fragment (F2, blau). Parallel zur Migration im Spannungsfeld wandern die Moleküle in Richtung höherer Konzentrationen denaturierender Agenzien. Es ergibt sich zunächst ein sukzessives Aufschmelzen einzelner doppelsträngiger Domänen bis zur maximal denaturierten ssDNA. Das Erreichen dieser offenen Konformation ist abhängig vom G=C-Gehalt und markiert den Retentionspunkt im Gradientengel.  $c_{H+F}$  = geringe Konzentration an Harnstoff und Formamid,  $C_{H+F}$  = hohe Konzentration an Urea und Formamid,  $\Delta_{MD}[F1;F2]$  = Unterschied der Migrationsweiten von Fragment 1 und 2. Verändert nach **Felske und Osborn, 2005**.

Muster repräsentiert dabei im Idealfall eine Spezies der Umweltprobe. So kann die Methode zur Analyse von Populationen nicht oder schwer kultivierbarer (Mikro-)Organismen eingesetzt werden. Im Experimentalverlauf dieser Arbeit ergaben sich zwei Anwendungsfelder für die DGGE-Methodik: Für das Erlangen eines ersten Überblicks über die Diversität methanogener Archaea in BGA-Fermenterproben und zur Überprüfung des Reinheitsgrades von Anreicherungs- und Reinkulturen. Ausgehend von den zu untersuchenden BGA-Fermenterproben oder archaeellen Kulturen erfolgte in einem ersten Schritt zunächst die Extraktion der genomischen Gesamt-DNA (**II.2.1, II.2.2**) und die Amplifikation eines 500 bp-Fragmentes des 16S rRNA-Leserahmen der in der Probe vorliegenden Spezies im beschriebenen „touch-down“-Temperaturprogramm (**Tab. 20**). Für jede Probe wurden zwei PCR-Ansätze von je 50  $\mu$ L Volumen erstellt, welche im Verlauf der anschließenden Aufreinigung von überzähligen Reaktionskomponenten befreit und auf ein Elutionsvolumen von 35  $\mu$ L aufkonzentriert wurden. Nach Zugabe von 7  $\mu$ L eines 6x DNA-Probenpuffers wurde das Gesamtvolumen in eine Spur des Elektrophoresegels aufgetragen. Zur Herstellung

des Gradienten-Polyacrylamidgels wurden die Lösungen mit den Grenzkonzentrationen an denaturierenden Agenzien (**Tab. 28**) in die entsprechenden Kammern der Gradienten

**Tab. 28: Zusammensetzung der Grenzkonzentrationslösungen denaturierender Agenzien zur Anfertigung von Chemogradient-Polyacrylamidgelen für die Auftrennung und Analyse von 16S rRNA-Genamplifikaten per DGGE.**

Reagenz	Gradienten-Grenzkonzentration [Angaben in g [Harnstoff] bzw. mL]								
	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %	65 %	70 %
Harnstoff	1,9	2,2	2,5	2,8	3,1	3,4	3,7	4,0	4,3
Formamid	1,8	2,1	2,4	2,7	3,0	3,3	3,6	3,9	4,2
ddH <sub>2</sub> O	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5
40% Bisacrylamid	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
50 x TAE-Puffer, pH 7,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Glycerin	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
APS, 1M <sup>1)</sup>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED, 1M <sup>1)</sup>	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045

<sup>1)</sup>Polymerisationsstarter; Zugabe als letzte Komponenten in die Kammern des Gießstandes unmittelbar vor dem Gießguss.

mischanlage (IMW Eigenbau, **Abb. 35A, B**) eingefüllt. Ein von 30 % (w/v) bis 70 % (w/v) aufsteigender Gradient denaturierender Substanzen wurde bei Proben unbekannter Spezieszusammensetzung genutzt. Konnte eine Retention der DNA-Banden in den mittleren Bereichen dieses Gradienten beobachtet werden so wurde der Gradient zwecks besserer Separation der Migrationsweite angepasst. Bei Anreicherungs- oder Reinkulturen methanogener Archaea wurde ein denaturierender Gradient von 40 % (w/v) bis 60 % (w/v) angewandt. Durch Zugabe von je 100 µL 1 M Ammoniumpersulfat (APS) und 4 µL Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisation der beiden Gelkomponenten gestartet und der Gießvorgang zügig vollendet. Der Aufbau des vertikalen Gelgießstands erfolgte nach Herstellerangaben, zusätzlich wurde dieser mittels Teflonband gegen Auslaufen der, in den frühen Stadien der Polymerisierungsreaktion semiliquiden, Gelmasse abgedichtet. Nach Ablauf der Polymerisationsdauer von 3 h bei Raumtemperatur wurde das Teflonband entfernt und das fertige Gel zwecks Beladung mit Probenmaterial in die Elektrophoreseapparaturspannt (**Abb. 35C**). Die Auftrennung der 16S rRNA-Genamplifikatpopulation erfolgte in 7 L 1 x TAE-Puffer (50x Stammlösung: 0,05 M Na<sub>2</sub>EDTA × 2 H<sub>2</sub>O, 1 M Natriumacetat, 2 M Tris) bei 50 V über Nacht, mindestens jedoch für 12 h. Die an den „forward“-Primer Ar1000f-GC fusionierte GC- Klammer verhinderte eine komplette Denaturierung der dsDNA-Fragmente in zwei ssDNA-Moleküle während der Gelelektrophorese.

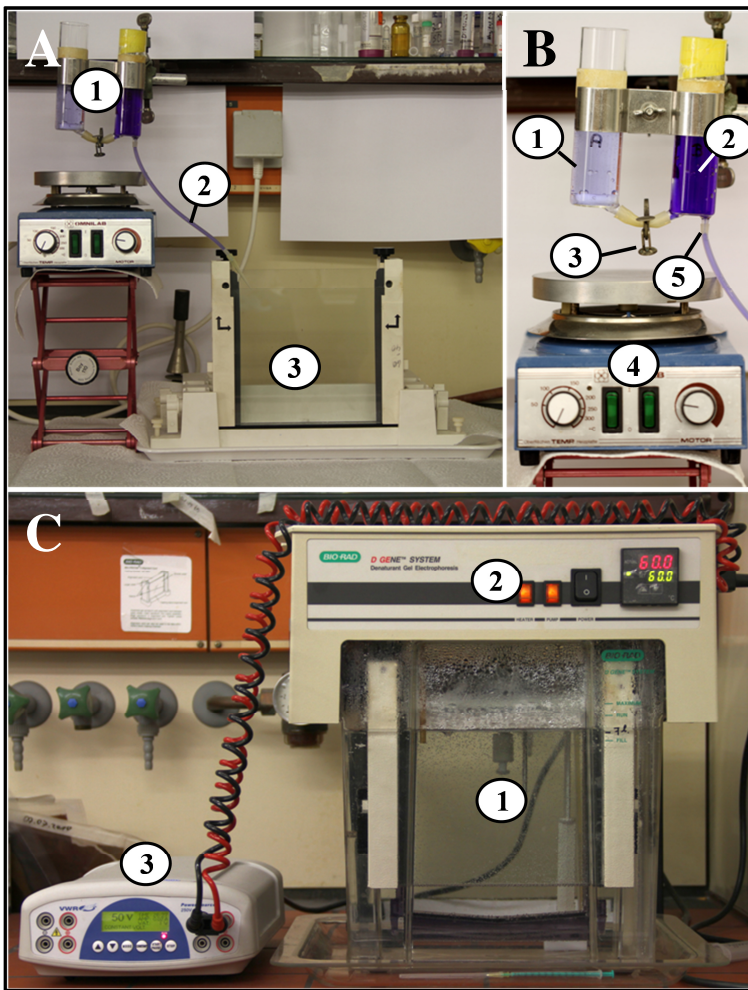


Abb. 35: Aufbau zur DGGE mit Gelgießstand und Gradientengießanlage in Überblick (A) und Detail (B) sowie Elektrophoreseeinrichtung des D GENE SYSTEMS (C). An der Gradientenmischanlage (A①) wurde aus den zwei Gel-Lösungen mit den Grenzkonzentrationen an Harnstoff und Formamid ein Gradient erstellt, welcher über einen Zulauf (A②) in den Gelgießstand (A③) überführt wurde. Dazu wurde ein Gradientenmischer-Eigenbau verwendet. Dieser bestand aus je einem Glaszylinder für die Lösung mit geringer (B①) und hoher Konzentration an denaturierenden Agenzien (B②). Durch Lösen der Klemmschelle (B③) und Aktivieren der Rührplatte (B④) wurde der Mischvorgang gestartet und die Gradientenlösung mittels des Zulaufs (B⑤) abgeführt. Das ausgehärtete Gel wurde in den Puffertank (C①) der Elektrophoreseeinheit (C②) überführt. Nach Anschluss des Spannungsgebers (C③) konnte die Auftrennung starten.

Abbildung 36 bietet einen zusammenfassenden, schematischen Überblick über den experimentellen Ablauf einer DGGE-Analyse.

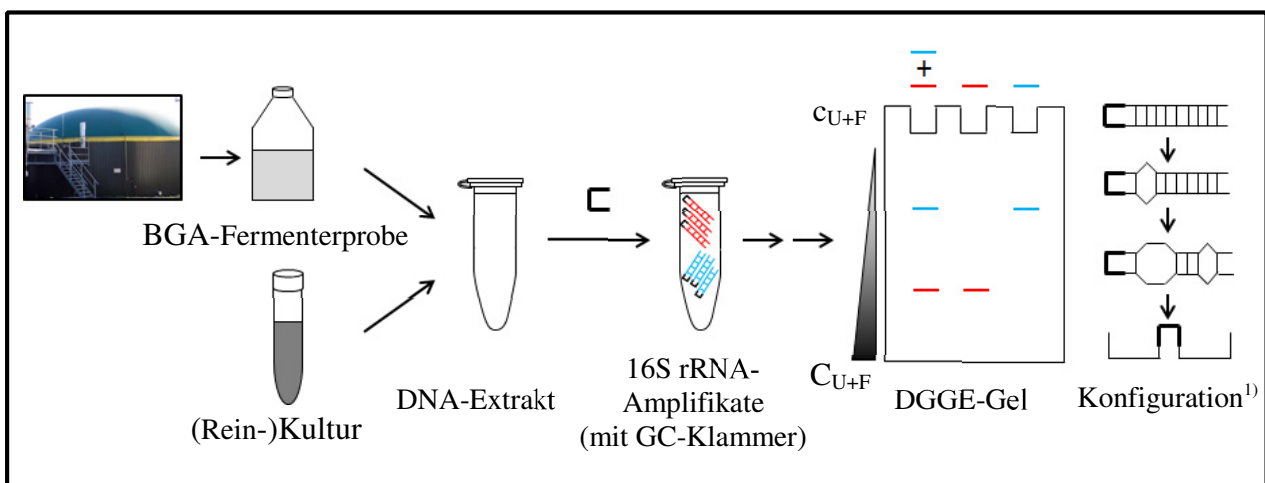


Abb. 36: Schematischer Arbeitsablauf zur Durchführung einer DGGE-Analyse. Nach Beprobung der zu untersuchenden BGA oder ausgehend von einer Kultur erfolgt die DNA-Extraktion. Diese dient als Basis für die 16S rRNA-Genamplifikation mit GC-Klammer-Primern. Nach Aufreinigung erfolgt die Separation im Gradientengel per DGGE. Angegeben ist ein beispielhaftes Gel für eine zwei Spezies enthaltende Probe (im Gel linke Spur) sowie für die jeweils einzelnen Spezies (mittlere und rechte Spur).  $C_{U+F}$  = geringe Konzentration an Urea und Formamid,  $C_{U+F}$  = hohe Konzentration an Urea und Formamid, <sup>1</sup>Konfiguration verdeutlicht die sukzessive Denaturierung der dsDNA mit zunehmender Migrationsweite im Gel.

Die Auswertung erfolgte nach Ethidiumbromid-Färbung für 30 min in einer Geldokumentationseinheit. Eine Identifikation der Spezies, welche durch eine gegebene DNA-Bande repräsentiert wurde, war durch Sequenzanalyse möglich. Dazu wurden im Anschluss an die DGGE-Auswertung DNA-Banden von Interesse mit einem Einwegskalpell aus dem Gel exzidiert und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde soweit mit sterilem, PCR-fähigem Wasser befüllt, bis der Gelstreifen knapp bedeckt war. Nach Über-Nacht-Inkubation bei 4 °C war der Elutionsvorgang abgeschlossen und sämtliche Flüssigkeit wurde in ein frisches, steriles Reaktionsgefäß überführt. Das so gewonnene DNA-Eluat wurde in einer erneuten PCR-Reaktion zur Reamplifikation der DNA eingesetzt. Dabei wurde das GC-Klammer-freie Primerpaar Ar1000f/Ar1500r unter ansonsten identischen Bedingungen (**Tab. 18**) verwendet, um eine Störung der Sequenzierungsreaktion durch die GC-Klammer zu unterbinden. Sequenzierungsarbeiten erfolgten durch die Firmen Eurofins-MWG-Operon, Ebersberg und LGC Genomics, Berlin. Zur Anwendung der DGGE für eine Untersuchung des Reinheitsgrades und phylogenetischen Verifizierung einer Kultur methanogener Archaea mussten im Idealfall folgende Kriterien von einer Reinkultur erfüllt werden:

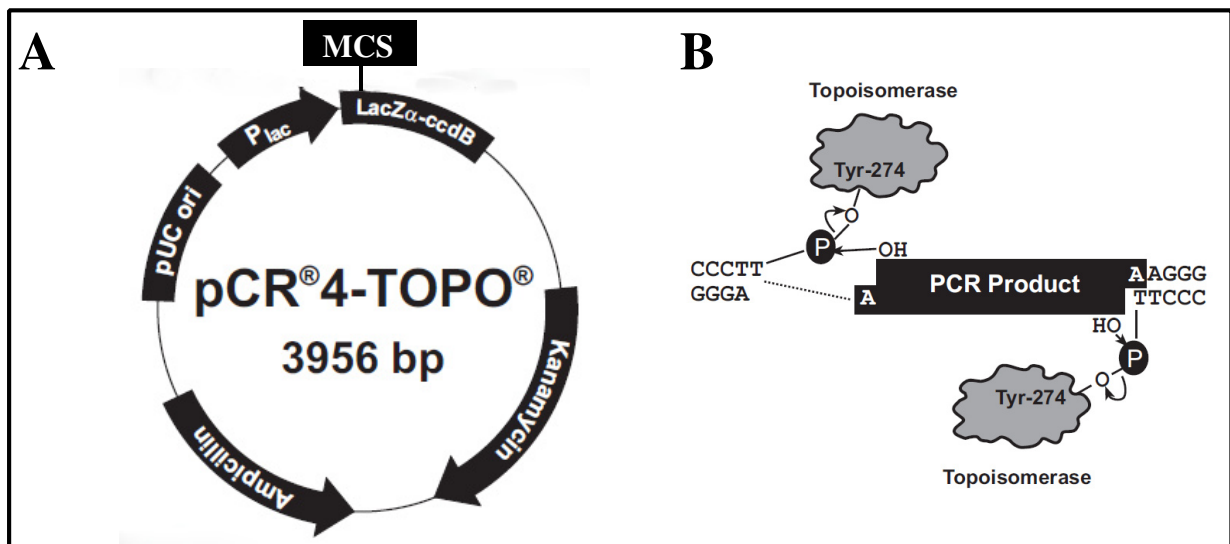
1. Die Detektion exakt einer Bande auf dem DGGE-Gel in Höhe des zugeordneten DSMZ-Typstammes.
2. Ein identisches Sequenzierergebnis des DGGE-Eluats zu dem per Met86f/Met1340r-Primerpaar amplifizierten 16S rRNA-Genfragment.
3. Eine Sequenzidentität von mindestens 97 % zur korrespondierenden Typstammsequenz in den *in silico*-Datenbanken GenBank (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und EzTaxon Server 2.1 (**Chun J. et al., 2007**, <http://eztaxon.org> oder **Kim O.S. et al., 2012**, <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>).

### II.2.5 ARDRA-Analyse methanogener BGA-Fermenterpopulationen und Kulturen

Ähnlich der DGGE handelt es sich bei der „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA) um eine PCR-basierte Fingerprint-Methode zur Analyse von Populationen schwer kultivierbarer (Mikro-)Organismen aus einem gegebenen Habitat. Sie ermöglicht einen Überblick über die dominanten Gattungen einer ökologischen Umweltprobe. Dabei stellt die ARDRA in Bezug auf die Durchführung einen Spezialfall der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus Methode (RFLP) dar: Wird die RFLP-Methodik auf ein Amplifikat eines für ribosomale RNA kodierenden Leserahmens, wie derjenige der 16S- oder 23S rRNA-Gene, angewandt, so spricht man von ARDRA. Grundlage des genetischen Fingerabdrucks bildet dabei die Sequenz des vorliegenden rRNA-Gens. Mit der Variation der Sequenz zweier



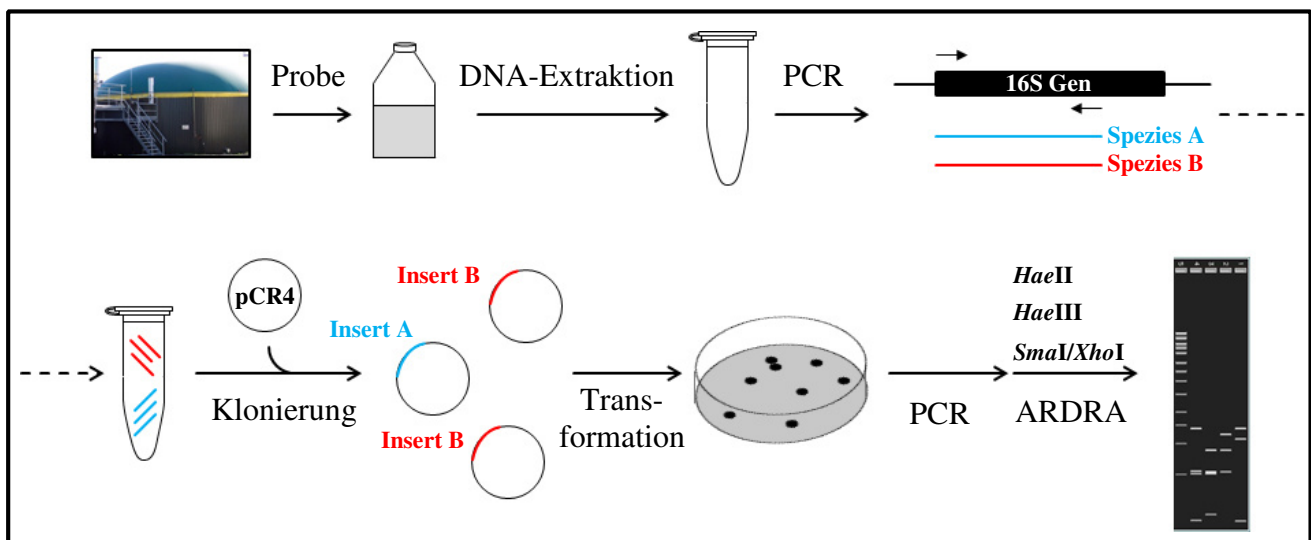
Spezies variieren auch Vorkommen, Position und die Anzahl von Erkennungssequenzen mikrobieller Restriktionsendonukleasen. Dies wird für die Unterscheidung der Organismen auf Gattungsniveau ausgenutzt. Nach Amplifikation des rRNA-Gens aus dem Gesamt-DNA-Extrakt der zu untersuchenden Probe erfolgt zunächst die Subklonierung in ein Vektorplasmid samt anschließender Transformation von *Escherichia coli*. Da beim Klonierungsvorgang statistisch nur ein Insert in die multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“, MCS) integriert wird, erfolgt so die Aufteilung der Fragmente auf verschiedene Vektormoleküle. Häufig wird aufgrund unbekannter Sequenzen der 16S Insertpopulation und zugunsten schnellerer Klonierungsreaktionen auf ligaseunabhängige Klonierungssysteme wie dem TA-Cloning System zurückgegriffen. Dieses System erlaubt eine ligasefreie Verknüpfung des Amplifikats mit dem Vektor pCR4<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> (Abb. 37A) und nutzt den Umstand, dass die *Taq*-Polymerase an amplifizierte Fragmente ein einzelnes desoxy-Adenin an das 3'-Ende



**Abb. 37: Das TOPO TA-Cloning System.** Vektor pCR4<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> mit Positionierung der MCS, der *lacZα-ccdB*-Fusion und der Ampicillin-/Kanamycin-Resistenzkassetten (A). Schematische Darstellung des Topoisomerase I-basierten Ligationsmechanismus (B). Tyr-274 bezeichnet den Tyrosinrest der Topoisomerase I, welcher mit dem Vektor eine Phosphotyrosyl-Bindung eingeht. Verändert nach Invitrogen, TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing User Manual. [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/topotaseq\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/topotaseq_man.pdf).

anfügt. In diesem Zusammenhang spaltet eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I diesen an der charakteristischen Erkennungssequenz 5'-CCCTT-3' und bildet eine Phosphotyrosyl-Bindung zwischen dem Thymin-Phosphat und einem Tyrosin-Rest der Topoisomerase I. Eine Ligation von Vektor und Insert wird dadurch erreicht, dass das 3'-OH des Amplifikats diese Phosphotyrosyl-Bindung angreifen kann und unter Ablösen der Topoisomerase I diesen Strang kovalent verknüpft. Der gegenläufige Strang kann dann durch das über die *Taq*-Polymerase angehängte desoxy-Adenin eine Standardbasenpaarung mit dem überhängenden Thymin eingehen (Abb. 37B).

Durch positive Selektionierung auf eine der im Vektor-Rückgrat vorhandenen Resistenzkassetten sowie durch Zerstörung des Leserasters der für *E. coli* tödlichen *lacZα-ccdB*-Fusion durch das inklonierte Insert können ausschließlich erfolgreiche Transformanden auf antibiotikahaltigen Nährböden überleben und Kolonien bilden. An diesem Punkt ergeben sich zwei Verfahrensmöglichkeiten zur Amplifikation des Inserts für die weitere Analyse. Das DNA-Template für die PCR kann über eine Plasmid-Extraktion aus kultivierten *E. coli*-Klonen gewonnen werden oder die Kolonie des *E. coli* Klons wird ohne vorherige Anzucht direkt dem PCR Ansatz zugegeben (sog. Kolonie-PCR). Der *in vitro*-Verdau zur Unterscheidung der klonierten Sequenzen erfolgt anhand der aufgereinigten rRNA-Genamplifikate mittels kommerziell erhältlicher Restriktionsendonukleasen. Im Fall einer Probe unbekannter Organismenzusammensetzung kommen dabei aufgrund erhöhter Schneidewahrscheinlichkeiten zumeist solche Enzyme mit Spezifitäten für tetramere Erkennungssequenzen zum Einsatz (z.B. *CfoI*, *Sau3AI* oder *HaeIII*). Bei konstanter Amplifikatlänge ergeben sich daraus in einer herkömmlichen Agarose-GE Gattungsspezifische DNA-Fragmentmuster (**Abb. 38**). Ist das zu separierende Organismenspektrum bekannt und eingrenzbar, kann über *in silico*-Analysen eine Enzymkombination ermittelt werden, welche die rRNA-Genamplifikate der beteiligten Mikroorganismen spezifisch schneidet, sodass aus dem Fragmentmuster eine direkte Identifizierung ermöglicht wird und abweichende Muster gezielt weiteren Analysen zugeführt werden können.



**Abb. 38: Arbeitsablauf zur Durchführung von ARDRA-Analysen (Schema).** Nach Gesamt-DNA-Extraktion einer BGA-Fermenterprobe erfolgte die Amplifikation des 16S rRNA-Gens. Die Fragmente wurden per TA-Cloning in den Vektor pCR4<sup>®</sup>TOPO<sup>®</sup> kloniert und *E. coli* transformiert. Nach Kolonie-PCR oder PCR nach Plasmidextraktion konnten die Inserts mit Restriktionsenzymen verdaut und die charakteristischen Fragmentmuster analysiert werden. Die Zuweisung zu einem Taxon erfolgte mittels Sequenzierung des unverdauten Fragments.

Die ARDRA-Analyse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Klärung der archaeellen Biodiversität in BGA-Fermenterproben sowie zur Verifizierung des Reinheitsgrads methanogener Isolate eingesetzt. Als Experiment im Vorfeld der Entwicklung spezies-spezifischer Isolierungsstrategien wurde zur Durchführung der ARDRA zunächst *in silico* eine Liste von 55 methanogenen 16S rDNA-Leserahmen aus 7 verschiedenen Gattungen (*Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum* und *Methanomethylovorans*) angefertigt. Unter Verwendung des Sequenz-betrachtungsprogramms CLC Sequence Viewer 5.8 wurden Restriktionsenzyme zur Differenzierung der Leserahmen auf Gattungsebene ausgewählt. Für die Unterscheidung der dominanten methanogenen Gattungen aus BGA-Fermenterproben unbekannter Zusammensetzung wurden zunächst die Enzyme *HaeII* und *HaeIII* zur Analyse jedes Klons der 16S rRNA-Gendatenbanken in getrennten Ansätzen ausgewählt. Nach Aktualisierung und Revision der Typstammliste wurde *HaeII* aufgrund der Erzeugung besser zu unterscheidender Fragmentmuster gegen einen Doppelverdau mittels *SmaI* und *XhoI* ersetzt. Amplifikate des 16S rRNA-Gens wurden wie oben angeführt (siehe **II.2.3**) erstellt und per Agarose-GE auf ihre Qualität geprüft.

Sollte mit der ARDRA-Methodik die Reinheit einer Kultur verifiziert und die Zuweisung zu einer Typstamm-repräsentierten Gattung vorgenommen werden, so wurde die Restriktion direkt im Anschluss vorgenommen und die Restriktionsmuster verglichen. Identische Restriktionsmuster von Typstamm und Isolat ohne weitere Banden wurden als Hinweis auf gleiche Gattungszugehörigkeit und Reinheit auf archaeeller Ebene angesehen. Sollte mit der Methode die Diversität archaeeller Mikroorganismen aus BGA-Fermenterproben untersucht werden, so waren die Amplifikate der verschiedenen Organismen vor der eigentlichen Restriktion durch einen Klonierungsschritt voneinander zu trennen. Dazu wurde die Klonierung der 16S rRNA-Genfragmente mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden stets frisch amplifizierte Fragmente eingesetzt. Mit dem Ligationsansatz wurden die mitgelieferten chemokompetenten *E. coli* TOP10-Zellen transformiert und auf Ampicillin-haltigem LB-Festmedien ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ausplattiert. Nach über Nacht-Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden 50-100 Klone mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in vorbereitete PCR-Ansätze überführt. Die nachfolgende Kolonie-PCR mit dem Met86f/Met1340r-Primerpaar wurde nach dem oben angeführten Protokoll durchgeführt mit der einzigen Ausnahme einer auf 15 min ausgedehnten initialen Denaturierungsphase. Eine erneute Prüfung der Amplifikatqualität mittels Agarose-GE stellte den Ausgangspunkt für das Restriktionsexperiment dar. Bei guter Qualität wurden die PCR-

Ansätze aufgereinigt und auf ein Elutionsvolumen von 30  $\mu\text{L}$  in Elutionspuffer aufkonzentriert. Im Falle minderer Qualität oder dem Auftreten von zusätzlichen DNA-Banden polymerer Amplifikatlänge wurde der PCR-Ansatz durch präparative Gelelektrophorese aufgereinigt. Dabei wurde der komplette Ansatz auf ein 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen und für 30 min bei 100 mV aufgetrennt. Anschließend wurde nach einer Inkubation in Ethidiumbromid-Färbelösung unter UV-Einstrahlung die benötigte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die folgende Elution der DNA aus dem Gel wurde mittels eines Gelextraktionskits nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA in 20  $\mu\text{L}$  PCR-Wasser aufgenommen. Sollte im späteren Restriktionsexperiment zu jedem Verdau eine parallele Spur unverdauter DNA aufgeführt werden, so wurden zwei PCR-Ansätze erstellt und während der Aufreinigungsprozedur vereinigt. Im Falle einer präparativen GE wurde das Elutionsvolumen dann auf 30  $\mu\text{L}$  angehoben. Für Einfach-Restriktionsansätze mit den Enzymen *HaeII* und *HaeIII* wurden 10  $\mu\text{L}$  aufgereinigter 16S rDNA-Genamplifikatlösung mit 1  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer NEB4 und 1 U Restriktionsenzym-Lösung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde in einem auf 37 °C temperierten Heizblock. Aufgrund unterschiedlicher Restriktionstemperaturen und -pufferbedingungen wurde der Doppelverdau mit der Enzymkombination *SmaI/XhoI* in einem sukzessiven, zweischrittigen Ablauf durchgeführt. So wurde zunächst eine Einfachrestriktion mit 1 U *SmaI* in Gegenwart von 1  $\mu\text{L}$  10x Tango Puffer™ für eine Stunde bei 30 °C durchgeführt. Der abschließende Verdau fand nach Zugabe von 1 U *XhoI* und weiteren 1,5  $\mu\text{L}$  10x Tango Puffer™ bei 37 °C für eine Stunde statt. Zur Analyse der Restriktionsfragment-Muster wurden der gesamte Ansatz mit 2  $\mu\text{L}$  6x DNA-Probenpuffer auf ein 2,5 % (w/v) Agarosegel mit 0,035 % Natronwasserglas geladen und elektrophoretisch für 3,5 h bei 60 V aufgetrennt. Nach Inkubation für 30 min in EtBr-Lösung wurden die Bandenmuster unter UV-Licht-Anregung digital dokumentiert und ausgewertet. Für die Zuordnung der Restriktionsfragmentmuster zu einer taxonomischen Einheit wurde die unverdaute 16S rRNA-Genamplifikatlösung als Template für eine erneute Amplifikation des Fragments eingesetzt. Dieses konnte nach entsprechender Aufreinigung und Sequenzierung über *in silico* Abgleiche mit phylogenetischen Datenbanken den entsprechenden Gattungen zugeordnet werden: Analog zur Sequenzierung von Fragmenten auf Basis von eluierten DGGE-Banden wurde eine Sequenzidentität von mindestens 97 % zur korrespondierenden Typstammsequenz in den *in silico*-Datenbanken GenBank (NCBI MEGABLAST) und EzTaxon Server 2.1/EzTaxon-e vorausgesetzt.

### II.2.6 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) stellt eine Methode zur direkten Untersuchung der prokaryotischen Population einer Umweltprobe dar. Im Bereich der mikrobiellen Ökologie werden für FISH-Analysen primär rRNA-Gene verschiedener Spezies aus einem Habitat genutzt, sie kann aber auch mit anderen interspeziesvariablen Leserahmen angewandt werden. Im Gegensatz zu Fingerprint-Methoden erfolgt eine Auswertung mittels einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Umweltprobe und ermöglicht die Beobachtung der räumlichen Verteilung und Abundanz von Mikroorganismen in ihrem Habitat. Die Methode basiert auf der Hybridisierung von fluorophormarkierten DNA-Sonden (siehe **II.2.6.2**) an komplementäre DNA-Sequenzbereiche in fixierten Zellen des Zielorganismus.

Um methanogene Archaea der Gattung *Methanobacterium* in BGA-Fermenterproben nachzuweisen, wurden innerhalb dieser Arbeit FISH-Sonden entworfen und Anwendungsprotokolle etabliert. Im Bereich methanogener Archaea besteht das übliche Hybridisierungsziel im Transkript des 16S rRNA-Gens. Die dafür erhältlichen Sonden weisen jedoch nur Spezifitäten auf Familien- oder Gattungsgruppen-Niveau auf, weshalb aufgrund größerer Sequenzlänge und -variabilität der 23S rRNA-Leserahmen auf Eignung als Zielmolekül für artspezifisches Sondendesign geprüft wurde. Dabei konzentrierten sich die Arbeiten zunächst auf Reinkulturen von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> als Zielspezies für die Sondenentwicklung.

#### II.2.6.1 Herleitung von Sondensequenzen

Als Datengrundlage für das Erfassen potentiell spezifischer Sequenzen als Hybridisierungsziel von FISH-Sonden wurden zunächst Fragmente von zwei 23S rRNA-Leserahmen von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> amplifiziert, sequenziert und zusammengesetzt (siehe **II.2.3.3**). Die Sequenz von Leserahmen A wurde für die Sondenkonstruktion herangezogen und mit veröffentlichten Sequenzen anderer Gattungen bzw. experimentell selbst ermittelter Sequenzen von *Methanobacterium* sp.-Referenzstämmen verglichen. Im Alignment wurde die Zielsequenz auf Nukleotidfolgen bis 26 nt Länge mit möglichst vielen exklusiven Basenpositionen untersucht. Folgenden Kriterien wurden zur Beurteilung der Eignung eines Oligonukleotids als FISH-Sonde herangezogen (nach **Röder, 2007**):

1. Eine Sequenzlänge zwischen 16 und 26 bp.
2. Ein GC-Gehalt von 40 - 70 mol-%.
3. Eine Schmelztemperatur von 55 - 65 °C.
4. Viele spezifische Sequenzunterschiede zu homologen Sequenzen nah verwandter Arten.
5. Keine oder möglichst kurze PolyGC- oder PolyA-Folgen.
6. Keine oder möglichst geringe Selbstkomplementarität

Die Synthese der finalen Oligonukleotid-Sonden erfolgte durch Fa. Eurofins-MWG-Operon, Ebersberg. Es wurden zunächst vier Sonden erstellt (**Tab. 29**). Eine erste Testsonde (Cy31535C2f) wurde am 5'-Ende mit dem Fluorophor Cy3, die restlichen drei Sonden (Cy3.51535E1, Cy3.51535E2 und Cy3.51535E3) mit dem Fluorophor Cy3.5 markiert (Spektralcharakteristika siehe **Tab. 17**). Als Kontroll-Sonde wurde die von Raskin (**Raskin et al., 1994**) entwickelte, 16S rRNA-Gen basierte Sonde MB1174 zum Einsatz. Sie weist eine Spezifität für die Gattungen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanosphaera* auf. Nach Zugriff auf die Gesamtgenom-Sequenz des Isolats *Methanobacterium* sp. Mb1 wurden anhand der darin vorhandenen Komplettssequenz des 23S rRNA-Gens zwei weitere Sonden (Cy3.5Mb1D1 und Cy3.5Mb1E2) *in silico* entworfen, welche dieses Eigenisolat zusätzlich als Zielorganismus markieren sollten. Dazu wurde die im Rahmen der Herleitung der vier o.g. Sonden gegen den Typstamm *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> aufgeklärte Teilsequenz des 23S rRNA-Gens den alignierten Sequenzen der Nichtzielspezies zugefügt und die einzigartigen Sequenzabfolgen unter Einhaltung der Parameter als Grundlage der Sonden abgeleitet. Die Markierung dieser Oligonukleotide erfolgte mit dem Fluorophor Cy3.5. Alle Sonden wurden in Hybridisierungs-Experimenten auf ihre *in situ*-Spezifität hin untersucht. **Tabelle 29** gibt einen Überblick über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Oligonukleotidsonden sowie der Positivkontrolle.

### II.2.6.2 Durchführung der Hybridisierungsexperimente

Verschiedene Protokolle zur Durchführung von FISH-Experimenten wurden mit den oben angegebenen Sonden im Rahmen von Vorversuchen durchgeführt (**Daims et al., 2005; Raskin et al, 1994; Tabatabaei et al., 2009** sowie ein institutsinternes Protokoll zur FISH-Detektion von *Pediococcus* sp.). Aufgrund vielfältiger Anwendungs- und Anpassungsmöglichkeiten wurden die FISH-Experimente dieser Arbeit vorrangig nach einem modifizierten Protokoll nach Daims et al. (2005) durchgeführt. Es kombiniert eine Formamid-Konzentrationsreihe mit der Anwendung von Denhardt's Reagenz (je 1% [w/v] Ficoll, PVP und Rinderserum-Albumin) zur Erhöhung der Hybridisierungsspezifität eingesetzter Sonden. Es ist sowohl auf Reinkulturen methanogener Archaea in frischem oder fixiertem Zustand als auch auf Testmischungen von Kulturen in steriler BGA-Reaktorflüssigkeit anwendbar. Zur Fixierung wurde ein Volumen von 500 µL einer Kultur methanogener Archaea mit 1,5 mL 3,7 % Formaldehyd vermischt und vor weiterer Verarbeitung 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 3,5 min bei 10000 x g wurde das Zellpellet zweimalig in 1x PBS-Puffer (8,00 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0,20 g L<sup>-1</sup> KCl, 2,68 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und final in einer Mischung aus 250 µL 1x PBS und 250 µL 96 % EtOH

aufgenommen. Die Lagerung bis zur Anwendung erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vor Beginn des Hybridisierungsversuchs wurden die Proben homogenisiert und  $100\text{ }\mu\text{L}$  in  $500\text{ }\mu\text{L}$   $1\times$  PBS aufgenommen und abzentrifugiert. Das weitere Vorgehen war im Folgenden identisch zur direkten Hybridisierung frischer methanogener Zellen aus Kulturansätzen. Dazu wurde ein Volumen von  $300\text{ }\mu\text{L}$  für  $3,5\text{ min}$  bei  $10.000\text{ g}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend zweimalig in  $500\text{ }\mu\text{L}$   $1\times$  PBS-Puffer resuspendiert und wie oben angegeben zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in  $900\text{ }\mu\text{L}$   $1\times$  PBS und  $100\text{ }\mu\text{L}$   $0,1\text{ }\%$  [w/v] Nonidet P-40 resuspendiert, für  $2\text{ min}$  bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und nach erneuter Zentrifugation in  $1\text{ mL}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Parallel zu diesen Vorbereitungen wurde in jede Probenvertiefung teflonbeschichteter Diagnostik-Objektträger  $10\text{ }\mu\text{L}$  einer Beschichtungslösung aus  $0,1\text{ }\%$  [w/v] Gelatine und  $0,01\text{ }\%$  CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> [w/v] in sterilem Wasser gegeben und der Objektträger bei  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindestens  $15\text{ min}$  im Hybridisierungssofen getrocknet. Anschließend wurde  $10\text{ }\mu\text{L}$  Probe in die Vertiefungen gegeben und der Objektträger wiederholt getrocknet. Zur Entwässerung der Zellen wurden die Objektträger je  $3\text{ min}$  aufsteigend sukzessive in  $50$ ,  $70$  und zweimalig in  $96\text{ }\%$  (v/v) Ethanol inkubiert. Nach erneutem Trocknen im Hybridisierungssofen war der Objektträger einsatzbereit. Da für die erstellten Sonden auf Basis des 23S rRNA-Gens die optimale Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer nicht bekannt war, musste zunächst ein breiter Konzentrationsbereich getestet werden. Dazu kamen in Bezug auf die Hybridisierungspuffer- und Waschlösungen die in den **Tab. 30** und **31** angegebenen Zusammensetzungen in  $5\text{ }\%$ -Formamidkonzentrations-Staffelungen zum Einsatz. Nach einer kurzen Lufttrocknungsphase wurden die Proben mit  $10\text{ }\mu\text{L}$  Hybridisierungspuffer in den Probenkammern des Objektträgers überschichtet. Ein  $\mu\text{L}$  einer  $100\text{ pM}$  Sondenlösung wurde mit dem aufgetragenen Hybridisierungspuffer in jeder Vertiefung vorsichtig vermengt und der Objektträger zur Hybridisierung in  $50\text{ mL}$ -Probenröhrchen samt waschpuffergetränktem Filterpapier überführt. Nach Hybridisierung für mindestens  $2\text{ h}$  bei  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Objektträger zunächst zweimal für je  $22\text{ min}$  in Waschpuffer bei  $48\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, nachfolgend  $3\text{ Sekunden}$  in eisgekühltes, steriles ddH<sub>2</sub>O eingetaucht und getrocknet. Eine abschließende DAPI-Gegenfärbung (die Objektträger wurden mit  $50\text{ }\mu\text{L}$  einer  $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  DAPI-Lösung beträufelt und für  $30\text{ min}$  im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert) wurde zwecks Gesamtzellzahlfärbung durchgeführt und mittels Zugabe von  $2\text{ Tropfen}$  Roti<sup>®</sup>-Mount FluorCare pro Objektträger gegen Ausbleichung abgesichert. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch am Keyence BioZero 8000-Mikroskop.

**Tab. 29: Molekulare Eigenschaften der in Hybridisierungsexperimenten eingesetzten FISH-Sonden.**

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge	T <sub>M</sub> [°C]	GC [mol-%] <sup>1)</sup>	Sequenzunterschiede <sup>2)</sup>	Referenz
MB1174 <sup>3)</sup>	TAC CGT CGT CCA CTC CTT CCT C	22-mer	59,0	59,0	Keine Angabe	Raskin <i>et al.</i> , 1994
Cy31535C2f	TAG CCC AAG GTT AGG GGA	18-mer	56,0	56,0	5 (1) <sup>4)</sup> nt	Diese Arbeit
Cy3.51535E1	CTC AAG ATC CTT GAT CAA ATC C	22-mer	56,5	41,0	5 nt	Diese Arbeit
Cy3.51535E2	GAT CCT TGA TCA AAT CCT TAT CAA	24-mer	55,9	33,0	5 nt	Diese Arbeit
Cy3.51535E3	TCC ACA TAA GGG AGC ATC C	19-mer	57,5	53,0	5 nt	Diese Arbeit
Cy3.5Mb1D1	CAA GTA CCC AAT CAA GAT CCA CTC	24-mer	61,0	45,8	3 nt <sup>5)</sup>	Diese Arbeit
Cy3.5Mb1E2	CAC TGA ACC TGG CGA CCT AG	20-mer	61,4	60,0	0 nt <sup>5)</sup>	Diese Arbeit

<sup>1)</sup>Berechnet nach OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>)

<sup>2)</sup>Anzahl exklusiv in der Zielsequenz vorkommender Nukleotide im Vergleich mit den alignierten Sequenzen

<sup>3)</sup>Positivkontrolle basierend auf dem 16S rRNA-Gen

<sup>4)</sup>Fünf nt Unterschied ohne Einbezug von methanobakterieller Gesamtgenominformationen, 1 nt Differenz im Alignment mit *Methanobacterium* sp. SWAN-1 und *Methanobacterium* sp. AL-21

<sup>5)</sup>Zielorganismus ist zusätzlich das *Mb. formicicum*-verwandte Eigenisolat Mb1. Die geringe Anzahl einzigartiger Nukleotide resultiert aus zusätzlichem Einbezug der Sequenz des Typstammes *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> in das Alignment der zu differenzierenden Sequenzspezies. Spezifität der Sonde ergibt sich aus der im Vergleich zu den alignierten Arten einzigartigen Sequenzabfolge. Eine detaillierte Übersicht über die Sequenzunterschiede bietet Kapitel **III.5.7.1**.



**Tab. 30: Zusammensetzung der Hybridisierungspuffer nach aufsteigendem Formamid-Anteil. Volumenangaben in [ $\mu$ L].**

Reagenz	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %
5 M NaCl	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
1 M Tris/HCl pH 7,4	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Denhardt's Reagenz (50x) <sup>1)</sup>	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
ddH <sub>2</sub> O	599	549	499	449	399	349	299	249	199	149	99
Formamid	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
10 % [w/v] SDS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

<sup>1)</sup>Je 1 % (w/v) Ficoll, PVP, BSA in ddH<sub>2</sub>O, steril filtriert.

**Tab. 31: Zusammensetzung zu den Hybridisierungspuffern komplementären Waschpufferlösungen. Volumenangaben in [mL].**

Reagenz	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %
5 M NaCl	9,00	6,30	4,50	3,18	2,15	1,49	1,02	0,70	0,46	0,30	0,18
1 M Tris/HCl pH 7,4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,5 M NaEDTA	0	0	0	0	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
ddH <sub>2</sub> O	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50	add 50

### II.2.7 Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR)

Bei der SAPD-PCR handelt es sich um ein am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung entwickeltes Fingerprint-Verfahren zur Differenzierung und phylogenetischen Einordnung beliebiger (Mikro-)Organismen (**Fröhlich und Pfannebecker, 2006; Pfannebecker und Fröhlich, 2008**). Sie basiert auf der unterschiedlichen, relativen Distribution der oktameren Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *NotI* (5'-GCGGCCGC-3') auf den Chromosomen der zu untersuchenden Organismen. Im Vergleich zur herkömmlichen PCR werden keine Primerpaare, sondern ausschließlich Primer eingesetzt, deren Sequenz aus der *NotI*-Erkennungssequenz besteht, welcher eines der vier möglichen Nukleotide an das 5'-Ende angefügt wurden (z.B. A-Not oder C-Not). Das Amplifikationsmuster bildet einen molekularen Fingerabdruck der chromosomalen Sequenz. Eine als verschachtelte oder „nested“-PCR entwickelte Variante (nSAPD) umfasst zwei Amplifikationsdurchläufe, bei der im zweiten Durchlauf das Amplifikat des ersten Durchlaufs als Template und Primer eingesetzt werden, welche an ihrem 3'-Ende wiederum um jeweils eines der vier möglichen Nukleotide erweitert wurden (z.B. A-Not-A oder A-Not-G). Dabei werden im zweiten Durchlauf stets alle vier möglichen Primer gleichzeitig der Reaktion zugesetzt. Auf diese Weise ist eine Differenzierung auf Stamm-Ebene möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die SAPD-PCR sowohl zur Differenzierung von Eigenisolaten der Gattung *Methanobacterium*, als auch zur Entwicklung artspezifischer Primer zum Direktnachweis eingesetzt. Aufgrund einer Fokussierung der Arbeit auf das Art-Niveau wurde im vorliegenden Anwendungsfall nur die erste Amplifikationsrunde ausgeführt, während auf eine zweite, nSAPD-Amplifikationsrunde verzichtet wurde. Die Zusammensetzung des SAPD-PCR-Ansatzes und der Programmablauf sind in den **Tabellen 32** und **32** wiedergegeben. Die Auswertung erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung von 7 µL des Ansatzes bei 50 V für 3 h in einem 1,5 % (w/v) Agarose-Gel. Für jede Bande eines SAPD-Musters wurde die Länge mittels der Software Bio1D bestimmt. Zur Entwicklung von Primerpaaren zum spezifischen Nachweis einer Gruppe oder Art wurden einzigartige Banden eines Musters aus dem 1,5 % [w/v] Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (**II.2.5**) in *E. coli* TOP10-Zellen kloniert. Nach herkömmlicher Amplifikation des Plasmid-Inserts mittels Kolonie-PCR (**Tab. 34**; Programm M13COLON, **Tab. 35**) wurde dieses sequenziert. Anhand der Sequenzinformation wurden Primerpaare zur direkten Amplifikation des entsprechenden Fragmentes entworfen und deren Spezifität mittels PCR aus Fermenter- und Kultur-DNA-Extrakten verifiziert.

**Tab. 32: Reaktionsansatz zur SAPD-PCR.**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Reinstwasser (steril)	13,3
High Yield Buffer <sup>1)</sup>	2,5
DNA-Extrakt	5
Primer, N-Not (c = 50 $\mu\text{M}$ )	1
MgCl <sub>2</sub> (20 mM)	2 <sup>2)</sup>
dNTP-Mix (c = 10 mM pro dNTP) <sup>1)</sup>	1
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (c = 5 U $\mu\text{L}^{-1}$ ) <sup>1)</sup>	0,2

<sup>1)</sup>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

<sup>2)</sup>Die MgCl<sub>2</sub>-Gesamtkonzentration bezogen auf einen 25  $\mu\text{L}$ -Ansatz betrug 4 mM

**Tab. 33: SAPD-PCR-Temperaturprogramm.**

Phase	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	94	60	1
Hybridisierung	35	60	1
Rampe (+0,5 $^{\circ}\text{C}$ /Zyklus)	35 - 42,5	12	15
Hybridisierung II	42,5	60	1
Rampe II (+1,5 $^{\circ}\text{C}$ /Zyklus)	42 - 70,5	12	19
Elongation	72	300	1
finale Elongation	72	600	1

<sup>1)</sup>35faches Durchlaufen der Schritte von der Denaturierung über die Hybridisierungsphasen und Rampen bis hin zur Elongation

**Tab. 35: Reaktionsansatz zur Kolonie-PCR-Amplifikation von Inserts aus dem Vektor pCR<sup>®</sup>4 TOPO<sup>®</sup> mittel des M13-Primerpaares.** Als DNA-Template wurde eine Kolonie von Platte gepickt und dem Ansatz zugegeben. Temperaturprogramm

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Reinstwasser (steril)	38,8
High Yield Buffer <sup>1)</sup>	5,0
Primer, M13f (c = 10 pM)	1
Primer, M13r (c = 10 pM)	1
MgCl <sub>2</sub> (20 mM)	2 <sup>2)</sup>
dNTP-Mix (c = 10 mM pro dNTP) <sup>1)</sup>	1
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (c = 5 U $\mu\text{L}^{-1}$ ) <sup>1)</sup>	0,2

<sup>1)</sup>PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

<sup>2)</sup>Die MgCl<sub>2</sub>-Gesamtkonzentration bezogen auf einen 50  $\mu\text{L}$ -Ansatz betrug 2 mM

**Tab. 36: Temperaturprogramm M13COLON zur Insert-Amplifikation aus pCR<sup>®</sup>4 TOPO<sup>®</sup>-haltigen Zellsuspensionen per Kolonie-PCR.**

Phase	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	900	1
Denaturierung I	94	60	
Hybridisierung I	58	60	34
Elongation I	72	100	
finale Elongation	72	600	1

### II.2.8 SAPD-abgeleitete Direkt-PCR zur Detektion von Eigenisolaten der Gattung *Methanobacterium* sp. in DNA-Extrakten aus Kulturen und BGA-Fermenterproben

Parallel zur Detektion von Mikroorganismen der Gattung *Methanobacterium* sp. mittels der FISH-Technik (siehe II.2.6) wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ein Nachweissystem auf Basis einer Direkt-PCR erstellt. Dieses ermöglicht den schnellen Nachweis der entsprechenden Eigenisolate in DNA-Extrakten von Kulturen und BGA-Probenmaterial durch partielle Amplifikation eines Fragmentes der A-Not-SAPD-Muster (03Mbf, siehe III.5.4) der Zielspezies. Die hergeleiteten Primersequenzen, deren Eigenschaften (Tab. 36) und die eingesetzten PCR-Programme (Tab. 37, 38) seien vorbereitend auf die genauere Erläuterung im Ergebnisteil bereits hier aufgeführt. Der Reaktionsansatz war bis auf die an den Ausgangsextrakt angepassten Template-DNA-Volumina identisch zu demjenigen zur 16S rRNA-Gen-Amplifikation (Tab. 18).

**Tab. 36: Oligonukleotid zur partiellen Amplifikationen des 03Mbf-Fragments von *Methanobacterium* sp.-Eigenisolaten und des Typstammes *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>.**

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge	T <sub>M</sub> [°C]	Größe <sub>Amplifikat</sub> [bp]
03CMbf	CCG CAT AAT TCA GGT GGA	18-mer	53,8	324
03AMbr	CGC ACT CAG TTT GAG AGA	18-mer	53,8	
03DMbr	ATC CCC ACC ATC ACC AT	17-mer	52,4	291 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Amplifikatgröße bezieht sich auf eine PCR in Paarung mit dem „forward“-Primer 03CMbf

**Tab. 37: Temperaturprogramm TESTMBFR zur partiellen Amplifikation des A-Not-Fragments 03Mbf aus Kulturproben-DNA.** Templatevolumen 3 µL auf 50 µL Ansatz.

Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung I	95	60	
Hybridisierung I	55	60	30
Elongation I	72	60	
finale Elongation	72	300	1

**Tab. 38: Temperaturprogramm TESTMBFR zur partiellen Amplifikation des A-Not-Fragments 03Mbf aus Fermenterproben-DNA.** Templatevolumen 6 µL auf 50 µL Ansatz.

Phase	T [°C]	Dauer t [s]	Zyklen
initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung I	94	60	
Hybridisierung I	56	60	30
Elongation I	72	20 <sup>1)</sup>	
finale Elongation	72	150	1

<sup>1)</sup>Aufgrund der Verkürzung der Elongationszeit war eine partielle Amplifikation des 16S rRNA-Gens mittels des Met86f/Met1340r-Primerpaarung nicht zeitgleich möglich.

## Kapitel III - Ergebnisse

### III.1 DNA-Extraktion aus BGA-Fermentersubstrat und Flüssigkulturen

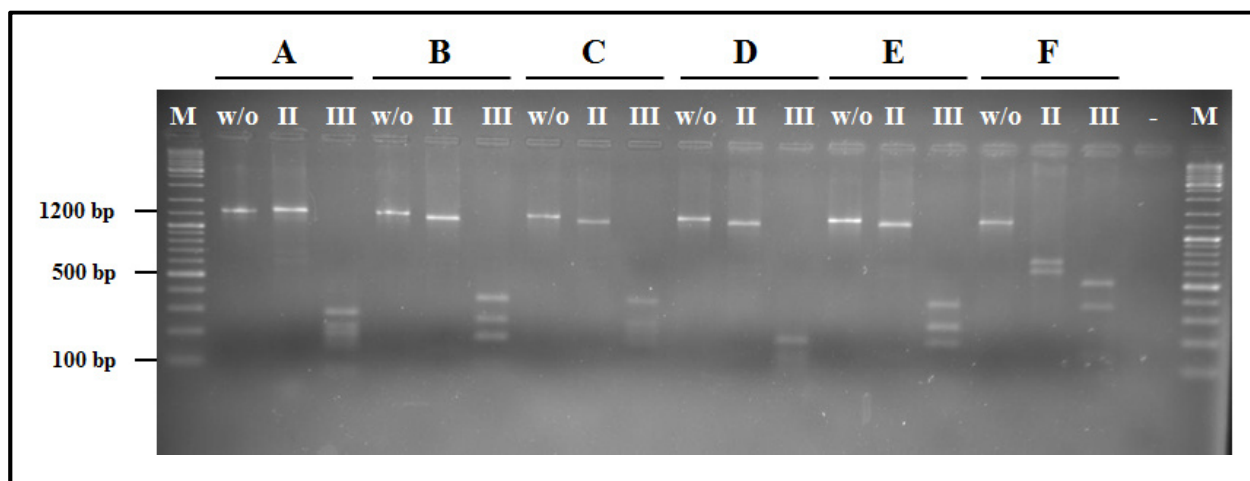
Als Grundlage für den kultivierungsunabhängigen Ansatz zur Erfassung der Biodiversität methanogener Archaea in NawaRo-BGA musste ein zuverlässiges und mit downstream-Anwendungen wie der PCR kompatibles Protokoll zur DNA-Extraktion aus Fermentersubstrat vorliegen. Dementsprechend stellte die DNA-Extraktion und -Aufreinigung den limitierenden Schritt für alle molekularbiologischen Untersuchungen dar. Die Verwendung der unter II.2.1 und II.2.2 aufgeführten DNA-Extraktionsprotokolle bzw. Reaktionskits für die Routineextraktion genomischer DNA ist Ergebnis einer Testreihe verschiedener klassischer DNA-Fällungsprotokolle und Reaktionskits unterschiedlicher Hersteller und Anwendungsgebiete. Die Etablierung des unter II.2.1 angegebenen Protokolls zur klassischen DNA-Fällung erfolgte auf Grundlage von Vorschriften von **Klocke *et al.*, (2007)**, **Nettmann *et al.*, (2008)**, und **Zhou *et al.*, (1996)**. Es erlaubte die Gewinnung von DNA-Extrakten auch aus kleinen Volumina der komplexen, viskosen und an Polymeraseinhibitoren reichen Matrix. Es stellte sich jedoch als recht zeitintensiv heraus. Weiterhin war der auf diese Weise gewonnene DNA-Extrakt aufgrund eines unzureichenden Reinheitsgrades oder zu geringer DNA-Konzentration nicht immer als Template für eine Amplifikation des 16S rRNA-Gens geeignet. Daher wurde zur Verarbeitung großer Probenmengen nach einer Kit-Lösung für diesen Anwendungsbereich gesucht. Insbesondere mit Reaktionskits zur DNA-Extraktion aus Boden- und Stuhlproben gelang eine schnelle und zuverlässige Aufreinigung der DNA aus der vorliegenden Matrix. Zur Beurteilung der Produkte verschiedener Hersteller wurden Zeitaufwand, das für eine erfolgreiche Standard-Amplifikation des 1254 bp-Fragmentes des 16S rRNA-Gens nötige Minimalvolumen und die Bandenstärke per Agarose-GE beurteilt (**II.2.3.1, Abb. 30**). Da das oben beschriebene GeneMATRIX Stool Purification Reaktionskit (EURx Ltd., Gdansk, Polen) in Bezug auf die Kriterien mit einem Minimal-Einsatzvolumen von durchschnittlich 0,5 µL des resultierenden Extraktes für die Standard-PCR am besten abschnitt und zudem auch auf Flüssigkulturen von archaeellen Mikroorganismen anzuwenden war, wurde diese Lösung neben dem Protokoll zur DNA-Fällung (mindestens 5 µL des Extraktes benötigt) beibehalten.

### III.2 Biodiversität methanogener Archaea in ausgewählten NawaRo-Praxis-BGA

Im Hinblick auf die Entwicklung gattungsspezifischer Strategien zur Isolierung von methanogenen Archaea aus BGA-Fermentersubstrat sollte die Populations-Zusammensetzung der darin etablierten Biozönose bekannt sein. Daher wurden im Vorfeld der Isolierungsarbeiten kultivierungsunabhängige Diversitätsanalysen anhand von Fingerprint-Methoden durchgeführt. Dafür wurden mit der BGA Arenrath und BGA Wallhalben zwei der fünf beprobten BGA zufällig ausgewählt und Klonbibliotheken auf Basis eines archaeellen 16S rRNA-Genfragments erstellt. Durch ARDRA-Restriktionsmusteranalyse wurden die erhaltenen Klone Gruppen zugeordnet. Ein Klon jeder Mustergruppe wurde über die Sequenzierung des Inserts in Kombination mit *in silico*-Datenbankanalysen repräsentativ identifiziert. Zur Überprüfung der Ergebnisse und für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse erfolgte abschließend die Durchführung einer Stammbaumanalyse mithilfe einer Liste von 16S rRNA-Gensequenzen von Typstämmen methanogener Archaea.

#### III.2.1 ARDRA von Fermentersubstrat der BGA Arenrath

Für die Untersuchung der BGA Arenrath wurde eine Klonbibliothek aus einer Gesamtzahl von 37 Klonen erstellt. Aus diesen gingen fünf unterschiedliche Mustergruppen hervor (**Abb. 39**).



**Abb. 39: Restriktionsmustergruppen der ARDRA-Analyse von BGA Arenrath.** Musterrepräsentative Klone wurden bezüglich ihres 16S rRNA Genfragment-Inserts sequenziert und anschließend mit Hilfe von *in silico*-Datenbanken taxonomisch eingeordnet (**Tab. 39**). M = GeneRuler™ DNA-Größenmarker, w/o = ungeschnittenes Fragment, II = Restriktion mit *HaeII*, III = Restriktion mit *HaeIII*, - = Negativkontrolle. Muster B und E identisch, da hier Klone derselben Mustergruppe als Test auf Reproduzierbarkeit restringiert wurden.

Nach Sequenzierung je eines repräsentativen Klons wurden die Ergebnisse mit Einträgen in den GenBank und EzTaxon Server 2.1-Datenbanken abgeglichen. Dadurch konnten Vertreter der drei Gattungen *Methanosaeta*, *Methanobacterium* und *Methanoculleus* in der Klonbibliothek nachgewiesen werden (**Tab. 39**).

Mit 43,2 % aller ausgewerteten Klone wurde *Methanoculleus* sp. (*Mcu.*) als dominante Gattung methanogener Archaea detektiert (**Abb. 39**, Muster „F“). Auf Art-Ebene wurde der repräsentative Klon nach Sequenzanalyse als das hydrogenotrophe Archaeon *Mcu. bourgensis* identifiziert. Insbesondere die Restriktion mittels der Endonuklease *HaeII* ermöglichte eine schnelle und charakteristische Unterscheidung der Klone der Gattung *Methanoculleus* von den restlichen Restriktionsmustern der Klonbibliothek-Analyse. Für die hydrogenotrophe Gattung *Methanobacterium* (*Mb.*) ergaben sich zwei leicht unterschiedliche Restriktionsmuster. Dabei wies das *HaeIII*-Restriktionsmuster des 16S rRNA-Genfragments des Klons, welcher laut Sequenzanalyse *Mb. petrolearium* zuzuordnen war (**Abb. 39**, Muster „C“), im Vergleich zum *HaeIII*-Restriktionsmuster von *Mb. beijingense* (**Abb. 39**, Muster „B“/„E“) eine zusätzliche Bande auf Höhe von etwa 200 bp auf. In beiden Datenbanken ergab sich für den zur Mustergruppe C zugehörigen Klon zusätzlich zur Sequenzübereinstimmung mit *Mb. petrolearium* auch eine signifikante Übereinstimmung mit der Sequenz von *Mb. kanagiense*. Mit 18,9 % („B“) bzw. 16,2 % („C“) umfassten beide Mustergruppen einen ähnlichen Anteil der Klonbibliothek. Mit 13,5 % aller Klone war das acetoklastische Archaeon *Methanosaeta concilii* (*Mst. concilii*) in einem geringeren Maße als die Repräsentanten der hydrogenotrophen Gattungen vertreten. Charakteristisch für das *HaeIII*-Restriktionsmuster des *Mst. concilii*-Inserts (**Abb. 39**, Muster „D“) war eine enge Staffelung kleiner Restriktionsfragmente unterhalb einer Größe von 200 bp, während alle übrigen Muster auch Banden oberhalb dieses Größenmarkers aufwiesen. Eine Stammbaumanalyse zur Berechnung der evolutionären Verwandtschaft der Klonsequenzen mit den 16 rRNA-Gensequenzen der Typstammliste methanogener Archaea bestätigte weitgehend die durch Sequenzabgleiche mit den o.g. Datenbanken erhaltenen, taxonomischen Zugehörigkeiten (**Abb. 40**). Der zu zwei verschiedenen *Methanobacterium*-Arten zugeordnete Klon C wird darin mit *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup> gruppiert. *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> wurde in dem zu dieser Gruppierung nächstgelegenen Ast positioniert.

**Tab. 39: Direkte Identifikation methanogener Archaea aus Fermenterflüssigkeit der BGA Arenrath mittels ARDRA.** Ergebnisse der Sequenzanalyse nach *in silico*-Abgleich mit den Datenbanken GenBank und EzTaxon Server 2.1.

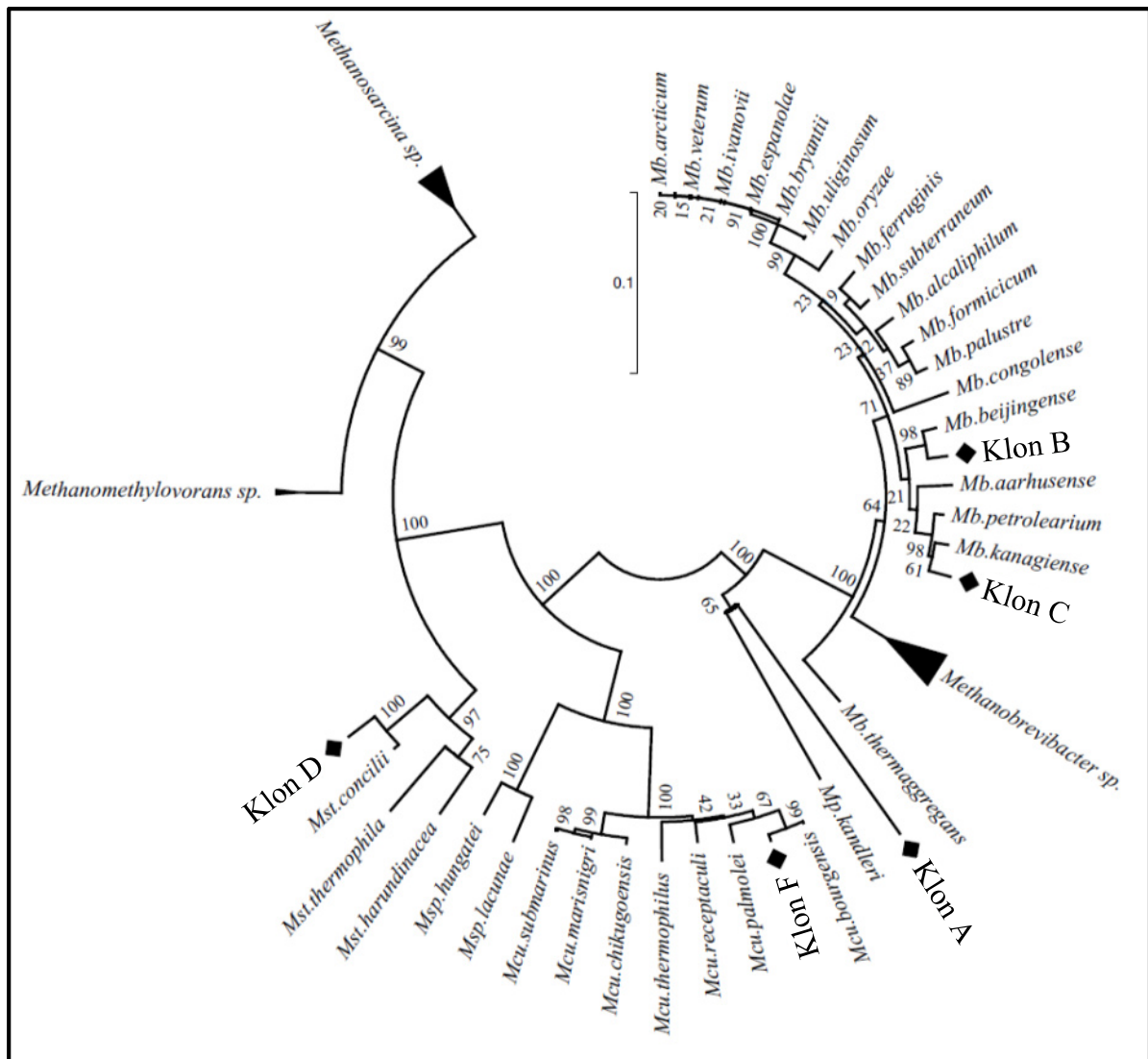
GenBank Nucleotide collection			EzTaxon Server 2.1			
Muster	Nächster verwandter (Typ-)Stamm <sup>1</sup>	[%] <sup>2</sup>	Nächster verwandter (Typ-)Stamm <sup>1</sup>	[%] <sup>2</sup>	Fragmentlänge [bp]	Anzahl Klone/ Umfang Klonbibliothek [%]
A	NMA <sup>3</sup>	NMA <sup>3</sup>	NMA <sup>3</sup>	NMA <sup>3</sup>	939	3/37 [8,1]
B	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2 <sup>T</sup>	98	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2 <sup>T</sup>	98,0	906	7/37 [18,9]
C	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	98	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	98,0	920	6/37 [16,2]
	<i>Methanobacterium kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	98	<i>Methanobacterium kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	97,6		
D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6 <sup>T</sup>	98	<i>Methanosaeta concilii</i> DSM 3013	97,6	904	5/37 [13,5]
F	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	99	<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSM6216	99,7	905	16/37 [43,2]
	<i>Methanoculleus palmolei</i> DSM4273	98				

<sup>1</sup>nach Analyse der 16S rRNA-Genfragmentsequenz

<sup>2</sup>prozentuale Sequenzidentität des analysierten 16S rRNA-Genfragments mit dem des angegebenen Stamms

<sup>3</sup>nichtmethanogenes Archaeon: Sequenzanalyse ergab keine Spezies methanogener Archaea und verblieb insignifikant (< 83 % Übereinstimmung mit *Stetteria hydrogenophila* 4ABC<sup>T</sup>)





**Abb. 40: Phylogenetische Einordnung der Klonsequenzen aus der ARDRA-Analyse der BGA Arenrath.** Positionen der Klongruppenvertreter wurden mit  $\blacklozenge$  markiert. Stammbaum erstellt durch die Neighbor-Joining-Methode nach Saitou und Nei, 1987. Die prozentualen Ergebnisse der Bootstrap-Analyse aus 1000 Wiederholungen (Felsenstein, 1985) sind über den Ästen angegeben. Evolutionäre Distanzen wurden unter Verwendung der Maximum Composite Likelihood-Methode (Tamura *et al.*, 2004) mit der Software MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Alle Positionen, in denen weniger als 50% aller 61 16S rRNA-Gensequenzen der Typstämme methanogener Archaea ein Nukleotid enthielten, wurden zuvor aus dem zugrunde liegenden Alignment entfernt.

Zur Vorbereitung auf folgende ARDRA-Analysen wurden die Längen der einzelnen Nukleinsäure-Fragmente eines Restriktionsmusters *in silico* berechnet (Tab. 40) und mit den Migrationsweiten im Gel abgeglichen. Einbezogen wurden diejenigen Typstämme, denen die Klone aus der Klonbibliothek zugeordnet wurden, sowie ferner Sequenzen der Typstämme *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, *Methanosarcina (Msc.) mazei* S-6<sup>T</sup> und *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>. Mit geringen Abweichungen stimmten die Voraussagen mit den sichtbaren und unterscheidbaren Längen der Fragmentbanden überein. Der Sachverhalt einer im Vergleich zu Muster „B“ bzw.

„E“ zusätzlichen Bande in Muster „C“ trat *in silico* ebenso wie in der ARDRA-Analyse auf. Die berechnete Länge von 202 bzw. 203 bp befand sich in Übereinstimmung mit der im Gellauf beobachteten Migrationsweite des Restriktionsfragments. Ein Fragment mit einer Länge von 346 bp, wie es für *Mst. concilii* errechnet wurde, konnte in Muster „D“ nicht gefunden werden. Die Staffelung von Fragmenten unterhalb einer Größe von 200 bp trat jedoch auch in der Praxis auf.

**Tab. 40: Resultierende Fragmentlängen des 1254 bp-Amplifikats des 16S rRNA Gens verschiedener Typstämme methanogener Archaea nach Restriktion mit den Endonukleasen *HaeII* und *HaeIII*.** Die zusätzliche Fragmentbande von *Mb. petrolearium* bzw. *Mb. kanagiense* (Muster C) im Vergleich zu *Mb. beijingense* (Muster B/E) ist mit Fettschrift markiert. Berechnung mittels CLC Sequence Viewer 6.7.1.

Mikroorganismus	Enzym	Fragmentlängen [bp]
<i>Mb. beijingense</i> 8-2 <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	1140, 114
	<i>HaeIII</i>	346, 222, 173, 171, 159, 73, 44, 20, 14
<i>Mb. petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	1139, 115
	<i>HaeIII</i>	345, 233, <b>203</b> , 173, 152, 90, 44, 14
<i>Mb. kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	1139, 115
	<i>HaeIII</i>	346, 233, <b>202</b> , 173, 152, 90, 44, 14
<i>Mb. formicicum</i> MF <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	--- <sup>1)</sup>
	<i>HaeIII</i>	247, 244, 233, 173, 101, 91, 90, 14
<i>Mst. concilii</i> GP-6 <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	1140, 114
	<i>HaeIII</i>	346, 179, 120, 114, 113, 100, 87, 70, 68, 44, 18
<i>Mcu. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	672, 582
	<i>HaeIII</i>	556, 350, 132, 116, 73, 27
<i>Msc. barkeri</i> MS <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	--- <sup>1)</sup>
	<i>HaeIII</i>	358, 205, 157, 138, 135, 120, 113, 100, 41
<i>Msc. mazei</i> S-6 <sup>T</sup>	<i>HaeII</i>	--- <sup>1)</sup>
	<i>HaeIII</i>	358, 205, 138, 135, 120, 113, 100, 44, 41

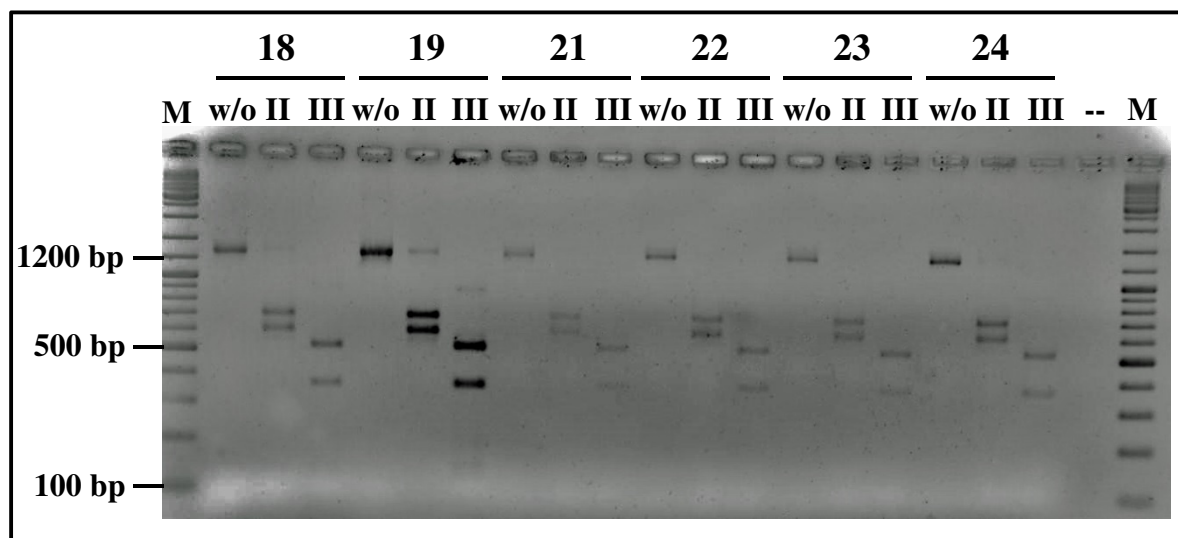
<sup>1)</sup>Keine Restriktionsschnittstelle der Endonuklease *HaeII* im untersuchten Fragment

### III.2.2 ARDRAs von Fermentersubstraten der BGA Wallhalben

Zur Untersuchung der Biodiversität methanogener Archaea wurde die BGA Wallhalben in den Jahren 2010 und 2011 beprobt. Aus diesen Proben erfolgte die Konstruktion zweier Klonbibliotheken von 66 (2010) bzw. 46 Klonen (2011) Umfang.

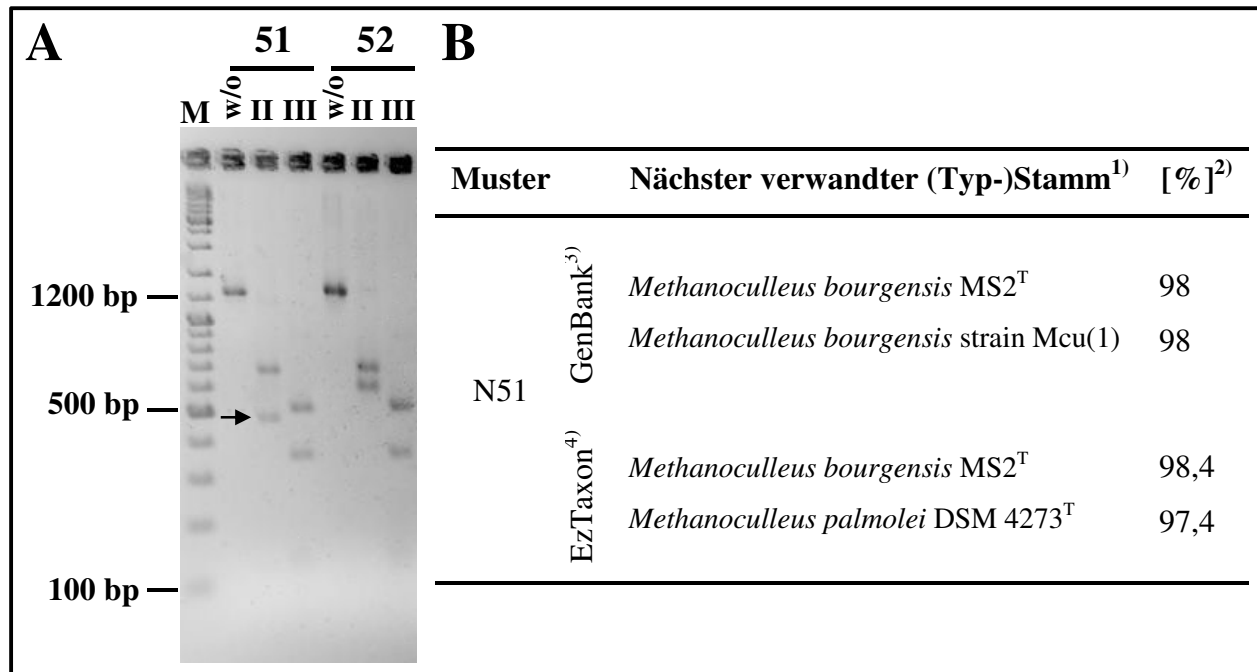
#### III.2.2.1 ARDRA der Klonbibliothek aus der Beprobung des Jahres 2010

Die Restriktionsanalyse der Klonbibliothek des Jahres 2010 zeigte mit 65 von 66 identischen Restriktionsfragment-Mustern eine nahezu uniforme Ausprägung. Dieses dominante Muster entsprach Muster „F“ aus der ARDRA-Untersuchung der BGA Arenrath (**Abb. 41**). Die Migrationsweite der Fragmentbanden im Agarose-Gel stimmte mit den für *HaeII* und *HaeIII* berechneten Fragmentlängen von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> überein.



**Abb. 41: Dominantes Restriktionsfragment-Muster nach *HaeII/HaeIII*-ARDRA der Klonbibliothek 2010 der BGA Wallhalben am Beispiel der Klone 18 bis 23.** Muster identisch mit dem *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> zugeordneten Muster F der ARDRA der BGA Arenrath (**Abb. 39**). M = GeneRuler<sup>TM</sup> DNA-Größenmarker, w/o = ungeschnittenes Fragment, II = Restriktion mit *HaeII*, III = Restriktion mit *HaeIII*, -- = Negativkontrolle.

Das einzige abweichende Muster von Klon 51 wies im Vergleich mit den übrigen Mustern einen Unterschied im *HaeII*-Restriktionsmuster auf. Statt auf Höhe von etwa 600 bp (entsprechend dem errechneten Fragment von 582 bp Länge) ergab sich hier eine Fragmentbande knapp unterhalb der 500 bp-Bande des DNA-Größenmarkers. Das *HaeIII*-Restriktionsmuster verblieb identisch zu dem der restlichen Klone (**Abb. 42A**). Die Sequenzanalyse des 16S rRNA-Genfragments von 500 bp Länge zeigte dennoch eine signifikante Sequenzidentität mit den Typstämmen von *Mcu. bourgensis* bzw. *Mcu. palmolei* (**Abb. 42B**).



**Abb. 42: Direktvergleich der Restriktionsmuster der *HaeII/HaeIII*-ARDRA der Klonbibliothek 2010 der BGA Wallhalben (A) samt 16S rRNA-Genfragmentanalyse des abweichenden Fragmentmusters (B).** Klon N51 weist im Vergleich zum bekannten, durch Klon 52 repräsentierten, *HaeII*-Restriktionsmuster ein kleineres Fragment unterhalb von 500 bp auf (Pfeil). Die Sequenzanalyse ordnet Klon 51 dennoch *Mcu. bourgensis* bzw. *Mcu. palmolei* zu. M = GeneRuler™ DNA-Größenmarker, w/o = ungeschnittenes Fragment, II = Restriktion mit *HaeII*, III = Restriktion mit *HaeIII*, - = Negativkontrolle.

<sup>1)</sup>nach Analyse der 16S rRNA-Genfragmentsequenz

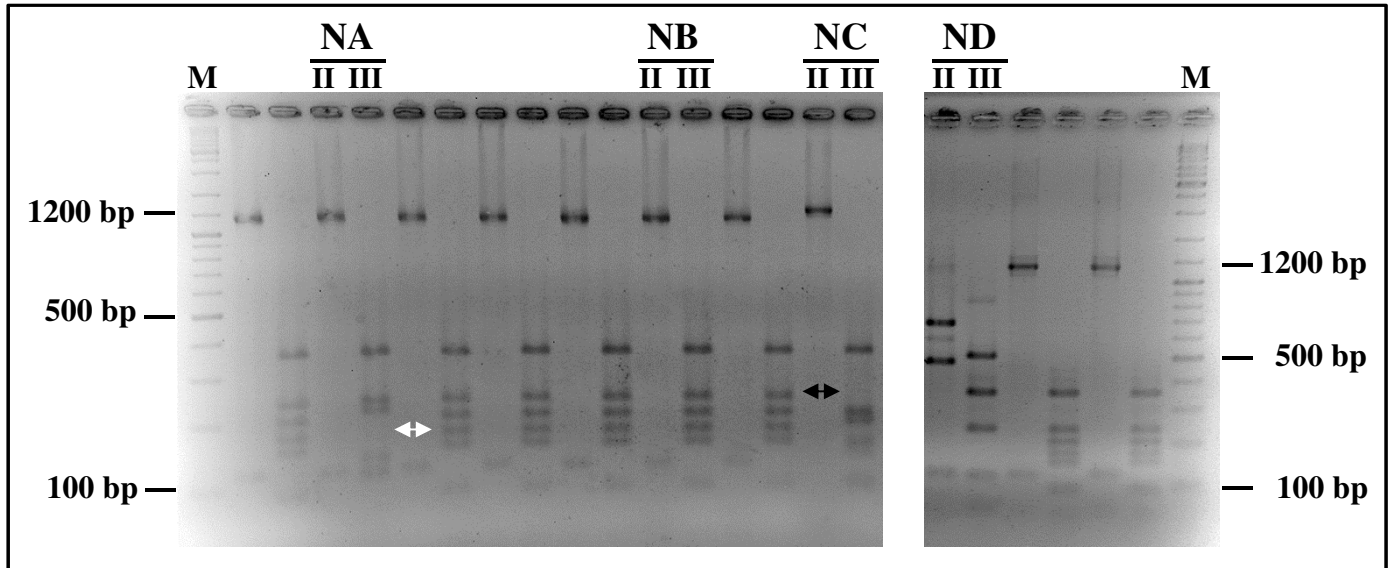
<sup>2)</sup>prozentuale Sequenzidentität des analysierten 16S rRNA-Genfragments mit dem des angegebenen Stamms.

<sup>3)</sup>GenBank Nucleotide Collection; <sup>4)</sup>EzTaxon cloud.

### III.2.2.2 ARDRA der Klonbibliothek aus der Beprobung des Jahres 2011

Die Auswertung der 16S rRNA-Genfragmentbibliothek aus der Beprobung der BGA Wallhalben im Jahre 2011 mittels ARDRA ergab 4 Mustergruppen aus insgesamt 46 untersuchten Klonen (**Abb. 43**). Die Sequenzanalyse repräsentativer Klone ermöglichte mit *Methanobacterium* sp., *Methanosarcina* sp. und *Methanoculleus* sp. den Nachweis von Vertretern dreier Gattungen methanogener Archaea. Ähnlich der ARDRA der Klonbibliothek der BGA Arenrath wurden dabei der Gattung *Methanobacterium* die zwei leicht unterschiedlichen Fragmentmuster „NB“ und „NC“ zugeordnet, die übrigen beiden Gattungen waren je einem Muster zuzuführen. Dabei ähnelt das Muster „NC“ dem Muster „D“ der Bibliothek aus der Beprobung des Arenrath-Fermenters. Muster „NB“ umfasste 80,4 % aller Klone und zeigte signifikante Sequenzidentitäten mit den entsprechenden 16S rDNA-Genen der Arten *Mb. petrolearium*, *Mb. kanagiense* und *Mb. formicum*. Gruppe „NC“ unterschied sich im *HaeII*-Muster durch eine fehlende Restriktion, im *HaeIII*-Muster durch das Fehlen

einer Bande unterhalb der 300 bp-Marke von Gruppe NB (Doppelpfeil in **Abb. 43**). „NC“ umfasste 13 % aller Klone und wies hohe Sequenzidentitäten mit den Arten *Mb. petrolearium* bzw. *Mb. formicicum* auf, der Schwellenwert von 97 % als Kriterium für eine Zugehörigkeit zu der entsprechenden Art wurde jedoch jeweils knapp verfehlt. Insgesamt stellte damit die Gattung *Methanobacterium* den dominanten Anteil an den detektierten Organismengruppen.



**Abb. 43: Restriktionsmustergruppen der ARDRA-Analyse von BGA Wallhalben (Klonbibliothek 2011).** Muster-repräsentative Klone wurden bezüglich ihres 16S rRNA Genfragment-Inserts sequenziert und anschließend mit Hilfe von *in silico*-Datenbanken taxonomisch eingeordnet (**Tab. 41**). NA, NB, NC und ND bezeichnen die vier unterschiedlichen Mustergruppen. Doppelpfeile deuten im Vergleich mit Gruppe NB auf die im *HaeIII*-Muster von Gruppe NC (↔) bzw. NA (↔) fehlende Bande(n). M = GeneRuler™ DNA-Größenmarker, II = Restriktion mit *HaeII*, III = Restriktion mit *HaeIII*.

Auch für Muster „NA“, welches nur einmal im gesamten Bibliotheksumfang gefunden wurde, konnte keine eindeutige Zuordnung auf Art-Niveau erstellt werden. Die Sequenzauswertung ergab jedoch in beiden Datenbanken eine Ähnlichkeit mit verschiedenen Arten der Gattung *Methanosarcina*. Die in der Vorjahres-Analyse als einzige detektierte Gattung *Methanoculleus* wurde in dieser ARDRA nur noch durch zwei Klone (entsprechend 4,3 % des Gesamtanteils) repräsentiert. Das mit *HaeII* erreichte Muster zeigte in Hauptsache die Bandengrößen des Klons 51 des Vorjahres, unter Einbezug einer schwächer ausgeprägten Bande bildete sich hier jedoch auch wieder das charakteristische Restriktionsmuster der restlichen Klone. Die höchste Sequenzidentität ergab sich daher auch mit *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, die Artschwelle wurde in diesem Fall jedoch knapp verfehlt. Einen Überblick über die Sequenzanalyse der Klonrepräsentanten der angeführten Gruppen bietet **Tab. 41**.

**Tab. 41: Direkte Identifikation methanogener Archaea aus Fermenterflüssigkeit der BGA Wallhalben mittels ARDRA der Klonbibliothek 2011.** Ergebnisse der Sequenzanalyse nach *in silico*-Abgleich mit den Datenbanken GenBank und EzTaxon Server 2.1.

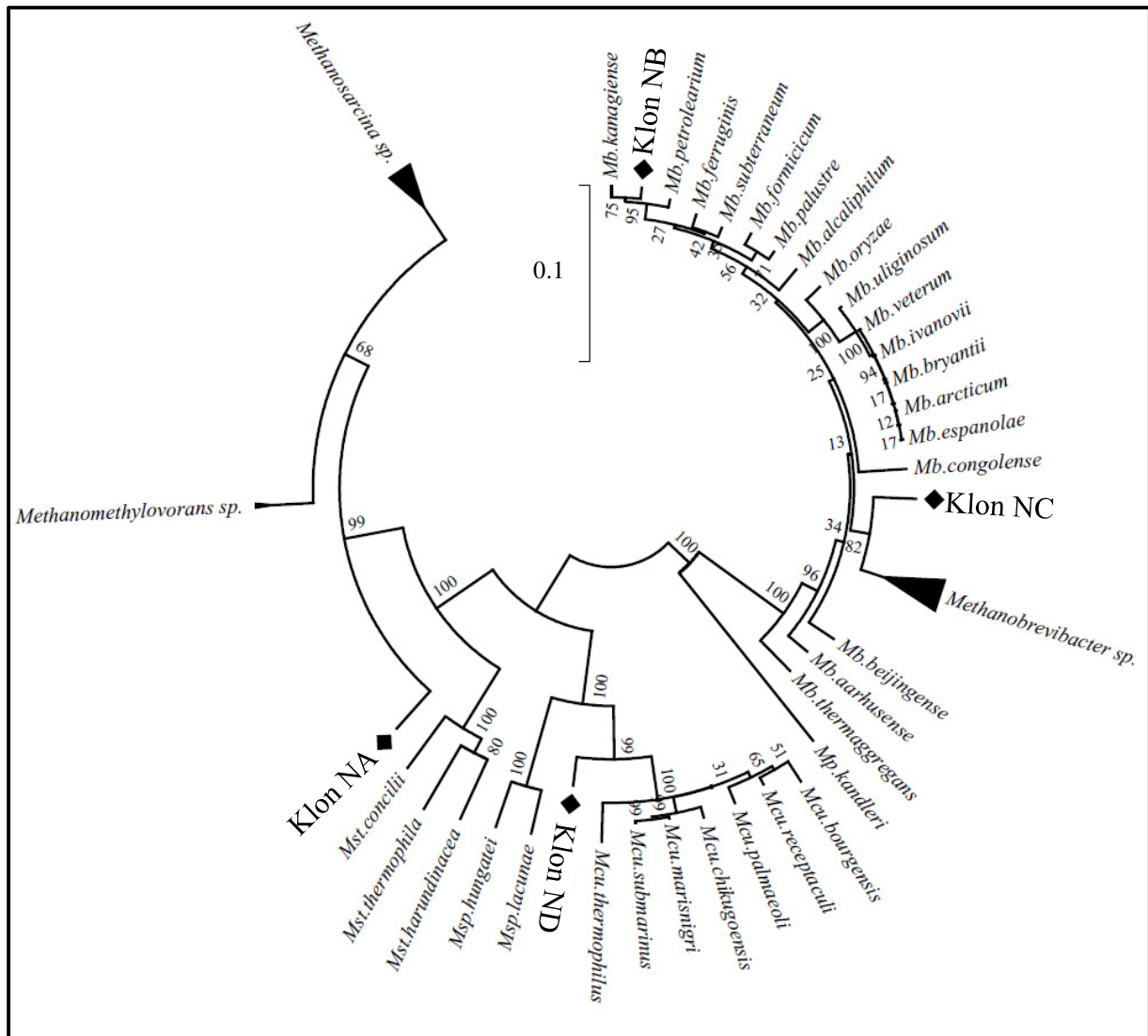
GenBank Nucleotide collection		EzTaxon Server 2.1		Fragmentlänge [bp]	Anzahl Klone/ Umfang Klonbibliothek [%]
Muster	Nächster verwandter (Typ-)Stamm <sup>1</sup>	[%] <sup>2</sup>	Nächster verwandter (Typ-)Stamm <sup>1</sup>		
	<i>Methanosarcina thermophila</i> TM-1 <sup>T</sup>	89	<i>Methanosarcina thermophila</i> TM-1 <sup>T</sup>	95,2	
NA	<i>Methanosarcina horonobensis</i> HB-1 <sup>T</sup>	89	<i>Methanosarcina mazei</i> Goe1	94,9	1/46 [2,2]
	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A <sup>T</sup>	89	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A <sup>T</sup>	94,8	
	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	98	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	98,5	
NB	<i>Methanobacterium kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	98	<i>Methanobacterium kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	98,3	37/46 [80,4]
	<i>Methanobacterium formicicum</i> MF <sup>T</sup>	97	<i>Methanobacterium formicicum</i> MF <sup>T</sup>	96,4	
	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	96	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	< 94,7 <sup>3</sup>	6/46 [13,0]
NC	<i>Methanobacterium formicicum</i> FCam	96			
ND	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	95	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	95,4	2/46 [4,3]

<sup>1</sup>nach Analyse der 16S rRNA-Genfragmentsequenz

<sup>2</sup>prozentuale Sequenzidentität des analysierten 16S rRNA-Genfragments mit dem des angegebenen Stamms

<sup>3</sup>Sequenziererergebnisse dreier verschiedener Klon-Repräsentanten ergaben als Höchstwert 94,7 % Sequenzidentität mit *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup>

Der Abgleich der evolutionären Verwandtschaft der Klonsequenzen mit den 16 rRNA-Gensequenzen der Typstammliste methanogener Archaea im Rahmen einer Stammbaumanalyse ergab für die dominante Mustergruppe „NB“ eine Positionierung in unmittelbarer Nähe zu den Arten, welche durch die Datenbank-Analysen der Klonsequenz zugewiesen wurde. Für die übrigen Gruppen, welche unterhalb des Artkriteriums von 97 % Sequenzidentität verblieben, ergaben sich leicht abweichende Positionierungen im Stammbaum. Die neben NB ebenfalls der Gattung *Methanobacterium* zugeordnete Gruppe „NC“ fand sich innerhalb des *Methanobacterium* sp.-Clusters wieder, gruppierte jedoch nicht mit „NB“ bzw. den Arten *Mb. petrolearium*, *Mb. kanagiense* und *Mb. formicicum*, sondern in der Nähe des Diversifizierungspunktes zur Gattung *Methanobrevibacter*. Die der Gattung *Methanoculleus* zugeordnete Gruppe „ND“ wurde nicht innerhalb der verschiedenen Arten positioniert, sondern in direkter Nachbarschaft. Dennoch kommen auf diese Weise alle Sequenzen dieser Gattung auf einem Ast zum Liegen und stimmen damit mit den Datenbanken überein. Analog wurde der für die Mustergruppe „NA“ repräsentative Klon innerhalb der Ordnung Methanosarcinales nicht innerhalb der Gattung *Methanosarcina* eingeordnet. Er befand sich jedoch mit Sequenzen der Gattungen *Methanomethylovorans* und *Methanosarcina* auf einem Ast und war somit klar von *Methanosaeta* sp.- Sequenzen abzugrenzen. Insgesamt wurden alle Klonsequenzen der Restriktions-mustergruppen voneinander unterschieden und in die Nähe der jeweils vorausgesagten Gattungen eingeordnet. Für Klon „NB“ gelang die Zuordnung auch auf Art-Ebene (**Abb. 44**).



**Abb. 44: Phylogenetische Einordnung der Klonsequenzen aus der ARDRA-Analyse der BGA Wallhalben.** Positionen der Klongruppenvertreter wurden mit ♦ markiert. Stammbaum erstellt durch die Neighbor-Joining-Methode nach Saitou und Nei, 1987. Die prozentualen Ergebnisse der Bootstrap-Analyse aus 1000 Wiederholungen (Felsenstein, 1985) sind über den Ästen angegeben. Evolutionäre Distanzen wurden unter Verwendung der Maximum Composite Likelihood-Methode (Tamura et al., 2004) mit der Software MEGA5.1 (Tamura et al., 2011) berechnet. Alle Positionen, in denen weniger als 50 % aller 61 16S rRNA-Gensequenzen der Typstämme methanogener Archaea ein Nukleotid enthielten, wurden zuvor aus dem zugrunde liegenden Alignment entfernt.

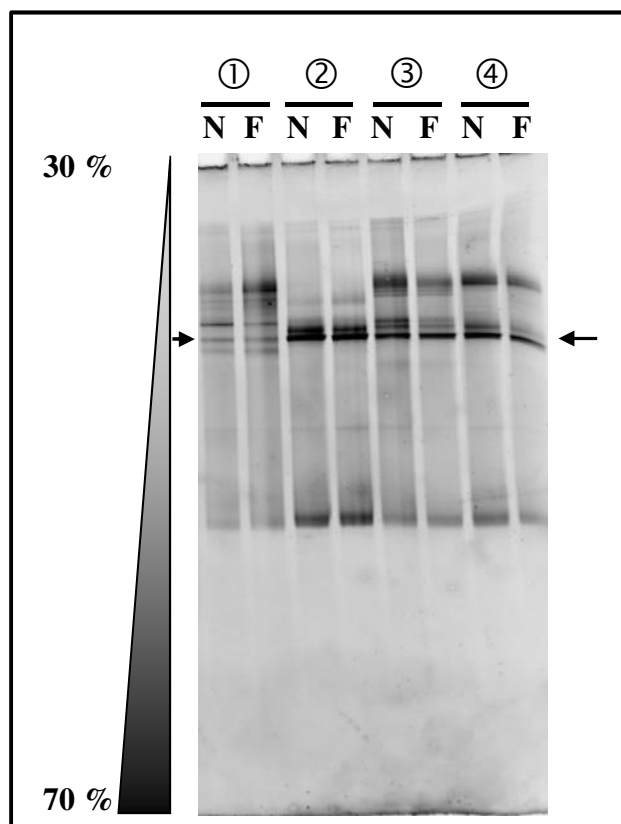


### III.3 Untersuchung der Biodiversität methanogener Archaea mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Ergänzend zum Erstellen von Klonbibliotheken und deren Analyse mittels ARDRA (siehe III.2) wurde die Biozönose archaeeller Mikroorganismen in BGA-Reaktoren unter Einsatz der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese untersucht. Auf diese Weise sollte eine Überprüfung der aus den ARDRA-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sowie ein vertiefender und vervollständigender Überblick über die Präsenz methanogener Archaea in diesen Habitaten gewonnen werden.

#### III.3.1 Vergleich der archaeellen Population in Fermenter und Nachgärer

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob sich die archaeelle Population in Fermenter und Nachgärer einer BGA signifikant unterscheidet. Dazu wurden die entsprechenden Reaktoren der BGA Arenrath, Niederweiler, Obere Blies und Kaschenbach beprobt und per DGGE der 16S rRNA-Genfragmente in einem Gradienten von 30 %  $\nabla$  70 % der denaturierenden Agenzien Formamid und Harnstoff analysiert. Der Lauf ist in **Abb. 45** wiedergegeben.



**Abb. 45: DGGE von Nachgärer- (N) und Fermenterproben (F) aus vier NawaRo-Biogasanlagen.** Amplifikation eines 16S rRNA-Genfragments mit sukzessiver Auftrennung nach GC-Gehalt in einem 30 %  $\nabla$  70 %-denaturierenden Gradienten. Die in allen Proben detektierte Bande ( $\leftarrow$ ) wurde sequenziert und ausgewertet. ① = BGA Arenrath, ② = BGA Niederweiler, ③ = BGA Obere Blies, ④ = BGA Kaschenbach.

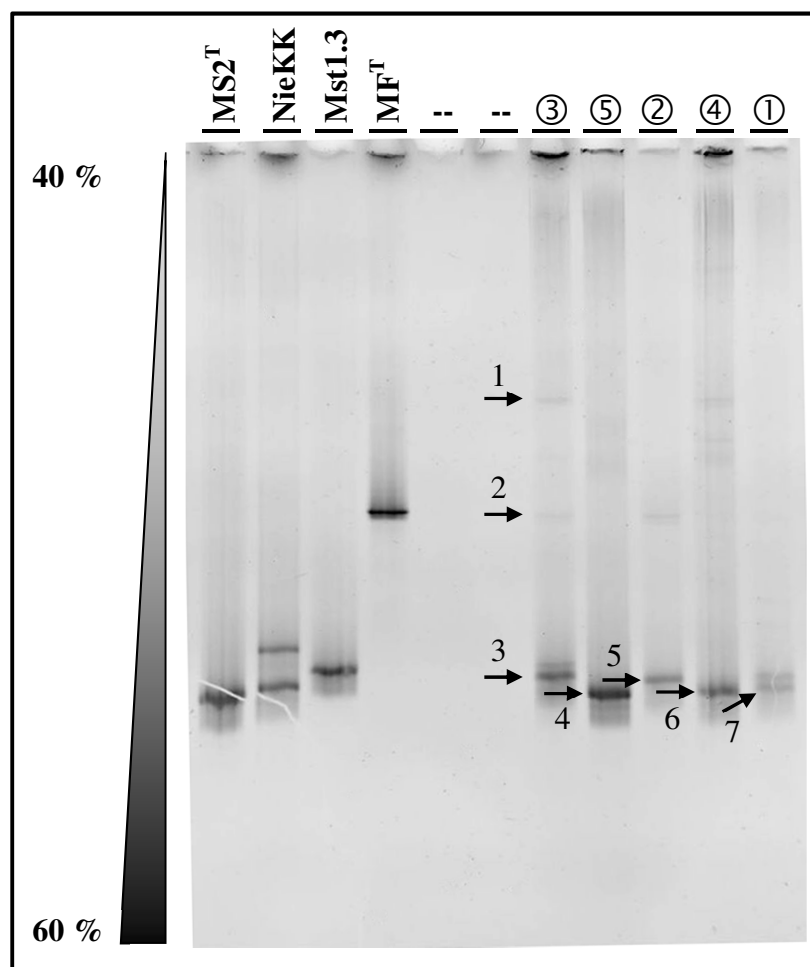
Nach der Gelelektrophorese konnte für jede getestete BGA ein eigenes Bandenmuster detektiert werden. Dabei zeigte sich jeweils eine Übereinstimmung des Bandenmusters von Fermenter und Nachgärer einer Anlage, woraus auf eine Identität der vorliegenden und detektierten archaeellen Population innerhalb dieser Reaktionsräume geschlossen werden kann. Es konnten Banden ausgemacht werden, welche auf identischer Höhe über alle getesteten Anlagen hinweg in den entsprechenden Spuren zum Liegen kamen. Banden identischer Migrationsweite wichen teilweise in ihrer Intensität zwischen den verschiedenen BGA-Proben voneinander ab. Die Staffelung der DNA-Banden umfasste dabei nicht das vollständige Spektrum des Gradienten, sie wurden vielmehr in Bereichen geringerer Konzentrationen denaturierender Agenzien lokalisiert. Dadurch folgten die einzelnen Banden teils sehr dicht aufeinander, was die sowohl die Differenzierung, als auch die Exzision zwecks Sequenzierung erschwerte. Eine in Bezug auf ihre Intensität dominante Bande, welche in den BGA Niederweiler, Obere Blies und Kaschenbach detektiert wurde, konnte für jede Anlage ansequenziert werden. Sie war auch in den Spuren der Anlage Arenrath vorhanden, die Bandenstärke unterschied sich hier jedoch nicht signifikant von der anderer Banden des Musters. Die Auswertung des Elektropherogramms der jeweiligen Sequenzierungsläufe zeigte teilweise unsichere Nukleotidpositionen, welche vor dem Datenbankabgleich mit einem Platzhalter für ein beliebiges der vier Nukleotide versehen wurden. Der Abgleich von 316 bp der sichersten Sequenz (eine unsichere Position) dieser repräsentativen Bande aus der Spur der BGA Obere Blies ergab eine Sequenzidentität von 99 % (GenBank) bzw. 99,32 % (EzTaxon-e cloud) mit *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>. Weitere signifikante Übereinstimmungen fanden sich in beiden Datenbanken für weitere Stämme von *Mcu. bourgensis* sowie für die Arten *Mcu. submarinus*, *Mcu. receptaculi*, *Mcu. marisnigri* und *Mcu. chikugoensis*. Die Sequenzierungsergebnisse von Banden, welche sich in der Elektrophorese oberhalb dieser *Methanoculleus* sp.-Bande positionierten, wiesen viele unsichere Nukleotide auf und wurden aus diesem Grunde nicht für weitere taxonomische Zuordnungen herangezogen.

### III.3.2 DGGE-Analyse von Fermenterproben mit eingeschränkter Gradientenspanne

Zur Vermeidung einer engen Staffelung der DNA-Banden eines DGGE-Musters erfolgten folgende DGGE-Experimente in einem auf 40 bzw. 45 %  $\nabla$  60 % angepassten Gradienten. Dadurch sollte über eine Spreitung der Migrationsweiten eine bessere Unterscheidung und treffendere Auswertung ermöglicht werden. Aufgrund der Identität der Muster von Fermenter und Nachgärer in der vorangegangenen DGGE konzentrierten sich weitere Experimente vorwiegend auf DNA-Extrakte aus Fermentersubstrat der BGA.

### III.3.2.1 Referenzgestützte DGGE-Analysen von BGA-Fermenterproben

DNA-Extrakte aller fünf in dieser Arbeit beprobter NawaRo-BGA wurden in einem DGGE-Lauf einander gegenübergestellt. Als interne Kontrolle sollten mitgeführte Referenzen für jede im Rahmen der ARDRA-Analysen detektierten Gattungen eine schnelle Zuordnung von DNA-Banden in Ergänzung zu Sequenzierungsansätzen erlauben. In diesem Versuch wurden dafür die DNA-Extrakte der Typstämme von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> neben denjenigen als *Msc. mazei* und *Mst. concilii* identifizierten Eigenisolaten (s.u.) eingesetzt (**Abb. 46**). Eine tabellarische Übersicht über die Sequenzierungsergebnisse der DNA-Banden der im Folgenden beschriebenen DGGE-Analyse bietet **Tab. 42**.



**Abb. 46: DGGE von Fermenterproben im Direktvergleich mit Referenzorganismen.** Auftrennung von 16S rRNA-Genfragmenten nach GC-Gehalt in einem 40 %  $\nabla$  60 %-denaturierenden Gradienten. MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, NieKK = *Msc. mazei* Eigenisolat, Mst1.3 = *Mst. concilii* Eigenisolat, MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, ① = BGA Arenrath, ② = BGA Niederweiler, ③ = BGA Obere Blies, ④ = BGA Kaschenbach, ⑤ = BGA Wallhalben, -- = unbelegte Freispur. Nummerierte Pfeile (  $\rightarrow$  ) bezeichnen die sequenzierte DNA-Banden

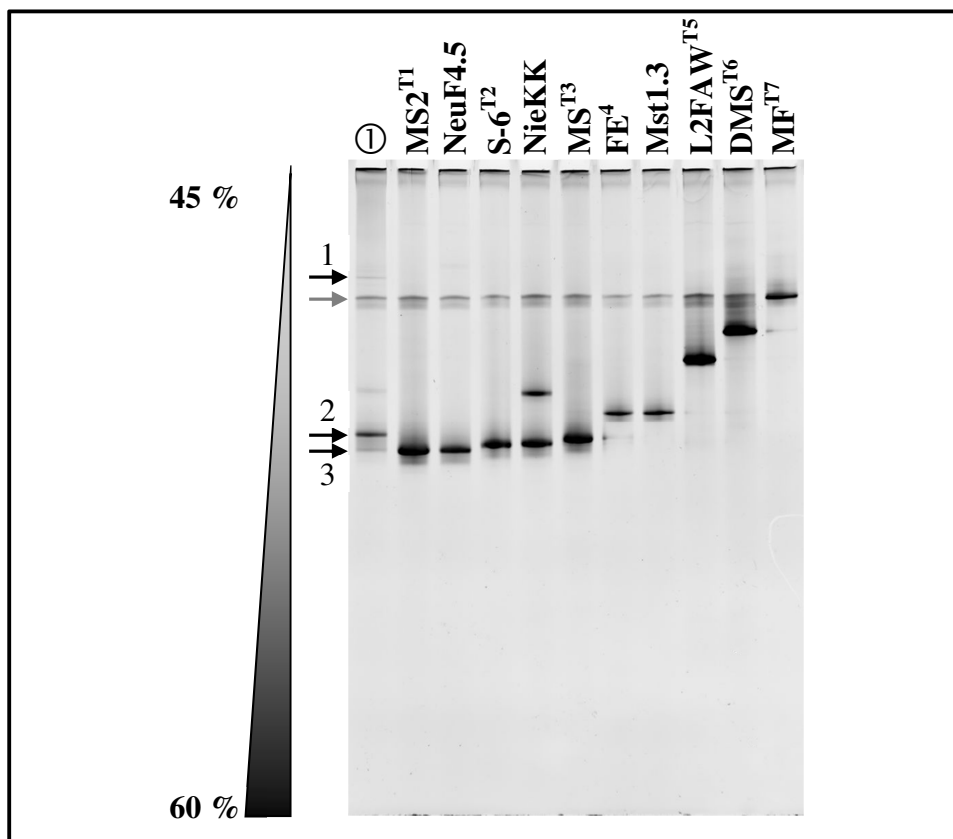
In diesem Lauf ergab sich für alle Spuren eine längere Migrationsweite als in der unter III.3.1 angegebenen DGGE. Die DNA-Banden mit der größten Migrationsweite positionierten sich innerhalb des 40 %  $\nabla$  60 %-Gradienten nach etwa  $\frac{3}{4}$  der Gellänge. In diesem Bereich war die Staffelung noch immer eng, eine Unterscheidung sowie die Zuordnung von DNA-Banden zu den mitgeführten Referenzen war jedoch möglich. Im Vergleich zu der oben aufgeführten DGGE traten hier weniger Banden innerhalb einer Spur auf, im Extremfall der BGA Wallhalben (⑤) konnte nur Bande 4 (**Abb. 46**) detektiert werden. Diese befand sich auf identischer Höhe mit dem mitgeführten Typstamm *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>. Per Sequenzierung konnte die Zugehörigkeit zu dieser Art bestätigt werden (**Tab. 42**). Im Extrakt der BGA Obere Blies (③) konnten drei Banden detektiert und aufgrund ihrer deutlich unterschiedlichen Migrationsweite unterschieden werden. Während die oberste Bande 1 keiner der Referenzen entsprach, kam Bande 2 auf der Höhe von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, Bande 3 etwas unterhalb der Höhe des *Mst. concilii*-Eigenisolats Mst1.3 zum liegen. Bande 2 konnte nach der Sequenzanalyse verschiedenen Arten der Gattung *Methanobacterium* signifikant zugeordnet werden, auch für Bande 3 ergab sich entsprechend der beobachteten Migrationsweite eine Sequenzidentität von 97,86 % mit dem 16S rRNA-Genfragment von *Mst. concilii* GP-6<sup>T</sup>. Bande 1 wurde *Methanospirillum hungatei* JF-1<sup>T</sup> zugewiesen und bezeichnete im Rahmen dieser Arbeit den ersten Hinweis auf diese Art. Diese Bande konnte auch in der Probe der BGA Kaschenbach (④) nachgewiesen werden. Die dominante Bande befand sich hier jedoch auf Höhe der oben beschriebenen Bande 4 sowie der entsprechenden Referenzbande von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>. Auch hier konnte das Ergebnis über die Sequenzanalyse bestätigt werden. Im Fall der BGA Niederweiler (②) konnte dagegen eine schwache Bande mit identischer Laufweite zu Bande 2 neben der dominanten Bande 5 detektiert werden. Letztere positionierte sich knapp oberhalb der unteren Bande der *Msc. mazei*-Referenz NieKK, jedoch noch unterhalb der Referenz Mst1.3. Die Sequenzanalyse ergab hier eine Zuweisung zur Gattung *Methanosarcina* sp. mit signifikanter Übereinstimmung zu den Arten *Msc. thermophila*, *Msc. vacuolata* und *Msc. horonobensis*. Die Ausbildung einer Doppelbande im Eigenisolat NieKK ist reproduzierbar und unterscheidet dieses vom Typstamm. Dennoch konnte die obere Bande ebenso signifikant *Msc. mazei* zugeordnet werden und ist damit nicht auf eine Kontamination zurückzuführen. Die Probe der BGA Arenrath (①) zeigte eine Doppelbande. Die untere Bande (Bande 7) positionierte sich dabei etwas oberhalb derjenigen, welche *Mcu. bourgensis* zugeordnet wurden und ergab eine Sequenzidentität von 98,32 % mit *Mcu. hydrogenitrophicus* HC<sup>T</sup>. Die obere Bande positionierte sich auf Höhe der Bande 5 (*Msc. mazei* bzw. *Msc. thermophila*).

**Tab. 42: 16S rRNA-Gensequenzanalyse der per DGGE aufgetrennten DNA-Banden aus BGA-Fermenterinhalt.** Zum Gel-Lauf vgl. **Abb. 46**

Bande	BGA (Spur)	Übereinstimmung mit (Ez Taxon Server 2.1)	% <sup>1)</sup>	Fragmentlänge [bp]
1	Obere Blies (③)	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1 <sup>T</sup>	98,67	319
2	Obere Blies (③)	<i>Methanobacterium kanagiense</i> 169 <sup>T</sup>	99,11	347
		<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 <sup>T</sup>	99,68	
3	Obere Blies (③)	<i>Methanobacterium formicicum</i> MF <sup>T</sup>	97,12 <sup>2)</sup>	327
		<i>Methanosaeta concilii</i> GP-6 <sup>T</sup>	97,6	
4	Wallhalben (⑤)	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	100	335
		<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1 <sup>T</sup>	97,91	
		<i>Methanoculleus receptaculi</i> ZC2 <sup>T</sup>	97,37 <sup>3)</sup>	
5	Niederweiler (②)	<i>Methanosarcina thermophila</i> DSM1825 <sup>T</sup>	97,86	342
		<i>Methanosarcina horonobensis</i> HB-1 <sup>T</sup>	97,36	
		<i>Methanosarcina vacuolata</i> DSM1232 <sup>T</sup>	97,07	
6	Kaschenbach (④)	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	100	338
		<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1 <sup>T</sup>	97,93	
		<i>Methanoculleus receptaculi</i> ZC2 <sup>T</sup>	97,40 <sup>2)</sup>	
7	Arenrath (①)	<i>Methanoculleus hydrogenitrophicus</i> HC <sup>T</sup>	98,32	305
		<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	98,28	
		<i>Methanoculleus chikugoensis</i> MG62 <sup>T</sup>	97,65 <sup>3)</sup>	

<sup>1)</sup>prozentuale Sequenzidentität des analysierten 16S rRNA-Genfragments mit dem des angegebenen Stamms.<sup>2)</sup>geringste noch signifikante Sequenzidentität verschiedener *Methanobacterium* sp.-Arten.<sup>3)</sup>geringste noch signifikante Sequenzidentität verschiedener *Methanoculleus* sp.-Arten.

In einer folgenden DGGE-Analyse wurde der Einfluss einer weiteren Reduzierung der Spanne des Konzentrationsgradienten von 40 %  $\searrow$  60 % auf 45 %  $\searrow$  60 % anhand eines frischen DNA-Extraktes aus Fermentersubstrat der BGA Arenrath getestet. Dabei wurden zwei PCR-Ansätze aus diesem Extrakt vereinigt und anschließend aufgereinigt, um nach Elution im üblichen Volumen eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Als Referenzorganismen dienten sowohl die Typstämme *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>, *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>, *Methanomethylovorans (Mmv.) thermophila* L2FAW<sup>T</sup>, *Mmv. hollandica* DMS1<sup>T</sup>, *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> als auch Eigenisolate methanogener Archaea (s.u.). Als Referenz für *Mst. concilii* diente, neben dem Eigenisolat Mst1.3, der Stamm FE. Auch in diesem Fall erfolgte die Migration nicht über die gesamte Gellänge hinweg, vielmehr verblieben die DNA-Banden spätestens nach der Hälfte des Konzentrationsgradienten auf ihren Positionen (Abb. 47).



**Abb. 47: DGGE-Analyse der BGA Arenrath im Vergleich mit Referenzstämmen im eingengen Konzentrationsgradienten.** Auftrennung von 16S rRNA-Genfragmenten nach GC-Gehalt in einem 45%  $\searrow$  60%-denaturierenden Gradienten. ① = BGA Arenrath, <sup>1</sup>MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, NeuF4.5 = Eigenisolat *Mcu. bourgensis*, <sup>2</sup>S-6<sup>T</sup> = *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>, NieKK = Eigenisolat *Msc. mazei*, <sup>3</sup>MS<sup>T</sup> = *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>, <sup>4</sup>FE = *Mst. concilii* FE, Mst1.3 = Eigenisolat *Mst. concilii*, <sup>5</sup>L2FAW<sup>T</sup> = *Mmv. thermophila* L2FAW<sup>T</sup>, <sup>6</sup>DMS<sup>T</sup> = *Mmv. hollandica* DMS1<sup>T</sup>, <sup>7</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Nummerierte Pfeile (→) bezeichnen die sequenzierte DNA-Banden, ein grauer Pfeil (→) markiert eine Artefaktbande.

Auch in diesem DGGE-Verlauf konnte eine Auftrennung der mitgeführten Referenzstämme und Eigenisolate erreicht werden. Dabei kamen die Eigenisolate stets auf derselben Höhe wie der korrelierte Referenzstamm zu liegen. Insgesamt konnte eine größere Bandenvielfalt für den Extrakt der BGA Arenrath (①, **Abb. 47**) als in der voran aufgeführten DGGE ausgemacht werden. Wie in dieser ergab sich auch im 45 %  $\nabla$  60 %-Gradienten eine Doppelbande am Ende der Laufspur der Fermenterprobe. Hier bewirkte der Gradient einen deutlicheren Abstand zwischen den beiden Banden und ermöglichte so deren Sequenzierung. Der *in silico*-Abgleich mit den Datenbanken EzTaxon Server 2.1 und GenBank ergab mit 97,9 % bzw. 98 % signifikante Sequenzidentitäten mit *Mst. concilii* GP-6<sup>T</sup> für Bande 2. Diese positionierte sich im Gel zwischen den Referenzbanden von *Mst. concilii* FE und *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>. Im Falle der tiefer liegenden Bande 3, welche im Gel ein identisches Migrationsverhalten zur Referenzbande von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> aufwies, konnte die Zuordnung zu diesem Typstamm auch über die Sequenzidentitäten verifiziert werden. Oberhalb von Bande 2 war eine schwache Bande auf Höhe der oberen Bande des *Msc. mazei*-Eigenisolats erkennbar. Eine Sequenzanalyse war hier jedoch nicht möglich. Im Gegensatz zu der Fermenterprobe des Laufs im 45 %  $\nabla$  60 %-Gradienten konnte ferner eine Bande oberhalb der *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Referenz festgestellt werden. Die Sequenzanalyse für diese Bande 1 ermöglichte eine signifikante Zuordnung (98,2 % bzw. 99% Sequenzidentität) zum Taxon *Msp. hungatei* JF-1<sup>T</sup>, ähnlich, wie es zuvor für die BGA Obere Blies und Kaschenbach detektiert wurde (**Abb. 46**). **Tabelle 43** bietet einen Überblick über die Ergebnisse der beschriebenen Sequenzanalysen.

**Tab. 43: 16S rRNA-Gensequenzanalyse von DNA-Banden aus einer DGGE-Auftrennung im 45 %  $\nabla$  60 %-Gradienten denaturierender Agenzien.** Die Positionen der DNA-Banden im Vergleich mit Referenzstamm-Banden sind in **Abb. 47** wiedergegeben.

Bande	Nächster verwandter (Typ-)Stamm	Sequenzidentität [%]	Sequenzlänge [bp]
1	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1 <sup>T</sup>	99 <sup>1)</sup>	343
		98,2 <sup>2)</sup>	
2	<i>Methanosaeta concilii</i> GP-6 <sup>T</sup>	98 <sup>1)</sup>	349
		97,9 <sup>2)</sup>	
3	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	99 <sup>1)</sup>	332
		100 <sup>2)</sup>	

<sup>1)</sup>nach GenBank Nucleotide collection

<sup>2)</sup>nach EzTaxon Server 2.1

In allen Spuren konnte eine Bande auf Höhe der *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Referenz ausgemacht werden (grauer Pfeil in **Abb. 47**). Durch den Umstand, dass diese Bande sowohl in Proben der DSMZ-Typstämme, als auch in den Eigenisolaten vorkam und zuvor auch nicht im Extrakt der BGA Arenrath detektiert wurde, wurde diese als Ladeartefakt deklariert. Keine folgende DGGE bzw. PCR ergab eine erneute Detektion dieses DNA-Fragments.

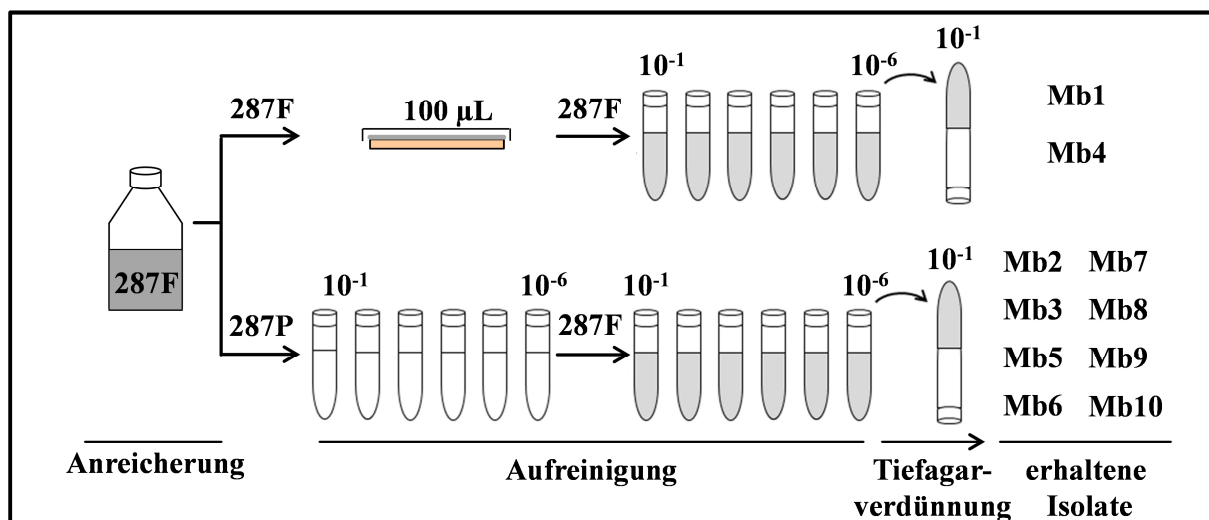
## B) Isolierung und Charakterisierung methanogener Archaea aus NawaRo-Biogasanlagen

### III.4 Isolate methanogener Archaea aus landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Frage nach der Isolierbarkeit methanogener Archaea aus laufenden Praxis-BGA auf NawaRo-Basis. Aufgrund ihrer Detektion in den im Rahmen dieser Dissertationsarbeit beprobten BGA durch die kultivierungsunabhängigen Methoden (**III.2** und **III.3**) wurden Strategien zur Isolierung von Mikroorganismen der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* erarbeitet (**II.1.11**) und angewandt.

#### III.4.1 Isolate von Mikroorganismen der Gattung *Methanobacterium*

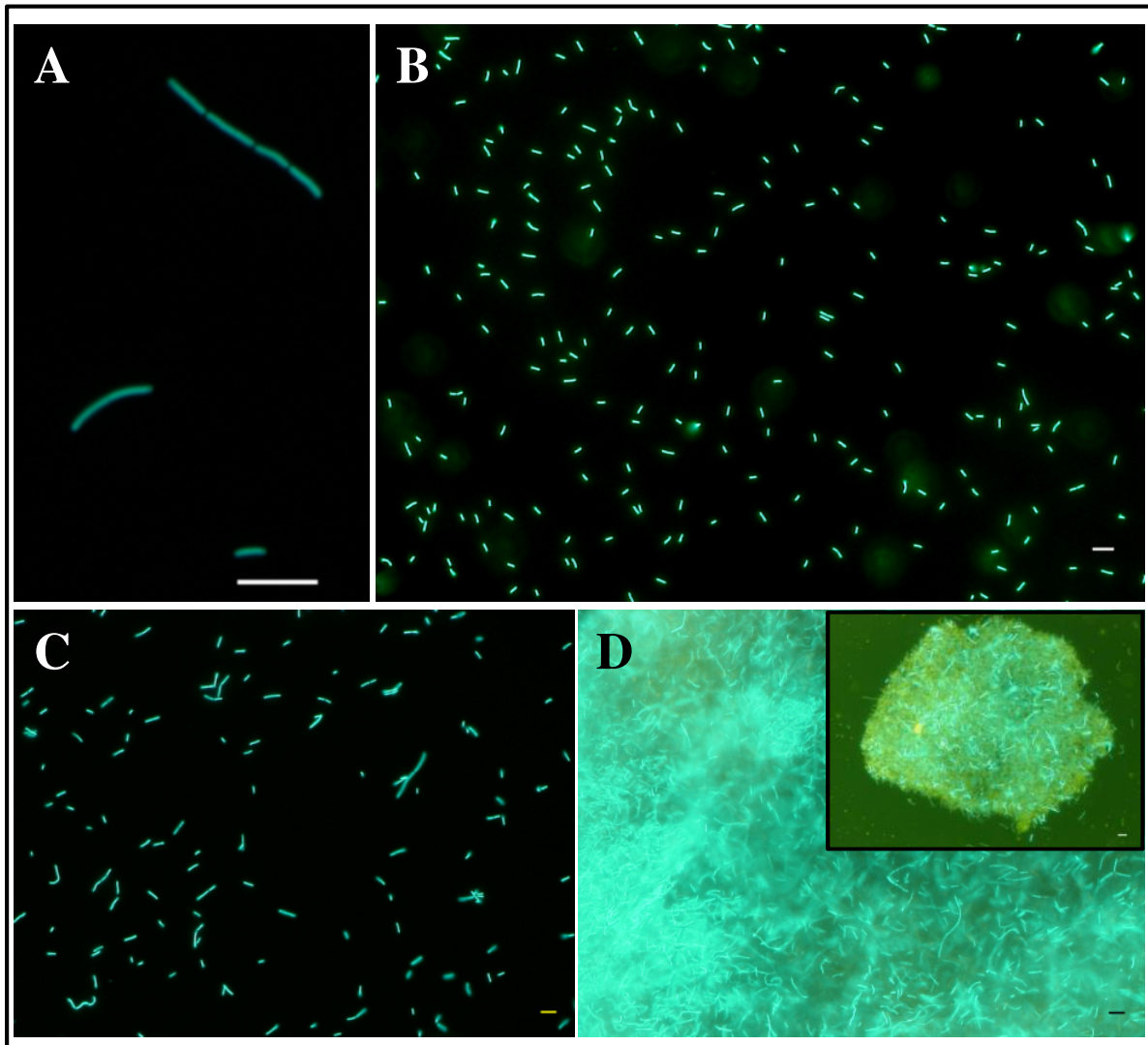
Die Isolierung methanogener Archaea aus der hydrogenotrophen Gattung *Methanobacterium* gelang insbesondere durch Anwendung der Technik des anaeroben Ausplattierens verdünnter Anreicherungskulturen mit nachgeschalteter Verdünnungsreihe in Flüssigmedien oder direkt aus unverdünnten Anreicherungskulturen durch dekadische Verdünnungen in Flüssigmedien mit sukzessiver Wiederholung ausgehend von der höchsten noch bewachsenen Verdünnungsstufe (**Abb. 48**). Abschließende Tiefagar-Verdünnungen sicherten die Reinheit der Kultur.



**Abb. 48: *Methanobacterium*-Isolate sortiert nach Isolierungsstrategie.** Ausgehend von einer Anreicherungskultur wurden Isolate Mb1 und Mb4 nach anaerobem Ausplattieren (oben), die übrigen Isolate durch serielle Verdünnung gewonnen (unten). Vgl. **II.1.10**.

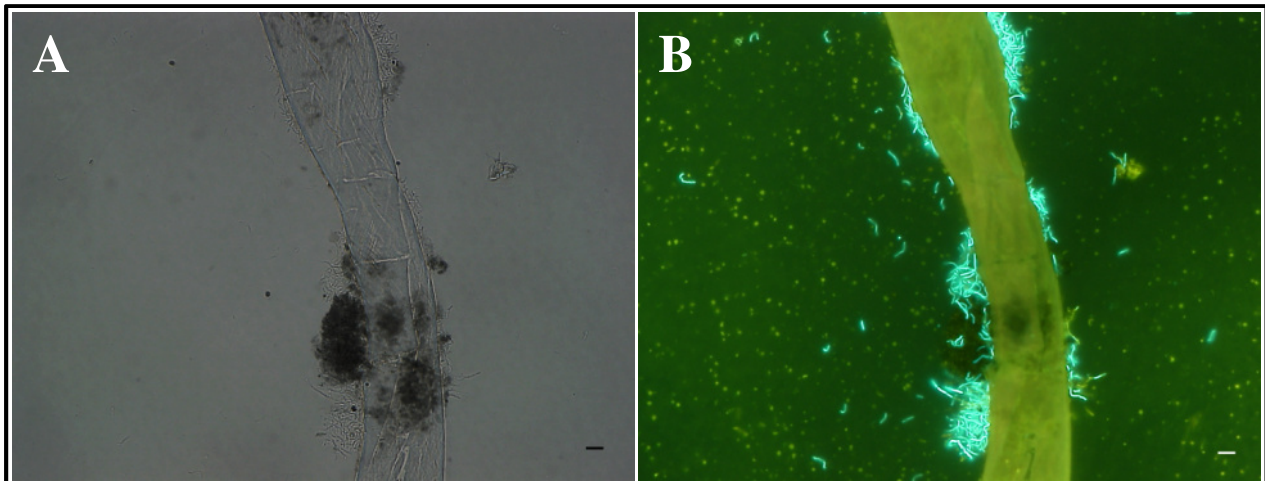


Auf diese Weise konnten, ausgehend von Beprobungen der BGA Obere Blies (Isolat Mb1), Niederweiler (Isolate Mb2, Mb3, Mb4), Arenrath (Mb5, Mb6 und Mb7) und Kaschenbach (Mb8, Mb9 und Mb10), zehn Isolate erstellt werden. Morphologisch charakterisiert sind sämtliche Isolate als kurze bis mittellange Stäbchen von etwa 2 - 15  $\mu\text{m}$  Länge in teils kettenartiger Organisation (**Abb. 49A**). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte die typische blau-grüne Eigenfluoreszenz methanogener Archaea nach Anregung mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 420 \text{ nm}$ . Makroskopisch zeigte sich die Ausbildung einer gleichmäßigen Suspension in Flüssigkultur (**Abb. 49B**). Mit Zunahme der Zelldichte ging eine verstärkte Kettenbildung einher (**Abb. 49C, D**). Bei genügend hohem Organismen-titer in Batchkulturen bildeten sich zudem auch unter kontinuierlichem Schütteln Aggregate von hoher Zelldichte, welche mit dem Auge sichtbar waren (**Abb. 49D**).



**Abb. 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarischer *Methanobacterium*-Isolate.** Übersicht über die Organisationsformen des *Mb. formicicum*-verwandten Isolats Mb8. Stäbchen als Einzelzelle (unten), in Ketten aus zwei (Mitte) und vier Organismen (oben)(A). Isolat Mb1 in frühem (B) und mittleren Wachstumsstadium (C). Ausschnitt aus einem Zellaggregat aus späten Wachstumsstadien mit hohem Zelltitern des Isolats Mb6. Der Bildeinschub bietet eine Übersicht über ein globuläres Zellaggregat von Isolat Mb4 (D). Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

In Stadien früher Anreicherungskulturen zeigte sich wiederholt die Assoziation stäbchenförmiger methanogener Archaea an partikuläres Pflanzenmaterial (**Abb. 50**). Alle Isolate wuchsen unter Nutzung der H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei einer Temperatur von 39 °C. Die taxonomische Einordnung der Isolate erfolgte durch Sequenzierung eines 1254 bp langen Fragmentes des 16S rRNA-Gens mit anschließendem Datenbankabgleich. Danach wiesen alle Isolate eine signifikante Übereinstimmung von  $\geq 98 \%$  mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> auf.



**Abb. 50: Anheftung von *Methanobacterium*-Isolat Mb6 an partikuläres Pflanzenmaterial.** Hellfeld- (A) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (B) von frühen Anreicherungskulturen aus BGA-Reaktorsubstrat mit mod. Medium DSM287F. Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

**Tabelle 44** fasst Sequenzierergebnisse, Morphologien und getestete Substrate der Isolate zusammen.

**Tab. 44: Charakterisierung von *Mb. formicicum*-verwandten Isolaten aus landwirtschaftlichen NawaRo-BGA.**

Isolat [GenBank] <sup>1</sup>	Zellmorphologie	getestetes Substrat	Identität [%] <sup>2</sup>	Fragment- länge [bp] <sup>3</sup>	Isoliert aus BGA <sup>4</sup>
<b>Mb1</b> [JN205052]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	922	③
<b>Mb2</b> [JN205053]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	927	②
<b>Mb3</b> [JN205054]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	958	②
<b>Mb4</b> [JN205055]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	354	②
<b>Mb5</b> [JN205056]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	899	①
<b>Mb6</b> [JN205057]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	959	①
<b>Mb7</b> [JN205058]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	959	①

**Tab. 44 (Fortsetzung):**

Isolat [GenBank] <sup>1</sup>	Zellmorphologie	getestetes Substrat	Identität [%] <sup>2</sup>	Fragment- länge [bp] <sup>3</sup>	Isoliert aus BGA <sup>4</sup>
<b>Mb8</b> [JN205059]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	99	929	④
<b>Mb9</b> [JN205060]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	983	④
<b>Mb10</b> [JN205061]	stäbchenförmig, autofluoreszierend	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	98	979	④

<sup>1</sup>Angegeben ist die Zugriffsnummer der in GenBank hinterlegten 16S rRNA-Gensequenz.

<sup>2</sup>prozentuale Übereinstimmung mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> nach Sequenzabgleich des 16S rRNA-Gens mit GenBank und EzTaxon Server 2.1, Nachkommastelle vernachlässigt.

<sup>3</sup>Länge der für Datenbankabfragen eingesetzten Sequenzinformation (von 1254 bp).

<sup>4</sup>③ = BGA Obere Blies, ② = BGA Niederweiler, ① = BGA Arenrath, ④ = BGA Kaschenbach (**Tab. 13**).

#### III.4.2 Isolat *Methanosarcina mazei* NieKK

Die Isolierung von Organismen der Gattung *Methanosarcina* (*Msc.*) gelang durch die Durchführung sukzessiver Verdünnungsreihen ausgehend von der direkten Reaktorsubstrat-Animpfung von Minimalmedium mod. DSMZ318P mit Methanol als einziger Energiequelle (**Abb. 27**). Das aus einer Beprobung der BGA Niederweiler resultierende Isolat NieKK zeigte jedoch auch Wachstum in mod. Medium DSMZ287P unter H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre sowie unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in mod. DSMZ318, in welchem Methanol durch Mono- bzw. Dimethylamin ersetzt wurde. Auch auf Acetat wurde Wachstum beobachtet. Die Wachstumstemperatur betrug unter den angegebenen Kulturbedingungen 39 °C. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte für das Isolat die für methanogene Archaea typische Autofluoreszenz verifiziert werden (**Abb. 51**). Morphologisch ist Isolat NieKK durch seine Wuchsform in Zellpaketen von etwa 2,5 bis 5 µm Durchmesser charakterisiert. Dabei verbleiben die Zellen nach dem Teilungsprozess räumlich miteinander assoziiert. Charakteristisch ist zudem die Bildung ausgedehnter Zellaggregate, welche aus mehreren hundert Einzelzellen bzw. Paketen bestehen können. Im Gegensatz zu den unter **III.4.1** beschriebenen Aggregaten der *Mb. formicium*-verwandten Eigenisolate trat die Bildung der Zellcluster schon in frühen Wachstumsphasen auf. Das die Aggregate des Isolats NieKK umgebene Medium verblieb meist steril, sodass hier vermutlich die Hauptwuchsform beobachtet wurde und die Bildung der Aggregate nicht auf das Vorliegen eines hohen Zelltiters zurückzuführen war. Die taxonomische Einordnung erfolgte über die Sequenzanalyse eines 16S rRNA-Genfragments von 905 bp Länge und ergab eine Sequenzidentität von 99 % (GenBank) bzw. 100 % (EzTaxon Server 2.1) mit der Typstammsequenz von *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup> (**Tab. 45**).

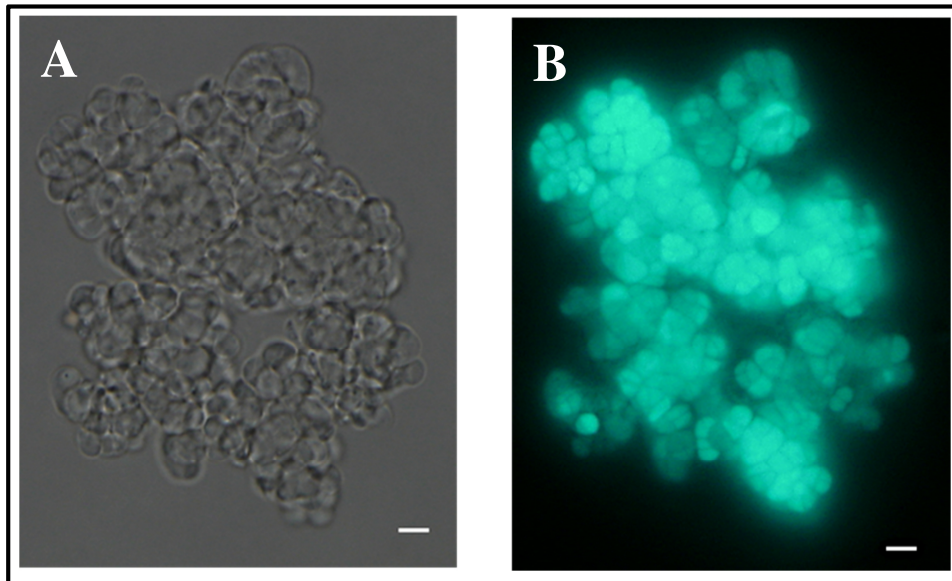


Abb. 51: Isolat *Methanosarcina mazei* NieKK bei Betrachtung im Hellfeld(A) und nach Autofluoreszenz-Anregung (B). Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Tab. 45: Charakterisierung des Isolats *Msc. mazei* NieKK.

Isolat [GenBank] <sup>1</sup>	Zellmorphologie	getestete Substrate	Identität [%] <sup>2</sup>	Fragment- länge [bp] <sup>3</sup>	Isoliert aus BGA <sup>4</sup>
NieKK [JN413085]	in Paketen organisierte, auto- fluoreszierende Kokken	Methanol, Acetat, H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , Mono- & Dimethylamin	99 <sup>a</sup> 100 <sup>b</sup>	905	②

<sup>1</sup>Angegeben ist die Zugriffsnummer der in GenBank hinterlegten 16S rRNA-Gensequenz.

<sup>2</sup>prozentuale Übereinstimmung mit *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup> nach 16S rRNA-Gensequenzabgleich mit

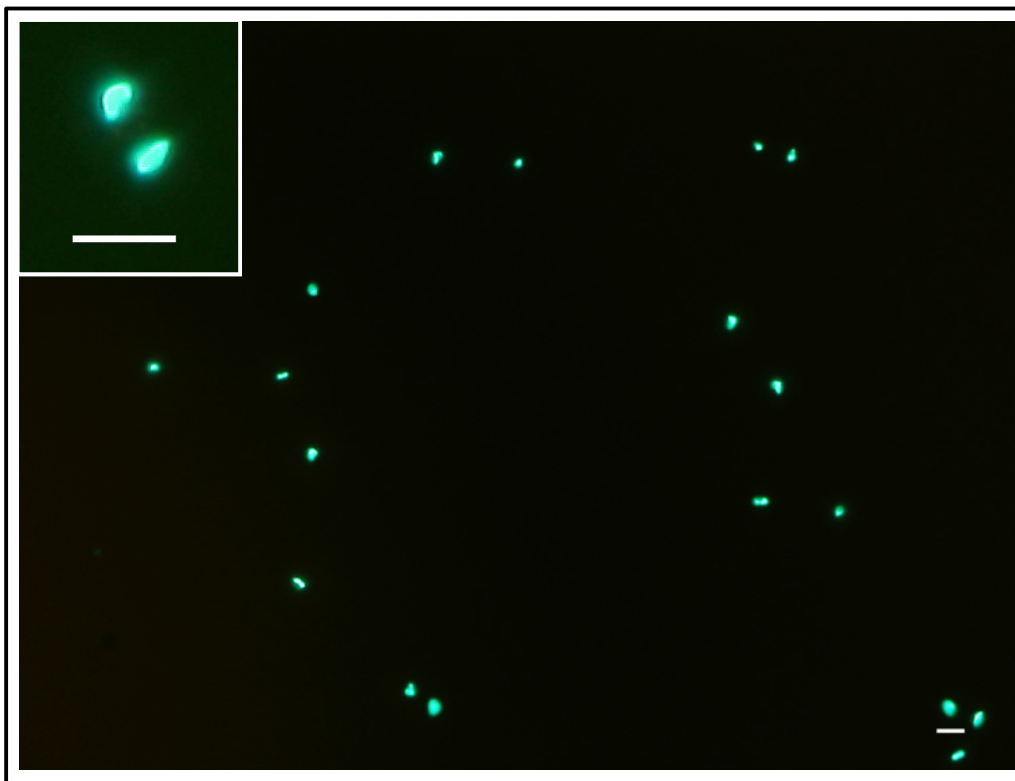
<sup>a</sup>GenBank und <sup>b</sup>EzTaxon Server 2.1.

<sup>3</sup>Länge der für Datenbankabfragen eingesetzten Sequenzinformation (von 1254 bp).

<sup>4</sup>② = BGA Niederweiler, vgl. **Tab. 13**.

### III.4.3 Isolat *Methanoculleus bourgensis* Mcu(1)

Um Mikroorganismen der Gattung *Methanoculleus* in möglichst hoher Reinheit aus Fermentersubstrat isolieren zu können und dabei insbesondere eine Ko-Kultivierung von anderen hydrogenotrophen methanogenen Archaea, wie *Mb. formicicum*, zu vermeiden, wurde eine zweiphasige Isolierungsstrategie angewandt (**Abb. 28**). Auf diese Weise konnte ausgehend von einer Anreicherungskultur, welche mit Fermentersubstrat der BGA Wallhalben beimpft wurde, das Isolat Mcu(1) gewonnen werden. Das Wachstum in den mod. Medien DSMZ287F und DSMZ287P unter H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erfolgte bei 39 °C. Auch in Batchkulturen mit hohen Zelltitern verlief das Wachstum solitär in Suspension ohne Ausformung von Zellclustern. Mikroskopische Untersuchungen der autofluoreszierenden Zellen des Isolats Mcu(1) zeigten eine unregelmäßige, kokkenähnliche Morphologie mit scharfen Abrisskanten. Die häufig oval-flächig erscheinenden Zellen von Mcu(1) wiesen einen Durchmesser von etwa 1 bis 2,5 µm auf (**Abb. 52**).



**Abb. 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Mcu. bourgensis* Mcu(1).** Charakteristisch ist die irreguläre, kokkenförmige Zellmorphologie mit scharfen Kanten. Der Bildeinschub zeigt die Nahaufnahme zweier Zellen und verdeutlicht deren oval-flächige Ausformung. Maßstab entspricht 5 µm

Aufgrund einer Sequenzidentität von 99 % (GenBank) bzw. 99,6 % (EzTaxon-e cloud) wurde das Isolat anhand einer 16S rRNA-Gensequenz von 804 bp dem Typstamm *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> zugeordnet (**Tab. 46**), welcher eine Zellmorphologie identisch zu Isolat Mcu(1) aufweist.

**Tab. 46: Charakterisierung des Isolats *Mcu. bourgensis* Mcu(1).**

Isolat [GenBank] <sup>1</sup>	Zellmorphologie	getestetes Substrat	Identität [%] <sup>2</sup>	Fragment- länge [bp] <sup>3</sup>	Isoliert aus BGA <sup>4</sup>
<b>Mcu(1)</b> [JN413087]	irregulär geformte Kokken	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	99 <sup>a</sup> 99,6 <sup>b</sup>	804	⑤

<sup>1</sup>Angegeben ist die Zugriffsnummer der in GenBank hinterlegten 16S rRNA-Gensequenz.

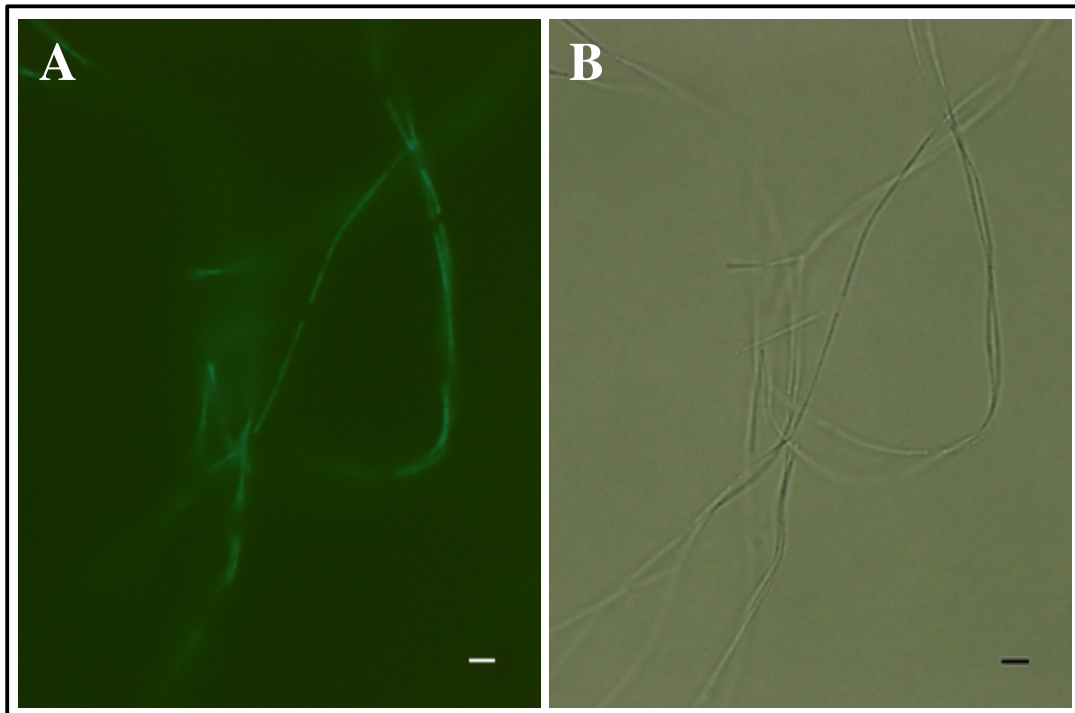
<sup>2</sup>prozentuale Übereinstimmung mit *Mcu. bourgensis* MS2<sup>1</sup> nach 16S rRNA-Gensequenz-abgleich mit <sup>a</sup>GenBank und <sup>b</sup>EzTaxon Server 2.1.

<sup>3</sup>Länge der für Datenbankanfragen eingesetzten Sequenzinformation (von 1254 bp).

<sup>4</sup>⑤ = BGA Wallhalben, vgl. **Tab. 13**.

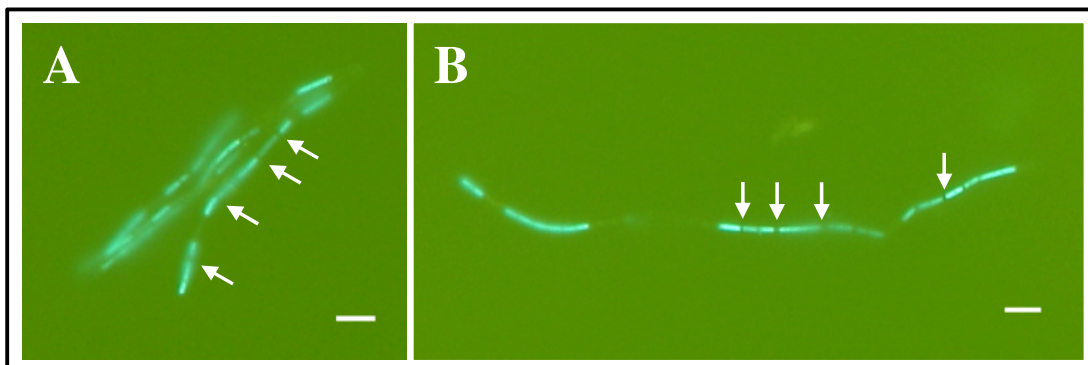
#### III.4.4 Isolat *Methanosaeta concilii* Mst1.3

Die Isolierung von Vertretern der strikt acetoklastischen Gattung *Methanosaeta* (*Mst.*) gelang erst nach Durchführung einer komplexen Isolierungsstrategie (**Abb. 27**) ausgehend von einer allgemeinen Anreicherung methanogener Archaea nach Beprobung des Fermentationsraums der BGA Arenath. Dabei wurde das Fortführen der Kulturen insbesondere durch die starke Empfindlichkeit der Zellen sowie die Notwendigkeit großer Zelltitern für das Überimpfen erschwert. Aufgrund der hohen Generationszeit von zwischen 70 und über 300 Stunden stellte Isolat Mst1.3 die einzige Kultur von *Methanosaeta* sp. in hoher Reinheit dar. Mst1.3 zeigte bei erfolgreicher Kultivierung in den mod. Medien DSMZ344 und DSMZ287P mit Acetat als C- und Energiequelle einen milchig-trüben Bodensatz in den Kultivierungsgefäßen und konnte davon ausgehend in frisches Medium überführt werden. Im Rahmen von mikroskopischen Untersuchungen des Isolats zeigten nur wenigen Zellen die typische Fluoreszenz methanogener Archaea. In diesen Fällen fiel die Signalintensität deutlich schwächer (**Abb. 53A**) aus als bei den Batchkulturen der voran genannten Eigenisolate aus den anderen Gattungen. Morphologisch ist Isolat Mst1.3 durch in dünne, fadenförmige Zellketten aus nacheinander angeordneten, stäbchenförmigen Zellen von 2 bis 5 µm Länge charakterisiert. Auffällig war die Länge dieser haarartigen, ausgedehnten Zellketten, welche ein Gesamtmaß von 100 µm überschreiten konnte (**Abb. 53B**).



**Abb. 53: Fadenförmige Organisation des Eigenisolats *Mst. concilii* Mst1.3 unter Fluoreszenzanregung (A) und Hellfeld-Betrachtung (B).** Die Signalintensität nach Anregung der Autofluoreszenz der Zellen ist deutlich geringer als diejenige anderer methanogener Archaea. Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

In Nahansicht ist bei ausreichender Fluoreszenzintensität ein kurzer Spalt zwischen aufeinander folgende Stäbchen zu beobachten, welcher diese räumlich trennt (**Abb. 54**).



**Abb. 54: Fluoreszenzaufnahmen von Zellketten stäbchenförmiger *Mst. concilii* Mst1.3 in naher räumlicher Lokalisierung (A) und als Einzelkette (B).** Pfeile weisen auf kurze Unterbrechungen zwischen aufeinanderfolgenden Stäbchen innerhalb einer Kette. Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Die Identifizierung des Isolats anhand einer 16S rRNA-Genfragmentsequenz von 443 bp Länge ergab eine Sequenzidentität von 99 % (GenBank) bzw. 99,7 % (EzTaxon-e cloud) mit derjenigen des Typstamms *Mst. concilii* GP-6<sup>T</sup> (**Tab. 47**).

**Tab. 47: Charakterisierung des Isolats *Mst. concilii* Mst1.3.**

Isolat [GenBank] <sup>1</sup>	Zellmorphologie	getestetes Substrat	Identität [%] <sup>2</sup>	Fragment- länge [bp] <sup>3</sup>	Isoliert aus BGA <sup>4</sup>
<b>Mst1.3</b> [JN413086]	Stäbchen in langen Filamenten	Acetat	99 <sup>a</sup> 99,7 <sup>b</sup>	443	A

<sup>1</sup>Angegeben ist die Zugriffsnummer der in GenBank hinterlegten 16S rRNA-Gensequenz.

<sup>2</sup>prozentuale Übereinstimmung mit *Mst. concilii* GP-6<sup>T</sup> nach 16S rRNA-Gensequenzabgleich mit <sup>a</sup>GenBank und <sup>b</sup>EzTaxon Server 2.1.

<sup>3</sup>Länge der für Datenbankanfragen eingesetzten Sequenzinformation (von 1254 bp).

<sup>4</sup>A = BGA Arenrath, vgl. **Tab. 13**.

### III.5 Molekularbiologische Untersuchungen der Isolate methanogener Archaea

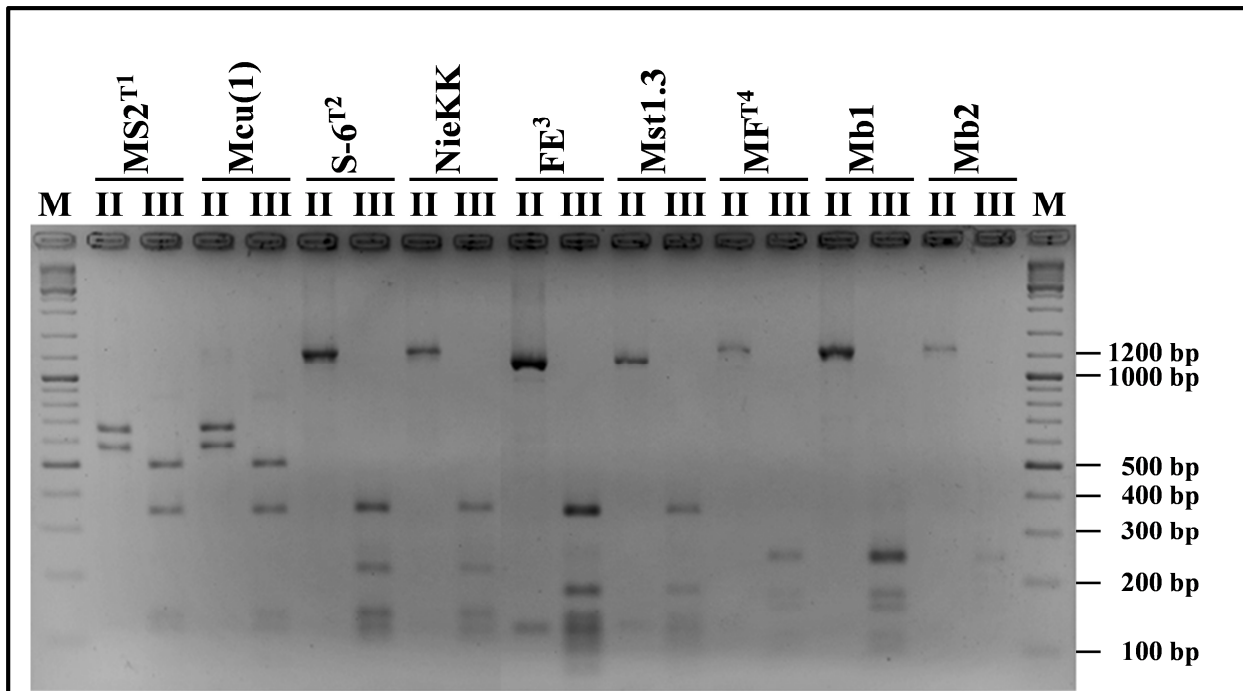
Zum Zwecke einer weitergehenden Charakterisierung der Eigenisolate methanogener Archaea aus landwirtschaftlichen NawaRo-BGA wurden diese mittels der ARDRA- und DGGE-Methoden untersucht. Dies erfolgte analog zur Vorgehensweise in Bezug auf die Untersuchungen der Biodiversität in Fermentersubstraten (**III.2** und **III.3**) und ermöglichte neben einem Direktvergleich von Eigenisolat und Fermentermikroflora eine Beurteilung des Reinheitsgrades der Isolate.

#### III.5.1 Restriktionsanalyse (ARDRA) von Isolaten methanogener Archaea

##### III.5.1.1 ARDRA unter Einsatz von *HaeII* und *HaeIII*

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde zunächst dieselbe Restriktionsendonukleasen-Kombination aus *HaeII* und *HaeIII* auf 16S rRNA-Genfragmente von 1254 bp Länge angewandt, wie sie zur Analyse des Fermentersubstrats zum Einsatz kam. Mit jedem Isolat wurde der laut Sequenzanalyse nächst verwandte (Typ-)Stamm restringiert, um die resultierenden Restriktionsmuster einander gegenüber zu stellen. In einer ersten Übersicht (**Abb. 55**) zeigten die Isolate sowohl für *HaeII* als auch für *HaeIII* stets zu denen der Vergleichsstämme identische Restriktionsmuster. Dabei ergaben sich für die Isolate *Mst. concilii* Mst1.3 und *Msc. mazei* NieKK unter Berücksichtigung der Feinauftrennungsfähigkeit der Gel-Elektrophorese die *in silico* vorhergesagten Fragmentlängen. Aufgrund der Auflösungskapazität des 2,5 % (w/v) Agarose-Gels kamen die 113 bp- und 114 bp-Fragmente bei *Mst. concilii* Mst1.3, bei *Msc. mazei* NieKK die 135 bp- und 138 bp- sowie die 120 bp- und 113 bp-Fragmente auf jeweils derselben Höhe zu liegen. Sie erschienen im Restriktionsmuster als eine einzige DNA-Bande. Leichte Abweichungen zur *in silico*-Vorhersage wiesen die *HaeIII*-Restriktionsmuster des Typstamms bzw. Eigenisolats von *Mcu. bourgensis* Mcu(1) und

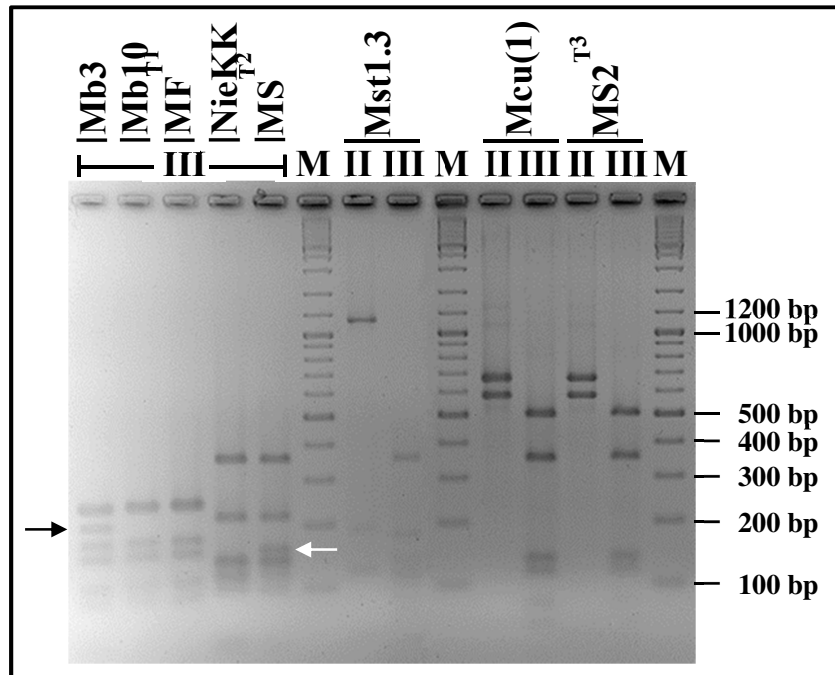




**Abb. 55: Restriktionsmuster gattungsrepräsentativer Isolate im Direktvergleich mit den zugehörigen Typstämmen.** Restriktion eines 1254 bp langen 16S rRNA-Genfragments mit *Hae*II (II) und *Hae*III (III). M = GeneRuler™ DNA-Marker. Mb1, Mb2 = *Mb. formicicum*-verwandte Isolate Mb1 bzw. Mb2, <sup>1</sup>MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, <sup>2</sup>S-6<sup>T</sup> = *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>, <sup>3</sup>FE = *Mst. concilii* FE, <sup>4</sup>MF = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>.

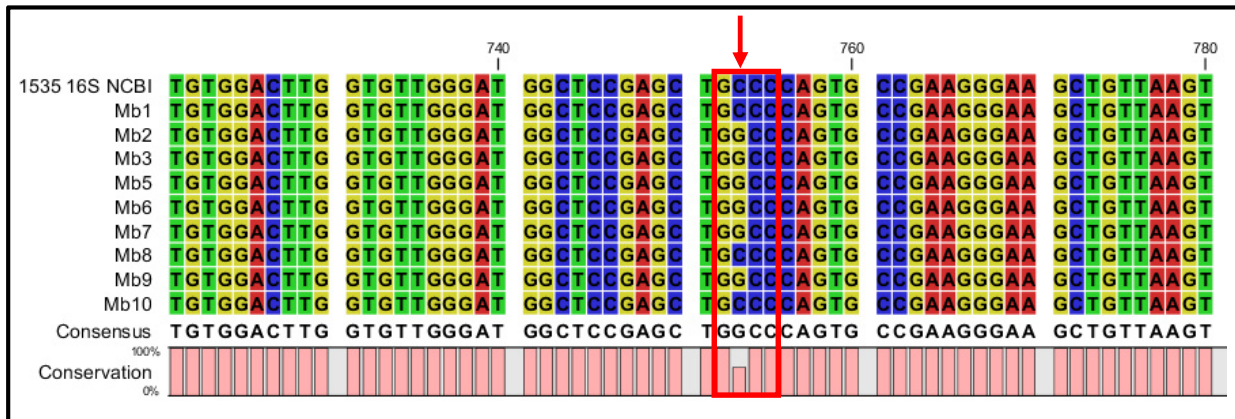
des *Mb. formicicum*-verwandten Isolats Mb1 auf. Dabei war im Fall von *Mcu. bourgensis* Mcu(1) bzw. MS2<sup>T</sup> ein Fragment zu beobachten, welches auf Höhe von 500 bp zu liegen kam. Für dieses wurde eine Länge von 556 bp vorherberechnet und sollte eine etwas kürzere Migrationsweite ähnlich zu der oberhalb positionierten Bande von 587 bp im *Hae*II-Verdau erreichen. Die zueinander identischen Restriktionsmuster der *Mb. formicicum*-verwandten Eigenisolate Mb1 und Mb2 sowie des zugehörigen Typstammes wiesen im Widerspruch zu der *in silico*-Berechnung kein Fragment von 233 bp, dafür jedoch je eine zusätzliche Bande unterhalb der 200 bp-Markerbande und knapp oberhalb der 100 bp-Markerbande auf. In einer weiteren Restriktionsanalyse wurde durch einen Direktvergleich der Restriktionsmuster zweier weiterer *Mb. formicicum*-verwandter Isolate mit dem entsprechenden Typstamm die Vorhersage weiter überprüft. Ferner erfolgte die Überprüfung auf Unterscheidungsfähigkeit der ARDRA-Methodik auf Art-Ebene durch Analyse der Muster von *Msc. mazei* NieKK und *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>. Zur Klärung der Frage nach Reproduzierbarkeit wurden des Weiteren *Mcu. bourgensis* Mcu(1) bzw. MS2<sup>T</sup> sowie *Mst. concilii* Mst1.3 erneut restringiert (**Abb. 56**). Passend zur *in silico*-Berechnung der Fragmente ergab sich bei *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup> eine zusätzliche Bande oberhalb der in beiden Arten gemeinsam vorkommenden Bande von 138 bp Länge. Die Migrationsweite dieses Fragments stimmt mit der berechneten Länge von 157 bp gut überein (**Abb. 56**, weißer Pfeil).

Trotz Identifikation als Verwandte von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> konnte bei Isolat Mb3 das Vorkommen einer 200 bp-Bande beobachtet werden (Abb. 56, →). Diese war im Restriktionsmuster von Isolat Mb10 und im Typstamm, analog zum bereits getesteten *Methanobacterium* sp. Mb1, nicht zu finden. Da die zur Laufkontrolle mitgeführten Restriktionsansätze von *Mcu. bourgensis* Mcu(1) bzw. MS2<sup>T</sup> und *Mst. concilii* Mst1.3 erneut



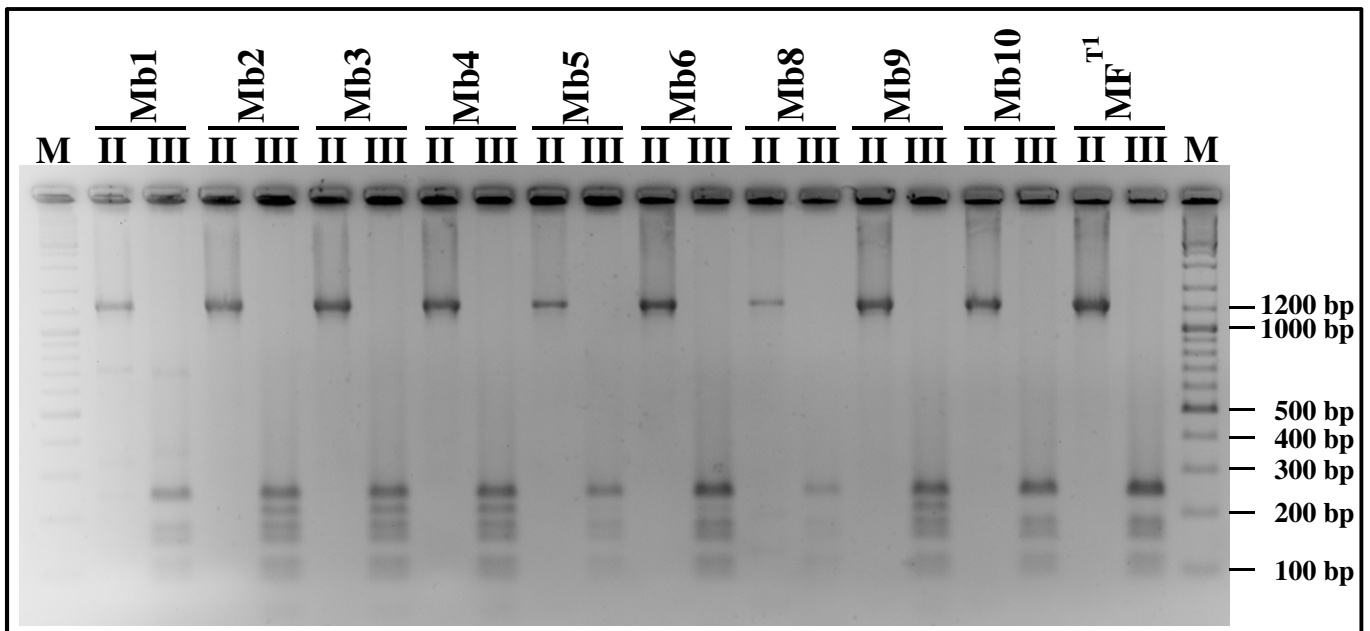
**Abb. 56: Diskriminierung methanogener Archaea auf Art-Niveau mittels ARDRA.** Unterscheidung des Isolats *Msc. mazei* NieKK von *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup> durch das Vorkommen einer zusätzlichen DNA-Bande im Restriktionsmuster von *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup> oberhalb der errechneten 138 bp-Bande (weißer Pfeil). *Methanobacterium* sp. Mb3 zeigt im Vergleich zum Typstamm und Isolat Mb10 ein zusätzliches Fragment von etwa 200 bp (→). II = *Hae*II-Restriktion, III = *Hae*III-Restriktion, M = GeneRuler<sup>TM</sup> DNA-Marker. Mb3 und Mb10 = *Mb. formicicum*-verwandte Isolate Mb3 bzw. Mb10, <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>MS<sup>T</sup> = *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>,

die bereits beschriebenen Muster ergaben, fokussierte sich ein ARDRA-Folgeexperiment auf die Analyse der Restriktionsmuster-Varianz der *Mb. formicicum*-verwandten Isolate von (III.4.1). Ein im Vorfeld durchgeführtes, multiples Alignment der 16S-rRNA-Gensequenzen zeigte nach Schnittstellenanalyse eine Punktmutation in den Leserahmen einiger Isolate. Diese bewirkte eine Transversion eines Cytosins zu einem Guanin im Typstamm sowie in den Isolaten Mb2 bis Mb7 und Mb9. Dadurch konnte eine vom Restriktionsenzym *Hae*III nicht erkannte Basensequenz (5'-GCC-3') in eine Erkennungssequenz (5'-GGCC-3') konvertiert und ein zusätzlicher Schnitt induziert werden (Abb. 57). Die Überprüfung des Sachverhalts im ARDRA-Experiment bestätigte die Verteilung des zusätzlichen 200 bp-Fragments unter



**Abb. 57: Entstehung einer *Hae*III-Erkennungsequenz durch Transversion.** C753G-Transversion (→) in Fragmenten des 16S rRNA-Gens von *Methanobacterium* sp.-Isolaten sorgt für die Bildung einer *Hae*III-Schnittstellen durch GCCC → GGCC (roter Kasten) Sequenzänderung und ging mit einem zusätzlichen Restriktionsfragment von etwa 200bp Länge in RFLP-Experimenten einher. Isolat *Methanobacterium* sp. Mb4 aufgrund zu kurzer Sequenzinformation im Alignment fehlend (Ausschnitt Alignment mit CLC Sequence Viewer 6, CLCbio, Dänemark).

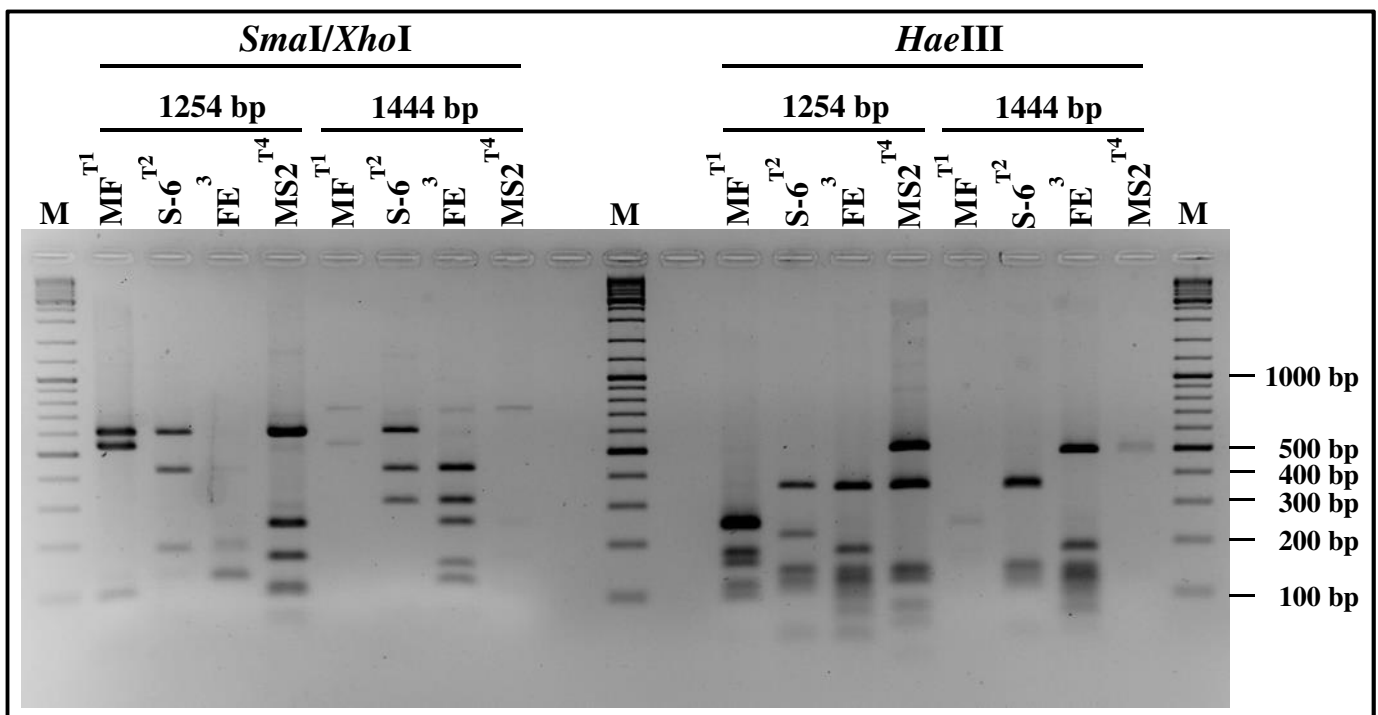
den Isolaten: Ausschließlich die Isolate Mb1, Mb8 und Mb10 wiesen das reguläre Restriktionsmuster des Typstammes ohne das 200 bp-Fragment auf (Abb. 58). Für das aufgrund mangelnder Sequenzinformation nicht in das Alignment eingefügte Isolat Mb4 konnte dagegen das Fragment nachgewiesen werden.



**Abb. 58: ARDRA-Analyse von *Mb. formicicum*-verwandten Isolaten im Direktvergleich zum Typstamm.** Isolate Mb1, Mb8 und Mb10 unterschieden sich von den übrigen Isolaten durch ein zusätzliches Restriktionsfragment von etwa 200 bp Länge. Dieses resultiert aus der Einführung einer *Hae*III-Schnittstelle durch Basentransversion. II = *Hae*II-Restriktion, III = *Hae*III, M = GeneRuler™ DNA-Marker. Mb1 bis Mb10 bezeichnen die jeweiligen *Methanobacterium* sp.-Eigenisolate, <sup>1</sup>MF = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>.

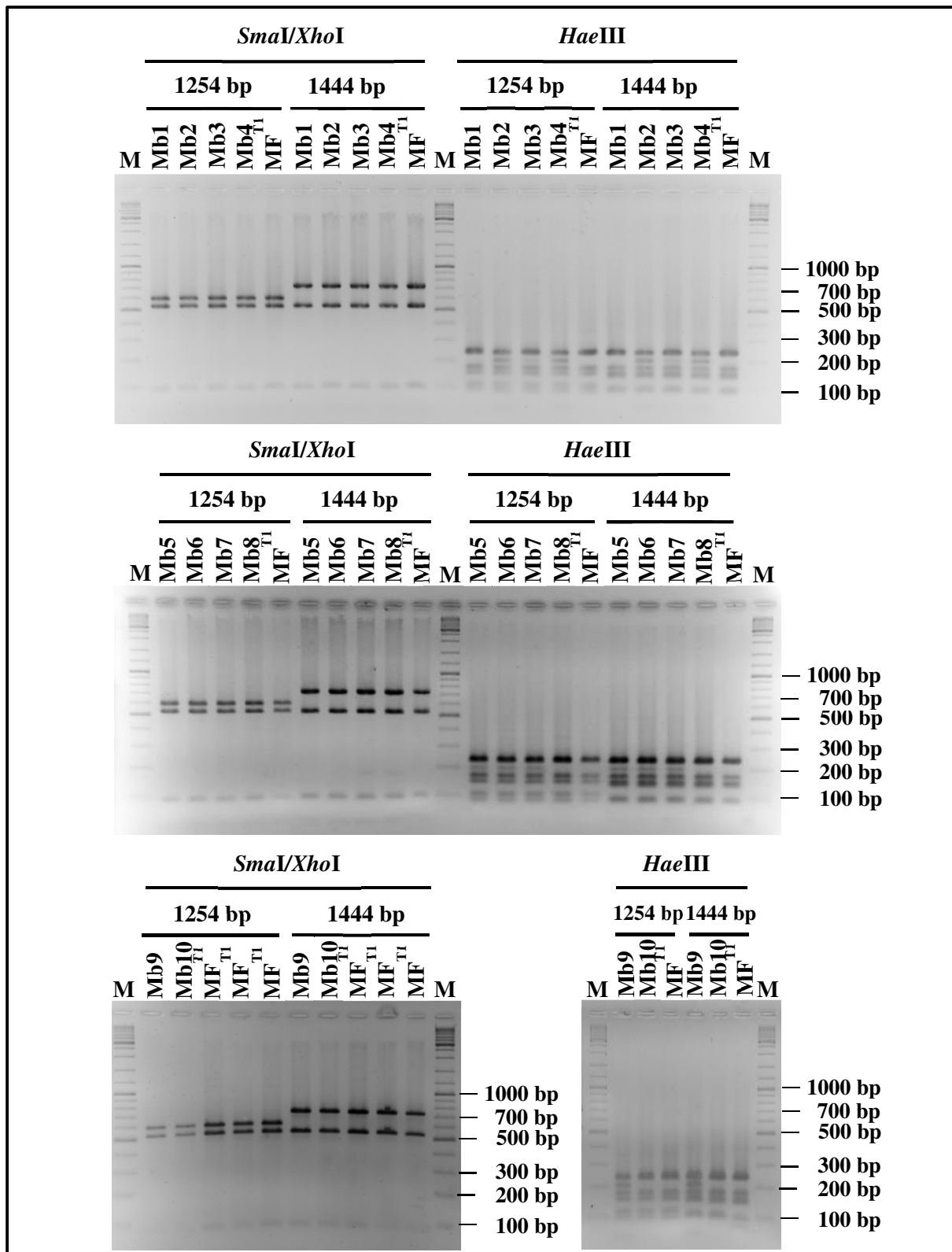
### III.5.1.2 Etablierung eines modifizierten ARDRA-Systems zur Restriktion von Isolaten methanogener Archaea

Mit dem bislang beschriebenen ARDRA-System aus den Restriktionsendonukleasen *HaeII* und *HaeIII* ergaben sich häufig dicht gestaffelte Restriktionsfragmente mit einer Länge von weniger als 300 bp. Um diesem Problem zu begegnen und gleichzeitig weiterhin eine Unterscheidung methanogener Archaea über ein resultierendes Muster zu gewährleisten wurden die Restriktionsbedingungen angepasst. Aufgrund ihrer Hauptfunktion zur Unterscheidung von Mikroorganismen der Gattung *Methanoculleus* von anderen in BGA vorkommenden methanogenen Archaea wurde *HaeII* zugunsten einer breiteren Differenzierungsfähigkeit gegen eine Doppelverdau-Kombination aus *SmaI/XhoI* ersetzt. Die parallele Restriktion mittels *HaeIII* verblieb. Durch Ersetzen des revers-Primers Met1340r gegen den revers-Primer AR1530R gelang die Verlängerung des 16S-rRNA-Genamplikats um 190 bp auf 1444 bp. Zur experimentellen Überprüfung der Modifikationen wurden die 1254 bp- und 1444 bp-Fragmente der vier gattungsrepräsentativen Typstämme sowohl mit *SmaI/XhoI* als auch mit *HaeIII* restringiert (Abb. 59). Dabei ergaben sich für alle getesteten Gattungsvertreter distinkte Restriktionsmuster bei Durchführung des Doppelverdaus. Die Verlänger-



**Abb. 59: Differenzierung gattungsrepräsentativer Typstämme mittels des modifizierten ARDRA-Systems.** Vergleich der Restriktionsmuster zweier verschiedener Fragmentgrößen im *SmaI/XhoI* und *HaeIII*-Verdau. M = GeneRuler™ DNA-Marker. <sup>1</sup>MF = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>S-6T = *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>, <sup>3</sup>FE = *Mst. concilii* FE, <sup>4</sup>MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>.

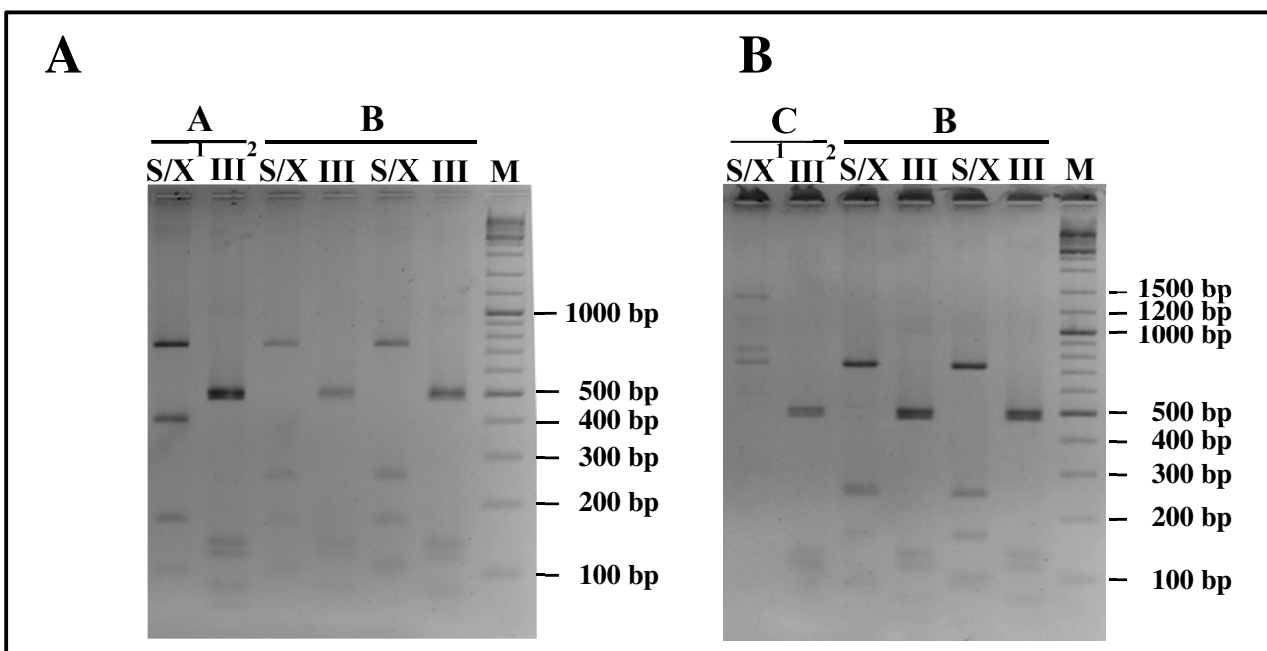
ung des Fragments führte in diesem Zusammenhang zusätzlich zu der Verteilung der Fragmente über eine Längenspanne von 100 bp - 800 bp zu einer Entspannung der Staffelung kleinerer und der Entstehung längerer Fragmente. Für *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> war eine abschließende Beurteilung des Größeneffekts auf das Restriktionsmuster aufgrund dessen schwacher Ausprägung nicht möglich. Für diesen Organismus konnte jedoch im Doppelverdau eine charakteristische DNA-Bande bei etwa 750 bp (1444 bp-Fragment) bzw. 600 bp (1254 bp) beobachtet werden. Die Verlängerung des zu restringierenden Fragments führte im Rahmen des *HaeIII*-Verdaus bei *Mst. concilii* FE zu einer prominenten Verlagerung des oberen Hauptfragments von < 400 bp auf 500 bp, während in den übrigen Fällen keine signifikante Spreitung der Bandenstaffelung kleiner Fragmente im Muster erreicht wurde. *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> zeigte im *SmaI/XhoI*-Verdau des langen Amplifikats im Vergleich zur Restriktion des 1254 bp-Fragments eine deutlich bessere Auftrennung und klar unterscheidbare Migrationsweite der beiden Fragmente oberhalb von 500 bp. Dabei kam die obere DNA-Bande zwischen den 700 bp- und 800 bp- Markerbanden zu liegen und löste so die bei Restriktion des 1254 bp-Fragmentes enge Staffelung der beiden Fragmente um etwa 600 bp im Verdau des verlängerten Fragmentes auf. Zur Klärung der Frage, ob auch im Doppelverdau der aus dem *HaeIII*-Verdau bekannte Restriktionsmuster-Dimorphismus (**Abb. 58**) der *Methanobacterium* sp.-Isolate auftritt, wurde eine vergleichende ARDRA sowohl unter den modifizierten als auch unter unmodifizierten Bedingungen (unter Verwendung von *HaeII*) durchgeführt (**Abb. 60**). Hier entstanden bei Anwendung des Doppelverdaus mit *SmaI/XhoI* auf die 16S rRNA-Genfragmente der Eigenisolate *Methanobacterium* sp. Mb1 bis Mb10 bei beiden Fragmentlängen identische Muster wie im Falle der entsprechenden Restriktion des Typstamms. Die bessere Differenzierung der Restriktionsmusterbanden durch Verlängerung des oberen Restriktionsfragments konnte, wie bereits im Vortest zur Gattungsdifferenzierung (**Abb. 59**), hier erneut reproduziert werden. Da keine weiteren Unterschiede zur Restriktion des 1254 bp-Fragments auftraten, liegt hier eine direkte Übertragung der Fragmentverlängerung von 190 bp auf das obere Restriktionsfragments nahe. Ein Dimorphismus des Restriktionsmusters, wie er bei Anwendung des *HaeIII*-Einfachverdaus erneut bei den Eigenisolaten auftrat, war im Doppelverdau nicht festzustellen. Im Gegensatz zu diesem zeigte sich im *HaeIII*-Verdau des Weiteren keine Veränderung in den Restriktionsmustern des 1254 bp bzw. 1444 bp langen 16S rRNA-Genfragmentes. Dadurch ergab sich auch bei verlängertem Fragment erneut der für die Isolate beschriebene Restriktionsmuster-Dimorphismus in identischer Form.



**Abb. 60:** Vergleichende ARDRA von 1254 bp- und 1444 bp-16S rRNA-Genfragmenten aus *Mb. formicum*-Eigenisolaten und aus dem Typstamm *Mb. formicum* MF<sup>T</sup>. Gegenüberstellung der Restriktionsmuster nach Durchführung eines *SmaI/XhoI*- bzw. *HaeIII*-Verdau. Während im *HaeIII*-Verdau der bereits gezeigte Musterdimorphismus auch im 1444 bp-Fragment reproduziert werden konnte, zeigten im Doppelverdau alle Restriktionsmuster Uniformität. Mb1 bis Mb10 = *Mb. formicum*-verwandte Isolate Mb1 bis Mb10, <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = Typstamm *Mb. formicum* MF<sup>T</sup>; M = GeneRuler™ DNA-Marker.

### III.5.1.3 Anwendung des modifizierten ARDRA-Systems zur Auswertung von Klonbibliotheken methanogener Archaea aus BGA

Da mit dem modifizierten ARDRA-System eine Differenzierung verschiedener Gattungen methanogener Archaea gezeigt wurde, folgte in einem zweiten Schritt die experimentelle Prüfung auf Eignung zur Anwendung auf Fermenter-DNA-Extrakte. Dafür wurde analog zu III.2 eine Klonbibliothek mit dem 1444 bp 16S rRNA-Genfragment aus Fermenterproben der BGA Obere Blies erstellt. Die Auswertung von 50 Klonen erfolgte anschließend über Restriktionsmustervergleich mittels des ARDRA-Systems aus *XhoI/SmaI* und *HaeIII* mit nachfolgender Mustergruppen-Sequenzierung. Insgesamt konnten drei Mustergruppen voneinander unterschieden werden, wobei mit 47 von 50 Klonen ein Großteil das Restriktions-



**Abb. 61: Restriktionsfragment-Mustergruppen nach modifizierter ARDRA-Auswertung der Klonbibliothek des BGA- Fermenters Obere Blies.** Vergleich der Mustergruppen A (A) und C (B) mit der dominanten Mustergruppe B. <sup>1</sup>Restriktion mit der Endonukleasen-Kombination *SmaI/XhoI*; <sup>2</sup>Restriktion mit *HaeIII*; M = GeneRuler™ DNA-Marker.

muster „B“ aufwies. Ein Klon zeigte Muster „A“ während Gruppe „C“ durch zwei Klone gebildet wurde (Abb. 61). Während die Restriktion mit *HaeIII* ein identisches Muster bei allen drei Gruppen erzeugte, konnte durch den Doppelverdau leichte Abweichungen verzeichnet werden. Zur Verifizierung dieser Gruppeneinteilung wurden die Fragmente von Mustergruppen-Repräsentanten sequenziert und mit der Datenbank von EzTaxon cloud abgeglichen (Tab. 48). Alle drei Gruppen waren danach der Gattung *Methanoculleus* zuzuordnen, auf Art-Ebene ergaben sich jedoch Unterschiede. Mit einer Sequenzidentität von 98,46 % mit dem Typstamm wurde der die dominante Gruppe „B“ vertretende Klon der Art *Mcu. bourgensis* zugewiesen. Der Klon welcher Gruppe „A“ ausmachte und im Restriktions-

muster ein charakteristisches Fragment auf Höhe von 400 bp zeigte, konnte mit einer Übereinstimmung von 99,76 % der Art *Mcu. receptaculi* zugewiesen werden. Die zwei nächsten, signifikanten Übereinstimmungen ergaben sich mit den Typstämmen von *Mcu. palmolei* (97,47 %) und *Mcu. bourgensis* (97,39 %). Der durch eine Fragment-Doppelbande um 800 bp und ein solitäres Fragment unterhalb der 1500 bp-Marke charakterisierte Repräsentant der Gruppe „C“ wies eine Übereinstimmung von 98,12 % mit *Mcu. marisnigri* JR-1<sup>T</sup> auf und konnte ferner mit *Mcu. submarinus* (97,96 %) und *Mcu. bourgensis* (91,82 %) sowie mit abnehmender Identität weiteren Arten signifikant zugeordnet werden. Im Vergleich zum einfachen *Hae*III-Verdau erlaubte die Kombination mit dem Doppelverdau damit eine genauere Differenzierung und Abgrenzung der Restriktionsmuster voneinander.

**Tab. 48: Direkte Identifikation methanogener Archaea aus BGA Obere Blies mittels modifizierter ARDRA-Methodik.**

Muster	Nächster verwandter (Typ-)Stamm <sup>1</sup>	Identität [%] <sup>2</sup>	Fragmentlänge [bp] <sup>3</sup>	Anzahl Klone/Umfang Klonbibliothek [%]
A	<i>Mcu. receptaculi</i> ZC-2 <sup>T</sup>	99,76	1264	1/50 [2]
B	<i>Mcu. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>	98,28	1271	47/50 [94]
C	<i>Mcu. marisnigri</i> JR1 <sup>T</sup>	98,12	1276	2/50 [4]

<sup>1</sup>nach Analyse der 16S rRNA-Genfragmentsequenz und Datenbank EzTaxon cloud

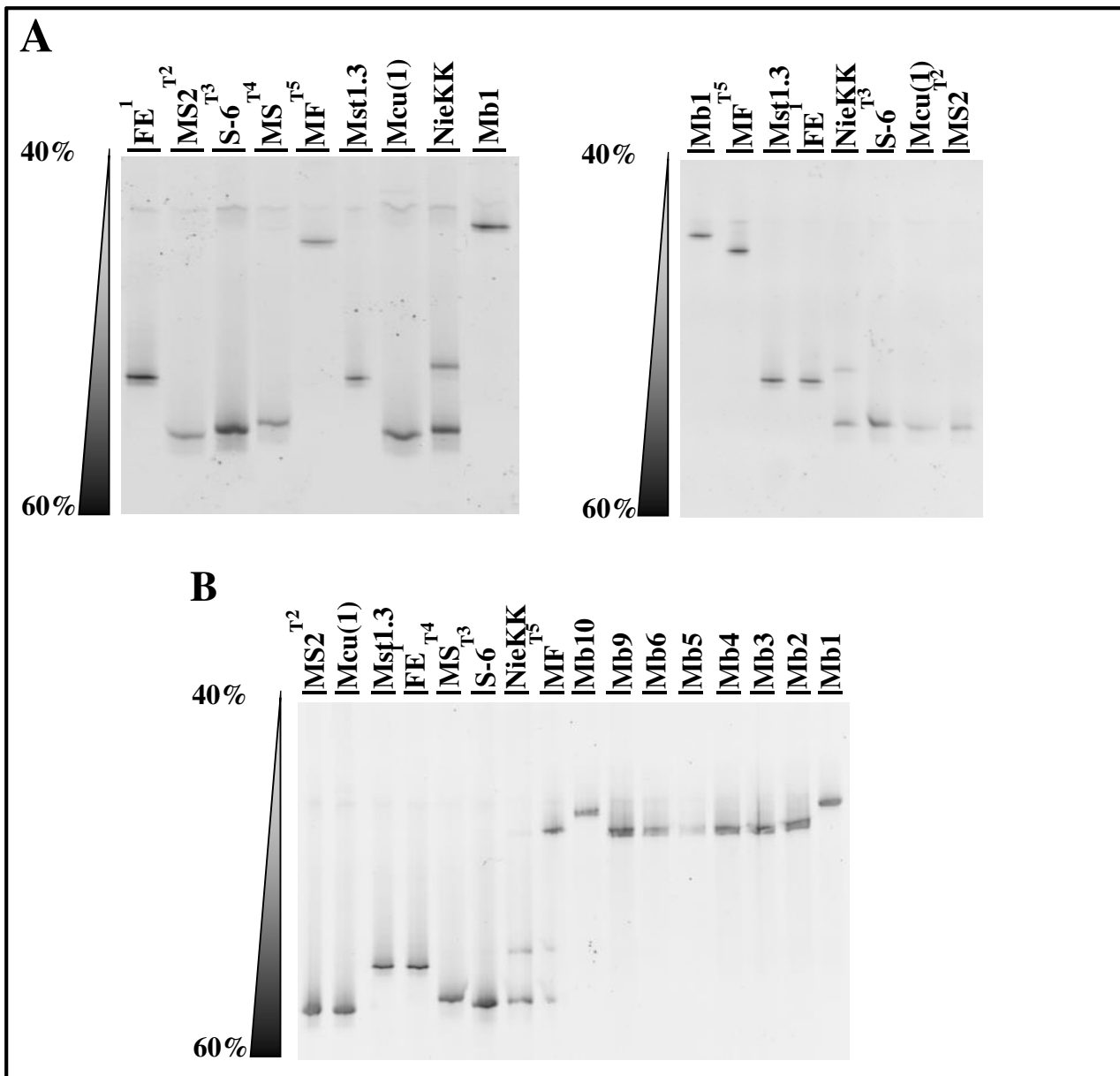
<sup>2</sup>prozentuale Sequenzidentität des analysierten 16S rRNA-Genfragments mit dem des angegebenen Stamms

<sup>3</sup>Länge des mit der *in silico*-Datenbank (Ez Taxon-e) abgeglichenen Fragments

### III.5.2 Analyse von Isolaten methanogener Archaea mittels DGGE

Eine DGGE-Analyse der Isolate methanogener Archaea im Direktvergleich mit den laut Sequenzbestimmung zugehörigen Typstämmen in einem Chemogradienten von 40 % ↘ 60 % ergab jeweils identische Migrationsweiten für die aufgetragenen Stämme bzw. Isolate von *Mst. concilii*, *Msc. mazei* und *Mcu. bourgensis*. Die DNA-Banden staffelten sich dabei im mittleren Drittel des Gradienten und ermöglichten die Differenzierung voneinander anhand der Position im Gel. Die größte Migrationsweite erreichten *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> bzw. Mcu(1), die kürzeste wurde für das Isolat *Methanobacterium* sp. Mb1 beobachtet (**Abb. 62**). Mit Ausnahme der für das Eigenisolat *Msc. mazei* NieKK bekannten Doppelbande traten keine Mischmuster auf. Innerhalb der Gattung *Methanosarcina* war unter den gegebenen Bedingungen eine Unterscheidung von *Msc. mazei* von *Msc. barkeri* möglich, da Letzterer

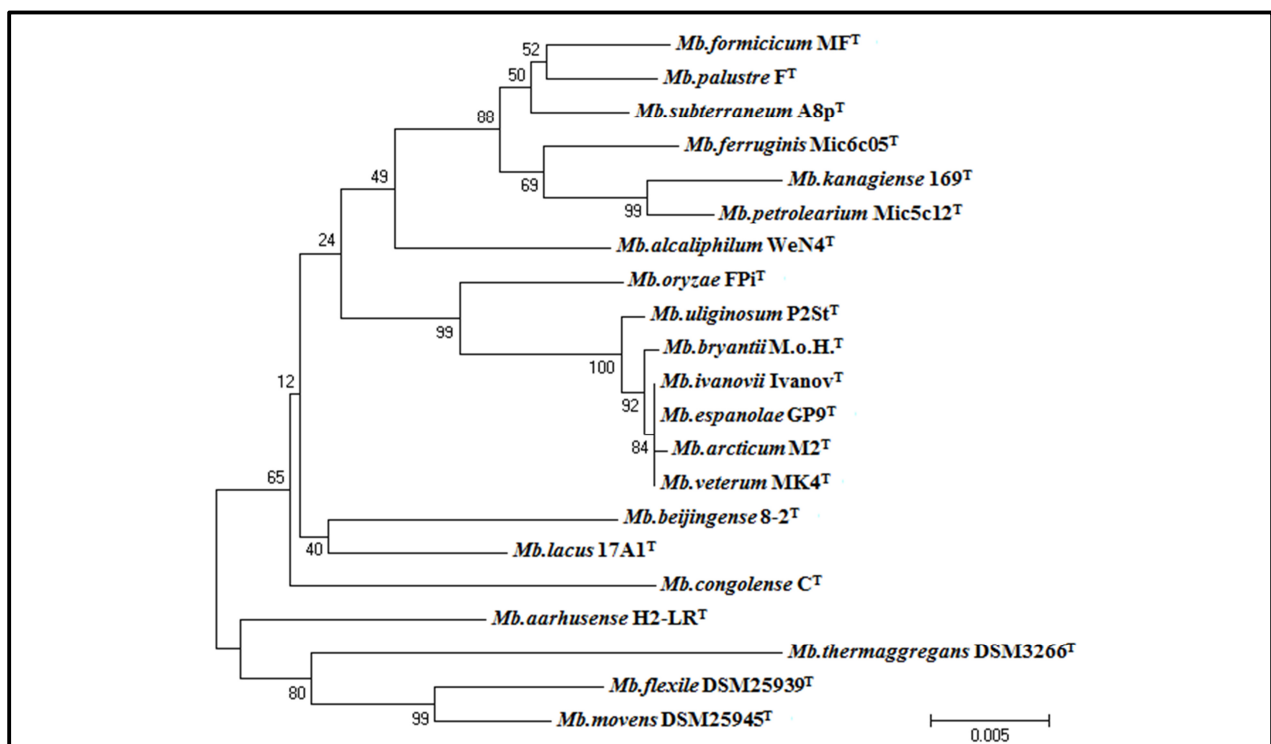




**Abb. 62: Molekulare Charakterisierung methanogener Isolate durch DGGE.** A) Überblick über die Migration von 16S rRNA-Genfragmenten von Isolat in direktem Vergleich zu den entsprechenden Typstämmen. Ausschnitt aus Chemogradient 40 %  $\nabla$  60 %. B) Bandenpositionen ausgewählter Isolate aus vier Gattungen methanogener Archaea mit Fokus auf der Gattung *Methanobacterium*. Ausschnitt aus Chemogradient 40 %  $\nabla$  60 %. Mb1, Mb2, Mb3, Mb4, Mb5, Mb6, Mb9 und Mb10 bezeichnen die jeweiligen *Mb. formicicum*-verwandten Isolate, <sup>1</sup>FE = *Mst. concilii* FE; <sup>2</sup>MS<sup>T</sup> = Typstamm *Mcu. bourgensis* MS<sup>T</sup>; <sup>3</sup>S-6<sup>T</sup> = Typstamm *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>; <sup>4</sup>MS<sup>T</sup> = Typstamm *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>; <sup>5</sup>MF<sup>T</sup> = Typstamm *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>.

gegenüber *Msc. mazei* eine verkürzte Migrationsweite aufwies. Damit konnte diesbezüglich eine im Rahmen von Fermenteranalysen durchgeführte DGGE mit aufgetragenen Vergleichsstämmen im Chemogradient 45 %  $\nabla$  60 % (Abb. 47) reproduziert werden. Für das Isolat *Methanobacterium* sp. Mb1 konnte, entgegen des Sachverhalts bei den Vertretern der übrigen Gattungen, wiederholt eine Migrationsweitendifferenz zum Typstamm gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere DGGE-Analyse mit Fokus auf die verschiedenen *Mb. formicicum*-verwandten Eigenisolate durchgeführt. Als Positivkontrollen wurde die Typstamm-Eigenisolat Paarung der drei übrigen Gattungen mitgeführt. Erneut ergab sich die

Zweiteilung in Bezug auf die Migrationsweite von *Methanobacterium* sp. im Vergleich zu den tiefer im Gradient lokalisierten Vertretern der übrigen Gattungen (Abb. 62B). Innerhalb der aufgetragenen zeigten insbesondere die Isolate Mb1 und Mb10 eine leichte Abweichung vom Wanderungsverhalten des Typstammes *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Beide Isolate kamen auf nahezu identischer Höhe zu liegen, jedoch oberhalb aller anderen Isolate und des Typstammes. Die Isolate Mb2, Mb3, Mb4, Mb5, Mb6 und Mb9 waren auf einer identischen Höhe knapp unterhalb derjenigen des Typstammes positioniert. Die Lokalisation der Positivkontrollen fand in der bereits bekannten Anordnung statt, sodass von einem korrekten Lauf ausgegangen werden konnte. Um eine genauere Zuordnung der Isolate, welche vom *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Typstamm abweichende Migrationsweiten zeigten, vornehmen zu können, wurden vergleichende DGGE-Analysen mit Referenzstämmen verschiedener verwandter *Methanobacterium* sp.-Arten durchgeführt. Zur Auswahl geeigneter Vergleichsstämme wurde ein auf dem 16S rRNA-Gen basierender Stammbaum der kommerziell erhältlichen Referenzorganismen erstellt. Als mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> nah verwandte Organismen stellten sich insbesondere die Arten *Mb. palustre* F<sup>T</sup>, *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, *Mb. ferruginis* Mic6c05<sup>T</sup>, *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup> und *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> heraus (Abb. 63).



**Abb. 63: Phylogenie der Gattung *Methanobacterium* nach 16S rRNA-Genanalyse.** Stammbaum erstellt durch die Neighbor-Joining-Methode nach Saitou und Nei, 1987. Die prozentualen Ergebnisse der Bootstrap-Analyse aus 1000 Wiederholungen (Felsenstein, 1985) sind über den Ästen angegeben. Evolutionäre Distanzen wurden unter Verwendung der Maximum Composite Likelihood-Methode (Tamura *et al.*, 2004) mit der Software MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Alle Positionen, in denen weniger als 50% aller 21 16S rRNA-Gensequenzen von 1255 bp Länge ein Nukleotid enthielten, wurden zuvor aus dem zugrunde liegenden Alignment entfernt.

Ferner wurden die in der Sequenzanalyse auf dem zu diesen Arten benachbarten Ast im Stammbaum positionierten Arten *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> und *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup> sowie die entfernter verwandte Art *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> für den Eingang in diese DGGE-Analyse selektiert. Die Auftrennung erfolgte zunächst in einem Chemogradienten von 45 %  $\blacktriangledown$  55 %, um unter Gewährleistung einer geeigneten Auftrennung der *Methanobacterium* sp.-Arten auch die komplette Migration der als Positionsreferenz dienenden DNA-Bande von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> erfassen zu können. Im durchgeführten Lauf (**Abb. 64A**) lagen alle detektierten DNA-Banden nahe beieinander, der aus anderen DGGE-Analysen (**Abb. 62**) bekannte Abstand zwischen den *Methanobacterium* sp.-Banden und derjenigen der Positionskontrolle *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> war deutlich geringer. Dadurch migrierte die Positionskontrolle nur knapp unterhalb der tiefsten *Methanobacterium* sp.-Banden. Trotz dieser geringen Auftrennung ergab sich wiederholt eine identische Migrationsweite der *Mb. formicicum*-verwandten Isolate Mb1 und Mb10 oberhalb von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Unterhalb davon positionierte sich das Isolat Mb7, analog zu den Isolaten Mb2 bis Mb6 und Mb9 im vorangegangenen Lauf. Mit Ausnahme von *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> wiesen alle übrigen Arten ein mit Isolat Mb7 vergleichbares Migrationsverhalten im Gradienten auf. Aufgrund identischer Höhen war eine Unterscheidung der Arten *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, *Mb. palustre* F<sup>T</sup>, *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> und *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup> nicht möglich. *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> und *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup> migrierten auf identischer Höhe, jedoch leicht unterhalb der zuvor genannten Arten. Eine identische Migrationsweite mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> wies dagegen das Isolat Mb8 auf. *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> zeigte die kürzeste Migrationsweite aller aufgetragenen Proben. Die Verschiebung des Gradienten auf 40 %  $\blacktriangledown$  50 % bei Erhöhung der Spannung auf 90 V ergab im Wesentlichen dieselben relativen Migrationverhältnisse wie im zuvor beschriebenen Lauf (**Abb. 64B**). Die Proben legten in diesem Fall fast die komplette Gellänge zurück und separierten klarer voneinander, sodass als optimale Trennungskonzentration für 16S rRNA Genfragmente der Gattung *Methanobacterium* ein enger Bereich um 50 % denaturierender Agenzien festgestellt werden konnte. Das in diesem Lauf mitgeführte Isolat Mb9 zeigte eine identische Migrationsweite zu Isolat Mb8 und *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. In diesem Gradienten konnte *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> von den auf gleicher Höher verbleibenden *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, *Mb. palustre* F<sup>T</sup> und *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup> differenziert werden.

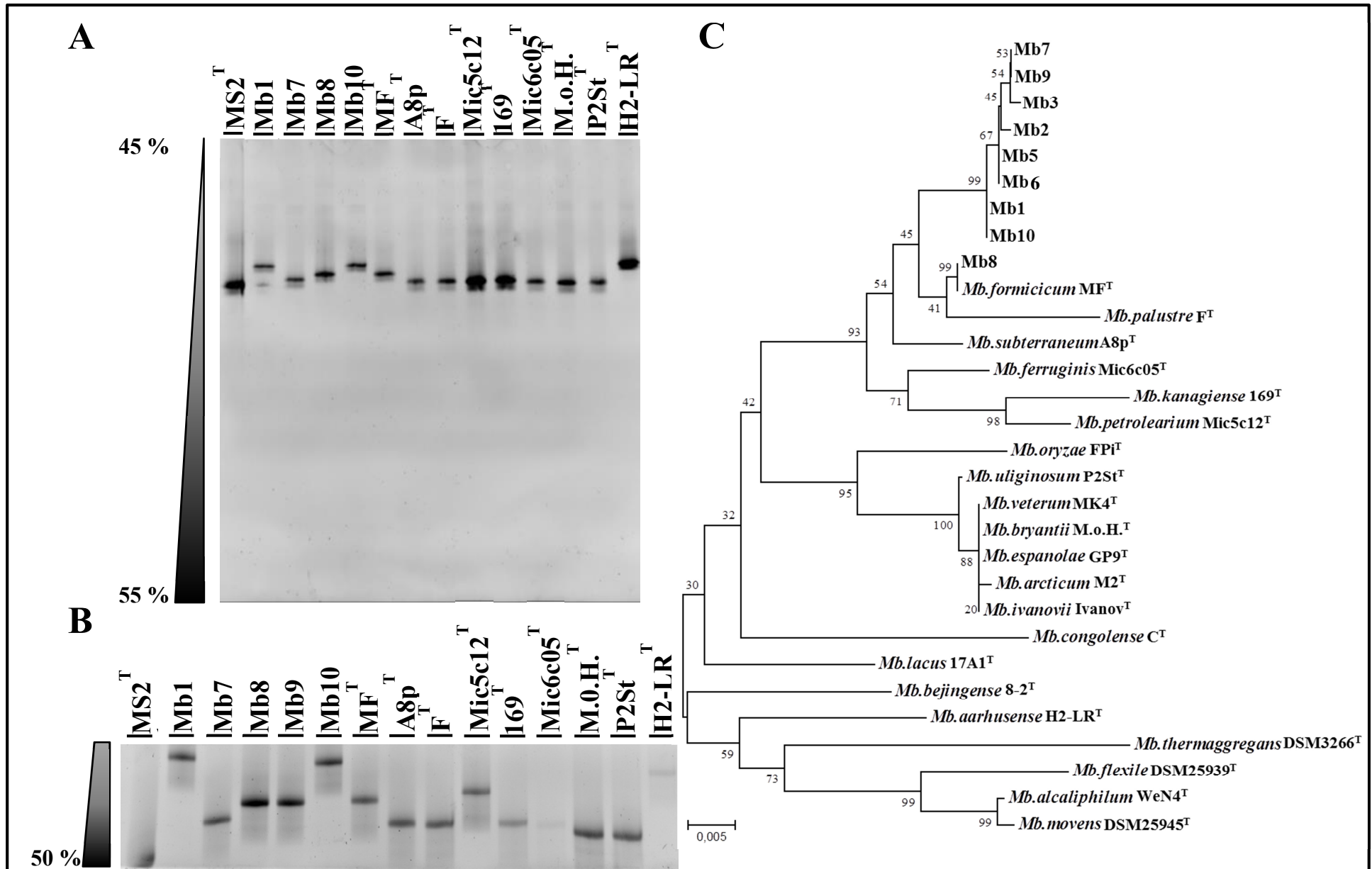


Abb. 64: 16S rRNA-Gen-basierte, komparative DGGE und phylogenetische Einordnung von *Methanobacterium* sp.-Referenzstämmen und Isolaten aus BGA. Typstämme ausgewählter Vertreter der Gattung wurden mit den Isolaten Mb1, Mb10, Mb7, Mb8, Mb9 und Mb10 in Chemogradienten von 45 %  $\blacktriangledown$  55 % (A) und 40 %  $\blacktriangledown$  50% (B, Ausschnitt) per DGGE verglichen. Neighbor-Joining Stammbaum eines 897 bp-Fragments vom 16S rRNA-Gen (C), übrige Parameter analog zu Abb. 63. <sup>1</sup>MS2<sup>T</sup> = Kontrolle *Mcu. bourgenensis* MS2<sup>T</sup>

Um einen Vergleich der DGGE-Ergebnisse mit phylogenetischen Analysen auch in Bezug auf die Eigenisolate zu ermöglichen, wurde die Stammbaumanalyse um deren 16S rRNA-Sequenzfragmente erweitert. Aufgrund geringerer Sequenzinformation war eine Reduzierung des zugrundeliegenden Fragments auf eine Länge von 897 bp nötig. Das Eigenisolat Mb4 mit einer Sequenzinformation von 354 bp wurde zur Vermeidung eines Präzisionsverlusts von der Stammbaumanalyse ausgenommen. Die Anordnung der Referenzstämme verblieb mit Ausnahme von *Mb. alcaliphilum* WeN4<sup>T</sup> und *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> weitgehend identisch zu der auf einem 1255 bp langen Fragment beruhenden Kalkulation der Referenzstämme (**Abb. 64C**). *Mb. alcaliphilum* WeN4<sup>T</sup> bildet unter diesem Analyseparametern keinen eigenständigen Ast mehr aus, sondern kommt in einer Abzweigung mit *Mb. movens* DSM25945<sup>T</sup> zu liegen. *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> war keiner starken phylogenetischen Umklassifizierung unterworfen und teilte sich den Ast mit *Mb. veterum* MK4<sup>T</sup> und *Mb. espanolae* GP9<sup>T</sup>. Alle Eigenisolate wurden in unmittelbarer Nähe zu den Arten *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und *Mb. palustre* F<sup>T</sup> eingeordnet. Mit Ausnahme von Mb8 kamen alle übrigen Isolate auf einem Ast zu liegen. Hier ergaben sich drei Gruppierungen, welche von Mb1 und Mb10, Mb5 und Mb6, sowie Mb3, Mb7 und Mb9 gebildet wurden. Mb1 und Mb10 wiesen auch in den DGGE-Analysen vergleichbare Migrationsweiten knapp oberhalb von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> auf und stimmen in dieser Hinsicht mit der Stammbaumanalyse überein. Die identische Migrationsweite dieses Typstammes mit der des Eigenisolats Mb8 findet ihre Entsprechung durch die nahe Positionierung beider Arten auch in der Stammbaumanalyse. Isolat Mb9 mit identischer Laufweite zu Mb8, wurde jedoch im Stammbaum in einem entfernteren Ast positioniert. Das als phylogenetisch am weitesten von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> entfernte Isolat Mb7 zeigte auch in der DGGE-Analyse eine deutlich unterschiedliche Migrationsweite sowohl zum Typstamm, als auch zu den mitgeführten Referenzstämmen. Die Bildung einer eigenen Gruppe in Abgrenzung zu den Referenzstämmen findet sich auch in den Migrationsweiten der DGGE wieder. Zusammenfassend konnte eine artspezifische Differenzierung in den DGGE-Läufen nur zum Teil erreicht werden. Gruppenspezifische Unterschiede konnten jedoch im Vergleich mit der Stammbaumanalyse nachvollzogen werden: Eine Auftrennung von Organismen auf verschiedenen Ästen des *in silico*-Stammbaums war aufgrund unterschiedlicher Migrationsweiten der repräsentativen Typstämme im DGGE-Gel möglich. Die Anordnung der phylogenetischen Gruppen innerhalb der Gattung *Methanobacterium* konnte somit in der DGGE nachvollzogen werden. Vor diesem Hintergrund deutet die Reproduzierbarkeit der Migrationsweiten der Isolate im Vergleich mit derjenigen von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> auf eine von der reinen 16S rRNA-

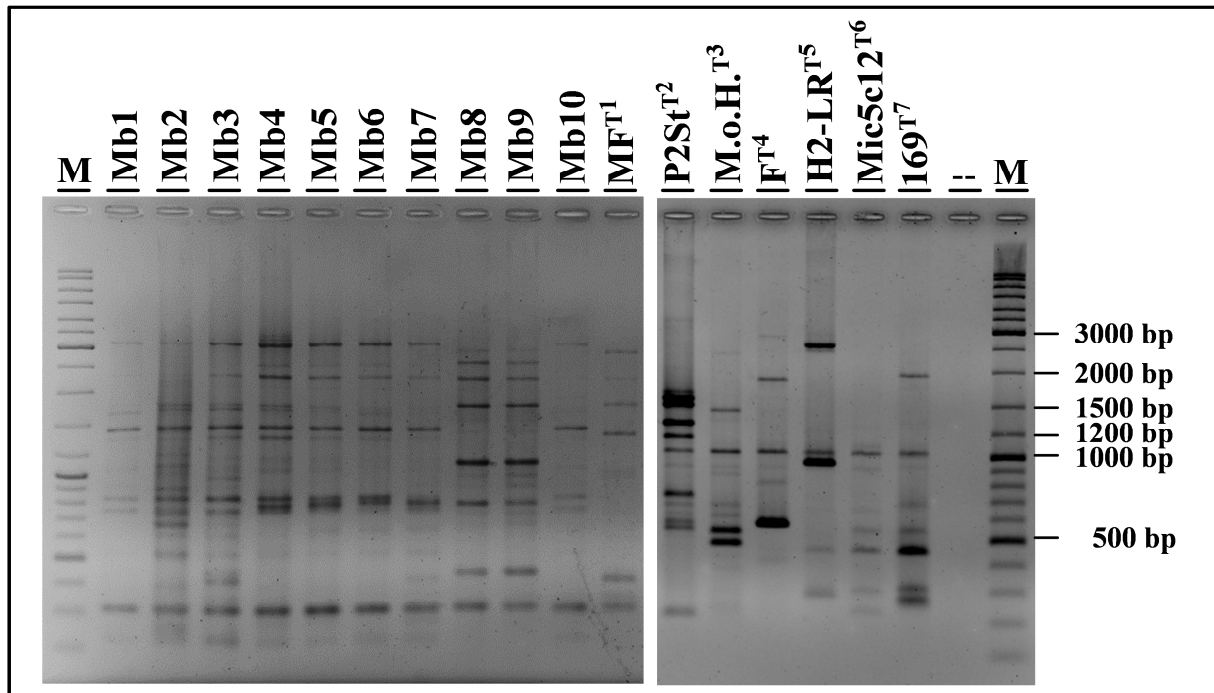
Genanalyse abweichende Einordnung hin. Für das Isolat Mb8 stimmten dagegen DGGE-Lauf und die sequenzbasierte Zuordnung zu *Mb. formicicum* überein.

### **III.5.3 Specifically amplified polymorphic DNA-Technik (SAPD) zur Gesamtgenom-Fingerabdruckanalyse von *Methanobacterium* sp.-Isolaten**

Isolate der Gattung *Methanobacterium* wurden zusammen mit ausgewählten Referenzstämmen in SAPD-Analysen untersucht und verglichen. Besonderes Augenmerk wurde auf das Vorkommen geeigneter isolatspezifischer Fragmente für den Einsatz in einem PCR-basierten Nachweissystem (III.5.4) und das Zusammenfassen von Isolaten zu Gruppen gleicher oder ähnlicher Muster gelegt. Dazu wurden mit C-Not, T-Not und A-Not drei verschiedene SAPD-Primer verwendet. Die entstandenen genomischen Fingerabdrücke ergaben in Bezug auf die Isolate stets zwei Grundmuster. Die Isolate Mb8 und Mb9 zeigten dabei unabhängig von der eingesetzten Primervariante stets identische Bandenmuster (Muster A). Alle übrigen Isolate erbrachten dagegen Varianzen eines zweiten, von Mb8 und Mb9 deutlich verschiedenen, Fingerabdruck-Musters (Muster B). Die Varianzen von Muster B waren abhängig vom eingesetzten Primer und verhinderten eine fixe, primerübergreifende Zuordnung zu einer Gruppe. Die größten Abweichungen zwischen den Bandenmustern der Isolate innerhalb des Musters B wurden unter Anwendung des T-Not Primers beobachtet. Die mitgeführten Referenzstämmen zeigten jeweils einzigartige, von denen der Isolate abweichende, Bandenmuster. Im Folgenden werden die SAPD-Fingerabdruck-Muster und Varianzen beschrieben sowie die zugehörigen Bandenlängen aufgeführt.

#### **III.5.3.1 T-Not SAPD-Muster von *Methanobacterium* sp. und Referenzstämmen**

Unter Verwendung des T-Not-Primers konnte mit 8 Bandenmustern die größte Diversität innerhalb des Hauptmusters B für die Isolate festgestellt werden (Abb. 65). Die Varianz war dabei jedoch nur gering. Die molekularen Fingerabdrücke der Isolate Mb4, Mb5 und Mb6 wiesen die größte Ähnlichkeit zueinander auf und wichen nur in Details voneinander ab. Alle Varianzen des Hauptmusters B zeigten charakteristische, gemeinsame Amplifikate mit Längen von etwa 310 bp, 830 bp (in Isolat Mb7 etwas tiefer bei 800 bp), 1460 bp, 2290 bp (nicht in Isolat Mb2) und 3150 bp. Für die identisch ausgeprägten Muster der Isolate Mb8 und Mb9 waren Banden auf Höhe von 460 bp, 1120 bp und 1800 bp typisch. Auch in den Referenzstämmen tauchten Banden dieser Größenordnungen auf, jedoch nie in dieser Kombination oder vergleichbarer Bandenintensität (Tab. 49).



**Abb. 65:** T-Not Fingerprint von *Methanobacterium* sp. Mb1 bis Mb10 bezeichnen die entsprechenden *Mb. formicicum*-verwandten Eigenisolate. <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>P2St<sup>T</sup> = *Mb. uliginosum* P2St, <sup>3</sup>M.o.H.<sup>T</sup> = *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, <sup>4</sup>F<sup>T</sup> = *Mb. palustre*<sup>T</sup> F<sup>T</sup>, <sup>5</sup>H2-LR<sup>T</sup> = *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup>, <sup>6</sup>Mic5c12<sup>T</sup> = *Mb. petrolearium* Mic05c12<sup>T</sup>, <sup>7</sup>169<sup>T</sup> = *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup>, -- = Negativkontrolle. M = GeneRuler<sup>TM</sup>

**Tab. 49:** Distribution der SAPD-Bandenlängen im T-Not Fingerprint von *Methanobacterium* sp.-Isolaten und Referenzstämmen

Isolat/Stamm	Amplifikat-Größen <sup>1</sup> [bp]	Muster <sup>3</sup>
Mb1	3140, 2290, 1640, 1460, 1370, 1050, 830, 750, 310, 220	B <sub>f</sub>
Mb2	3140, 1760, 1690, 1460, 1370, 1180, 1080, 890, 830, 750, 650, 520, 400, 310, 220	B <sub>g</sub>
Mb3	3140, 2290, 1760, 1690, 1460, 1370, 1180, 990, 830, 740, 650, 520, 410, 310, 220	B <sub>e</sub>
Mb4	3170, 2540, 2290, 1760, 1690, 1460, 1370, 1180, 1040, 830, 770, 520, 310, 220	B <sub>d</sub>
Mb5	3170, 2540, 2290, 1740, 1690, 1460, 1370, 1040, 830, 790, 620, 520, 310, 220	B <sub>c</sub>
Mb6	3170, 2540, 2290, 1770, 1690, 1460, 1370, 830, 790, 620, 520, 310, 220	B <sub>b</sub>
Mb7	3170, 2290, 1460, 1370, 800, 620, 520, 420, 310, 220	B <sub>a</sub>
Mb8	2950, 2540, 2230, 1800, 1120, 1000, 910, 790, 460, 320	A
Mb9	2950, 2540, 2230, 1800, 1120, 1000, 910, 790, 460, 320	A
Mb10	3170, 2260, 1460, 1080, 840, 760, 310	B <sub>h</sub>
MF <sup>T</sup>	2950, 2280, 1800, 1390, 430, 320	Referenz
P2St <sup>T</sup>	1680, 1540, 1340, 1190, 1060, 950, 740, 680, 630, 590, 560, 240	Referenz

**Tab. 49 (Fortsetzung):**

Isolat/Stamm	Amplifikat-Größen <sup>1</sup> [bp]	Muster <sup>3</sup>
M.o.H. <sup>T</sup>	2360, 1460, 1360, 1060, 940, 880, 690, 620, 550, 500, 440	Referenz <sup>2</sup>
F <sup>T</sup>	2840, 1860, 1390, 1050, 930, 820, 600	Referenz <sup>2</sup>
H2-LR <sup>T</sup>	2550, 1330, 980, 710, 650, 450, 290	Referenz <sup>2</sup>
169 <sup>T</sup>	1920, 1040, 930, 680, 540, 450, 310, 280	Referenz <sup>2</sup>
Mic5c12 <sup>T</sup>	1040, 920, 640, 550, 450, 300, 240	Referenz <sup>2</sup>

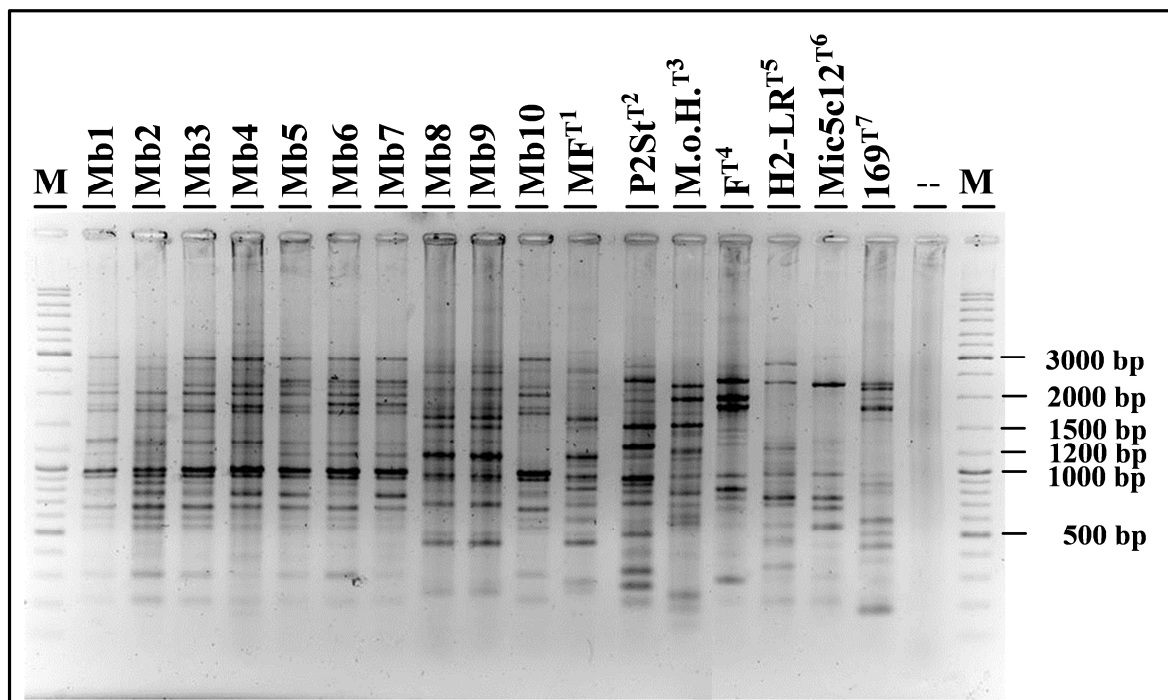
<sup>1</sup>Errechnet mittels des Programms Bio1D anhand der Migrationsweite des GeneRuler DNA-Markers, mathematisch gerundet auf 10 bp.

<sup>2</sup>Vergleichsstamm der DSMZ mit einzigartigem Bandenmuster.

<sup>3</sup>Nach Auswertung der Gelelektrophorese.

### III.5.3.2 C-Not SAPD-Muster von *Methanobacterium* sp. und Referenzstämmen

Die Anwendung des C-Not-Primers resultierte in den geringsten Abweichungen bezüglich der Amplifikatgrößen innerhalb der Mustergruppe B (Abb. 66). Diese hohe Ähnlichkeit führte zu 8 Banden, welche in allen Isolaten dieser Mustergruppe vertreten waren: Diese gemeinsamen Amplifikate umfassen solche mit Größen von etwa 2,9 kb, 1,8 kb, 1720 bp, 1010 bp, 780 bp, 650 bp, 540 bp und 210 bp (Tab. 50). Insbesondere das Auftreten der 1010 bp-Bande erlaubte ein klares Abgrenzen des Musters B von der Mustergruppe A. In Mustergruppe A war dagegen eine deutliche Verstärkung einer 1170 bp großen DNA-Bande im Vergleich zu deren



**Abb. 66: C-Not Fingerprint von *Methanobacterium* sp.** Mb1 bis Mb10 bezeichnen die entsprechenden *Mb. formicum*-verwandten Eigenisolate. <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>P2St<sup>T</sup> = *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup>, <sup>3</sup>M.o.H.<sup>T</sup> = *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, <sup>4</sup>F<sup>T</sup> = *Mb. palustre*<sup>T</sup> F<sup>T</sup>, <sup>5</sup>H2-LR<sup>T</sup> = *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup>, <sup>6</sup>Mic5c12<sup>T</sup> = *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup>, <sup>7</sup>169<sup>T</sup> = *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup>, -- = Negativkontrolle, M = GeneRuler<sup>TM</sup>.



Vorkommen im Muster der übrigen Isolate typisch. Ein 920 bp-Amplifikat ergab sich Gruppen übergreifend in allen Isolatmustern. Das Vorliegen einer Doppelbande aus Amplifikaten der Längen 1520 bp und 1650 bp sowie eines prominenten Amplifikats von etwa 450 bp Länge fand seine Entsprechung neben der Gruppe A auch im Referenzstamm *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, wurden in den übrigen Isolatmustern jedoch nicht gefunden.

Im Vergleich mit den Isolaten zeigten die Referenzstamm-Muster vereinzelt Banden identischer oder ähnlicher Molekulargrößen, es ergaben sich jedoch stets klar unterscheidbare, spezifische Muster.

**Tab. 50: Distribution der SAPD-Bandenlängen im C-Not Fingerprint von *Methanobacterium* sp.-Isolaten und Referenzstämmen**

Isolat/Stamm	Amplifikat-Größen <sup>1</sup> [bp]	Muster <sup>3</sup>
Mb1	2900, 2160, 2000, 1820, 1720, 1300, 1170, 1010, 920, 780, 650, 600, 540, 290, 210	B <sub>f</sub>
Mb2	2920, 2610, 2030, 1820, 1720, 1480, 1300, 1170, 1010, 920, 850, 770, 650, 600, 540, 450, 380, 290, 210	B <sub>e</sub>
Mb3	2900, 2590, 2200, 2030, 1820, 1720, 1480, 1300, 1170, 1010, 920, 850, 770, 650, 600, 540, 290, 210	B <sub>a</sub>
Mb4	2900, 2590, 2200, 2030, 1820, 1720, 1300, 1010, 920, 850, 770, 650, 540, 450, 380, 210	B <sub>a</sub>
Mb5	2900, 2300, 2200, 2030, 1820, 1720, 1300, 1170, 1010, 920, 850, 770, 650, 600, 540, 290, 210	B <sub>c</sub>
Mb6	2900, 2300, 2200, 2030, 1860, 1720, 1300, 1170, 1010, 920, 850, 770, 650, 600, 540, 290, 210	B <sub>b</sub>
Mb7	2900, 2300, 2200, 2030, 1860, 1720, 1300, 1170, 1010, 920, 770, 650, 600, 540, 290, 210	B <sub>b</sub>
Mb8	2750, 2570, 2180, 1790, 1650, 1520, 1340, 1170, 960, 920, 690, 500, 450, 230	A
Mb9	2750, 2590, 2180, 1790, 1650, 1520, 1340, 1170, 960, 920, 690, 500, 450, 230	A
Mb10	2970, 2680, 2250, 2030, 1830, 1720, 1480, 1010, 920, 770, 660, 590, 540, 290, 210	B <sub>d</sub>
MF <sup>T</sup>	2700, 2610, 1650, 1520, 1170, 1080, 970, 820, 690, 590, 510, 450, 270, 230	Referenz <sup>2</sup>
P2St <sup>T</sup>	2920, 2410, 2220, 2000, 1790, 1530, 1300, 1190, 1090, 960, 810, 710, 500, 400, 320, 260, 200	Referenz <sup>2</sup>
M.o.H. <sup>T</sup>	2300, 2030, 1750, 1570, 1450, 1250, 1150, 960, 800, 690, 620, 570, 390, 230, 180	Referenz <sup>2</sup>

**Tab. 50 (Fortsetzung):**

Isolat/Stamm	Amplifikat-Größen <sup>1</sup> [bp]	Muster <sup>3</sup>
F <sup>T</sup>	2480, 2100, 1910, 1520, 1440, 1350, 1010, 850, 760, 690, 280	Referenz <sup>2</sup>
H2-LR <sup>T</sup>	3000, 2430, 1940, 1710, 1290, 1010, 760, 700, 570, 470, 340, 210	Referenz <sup>2</sup>
169 <sup>T</sup>	2410, 2100, 1900, 1710, 1500, 900, 840, 600, 510, 450, 370, 180	Referenz <sup>2</sup>
Mic5c12 <sup>T</sup>	2390, 2230, 2060, 1530, 1360, 1270, 1010, 770, 680, 560, 220	Referenz <sup>2</sup>

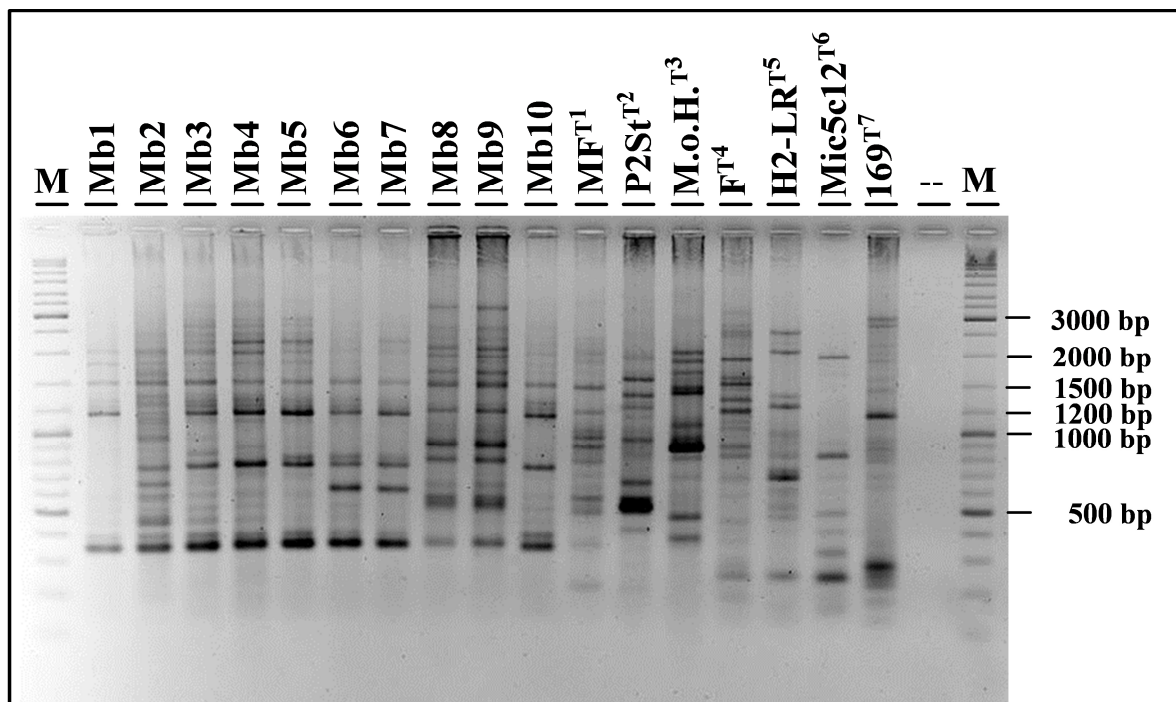
<sup>1</sup>Errechnet mittels des Programms Bio1D anhand der Migrationsweite des GeneRuler DNA-Markers, mathematisch gerundet auf 10 bp.

<sup>2</sup>Vergleichsstamm der DSMZ mit einzigartigem Bandenmuster.

<sup>3</sup>Nach Auswertung der Gelelektrophorese.

### III.5.3.3 A-Not SAPD-Muster von *Methanobacterium* sp. und Referenzstämmen

Die SAPD-Analyse unter Verwendung des A-Not-Primers stellte den besten Kompromiss aus Bandenanzahl pro Organismenprobe und Auswertbarkeit der Gelelektrophorese dar. Dadurch war eine Differenzierung der Bandenmuster und Quantifizierung der Amplifikatlängen gut möglich (**Abb. 67**). Vergleichbar zur C-Not-SAPD unterschieden sich die Fingerabdrücke der Mustergruppe B nur in Details voneinander. Insbesondere die Muster der Isolate Mb3, Mb4 und Mb5 wiesen hohe Ähnlichkeiten auf. Wie in den oben aufgeführten Analysen setzte sich Muster A mit den Isolaten Mb8 und Mb9 von der Mustergruppe B ab. Dennoch ergaben sich mit Amplifikaten der Länge 350 bp und 1500 bp zwei Banden, die in allen Isolaten vorkamen und, teilweise in schwächerer Form, auch im Referenzstamm *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Diese bildeten ein potentiell Ziel zur Konstruktion spezifischer Primer zur Detektion der Isolate in DNA-Extrakten (siehe **III.5.4**). Spezifisch für die Isolate der Mustergruppe A war das Vorkommen von etwa 820 bp bzw. 1670 bp großen Amplifikaten sowie einer stark ausgeprägten 930 bp, während Mustergruppe B in der Gelelektrophorese durch eine ausgeprägte 1140 bp-Bande und ein Amplifikat bei etwa 780 bp gekennzeichnet war. **Tabelle 51** bietet einen Überblick über die Zusammensetzung und Größen der einzelnen Isolat-Muster und Referenzstämmen.



**Abb. 67: A-Not Fingerprint von *Methanobacterium* sp.** Mb1 bis Mb10 bezeichnen die entsprechenden *Mb. formicicum*- verwandten Eigenisolate. <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>P2St<sup>T</sup> = *Mb. uliginosum* P2St, <sup>3</sup>M.o.H.<sup>T</sup> = *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, <sup>4</sup>F<sup>T</sup> = *Mb. palustre*<sup>T</sup> F<sup>T</sup>, <sup>5</sup>H2-LR<sup>T</sup> = *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup>, <sup>6</sup>Mic5c12<sup>T</sup> = *Mb. petrolearium* Mic05c12<sup>T</sup>, <sup>7</sup>169<sup>T</sup> = *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup>, -- = Negativkontrolle, M = GeneRuler<sup>TM</sup>.

**Tab. 51: Distribution der SAPD-Bandenlängen im A-Not Fingerprint von *Methanobacterium* sp.-Isolaten und Referenzstämmen**

Isolat/Stamm	Amplifikat-Größen <sup>1</sup> [bp]	Muster <sup>3</sup>
Mb1	2020, 1830, 1540, 1280, 1220, 1150, 380, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>g</sub>
Mb2	2060, 1530, 1340, 1250, 1140, 970, 770, 660, 600, 510, 460, 380, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>f</sub>
Mb3	2880, 2730, 2430, 2240, 2040, 1530, 1290, 1220, 1140, 860, 780, 600, 510, 460, 380, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>e</sub>
Mb4	2880, 2730, 2430, 2240, 1990, 1530, 1290, 1220, 1140, 930, 780, 610, 510, 460, 390, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>d</sub>
Mb5	2880, 2730, 2400, 2280, 2020, 1530, 1290, 1220, 1140, 850, 790, 600, 460, 390, <b>350<sup>4</sup></b>	B <sub>c</sub>
Mb6	2020, 1530, 1140, 850, 790, 650, 540, 460, 390, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>b</sub>
Mb7	2280, 2020, 1530, 1140, 850, 780, 640, 380, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>a</sub>
Mb8	3260, 2580, 2060, 1970, 1670, 1500, 1180, 930, 820, 590, 530, <b>360<sup>4</sup></b>	A
Mb9	3260, 2580, 2060, 1970, 1670, 1500, 1180, 930, 820, 590, 540, <b>360<sup>4</sup></b>	A
Mb10	2100, 1980, 1500, 1140, 780, 600, 520, 470, 390, <b>340<sup>4</sup></b>	B <sub>h</sub>
MF <sup>T</sup>	2380, 2240, 2040, 1860, 1480, 1180, 970, 910, 810, 590, 500, <b>360<sup>4</sup></b> , 220	Referenz <sup>2</sup>

**Tab. 51 (Fortsetzung):**

Isolat/Stamm	Amplifikat-Größen <sup>1</sup> [bp]	Muster <sup>3</sup>
P2St <sup>T</sup>	1880, 1580, 1380, 1210, 970, 680, 570, 540, 410	Referenz <sup>2</sup>
M.o.H. <sup>T</sup>	1980, 1880, 1650, 1450, 1380, 1070, 900, 840, 720, 480, 380	Referenz <sup>2</sup>
F <sup>T</sup>	3160, 2670, 2500, 1890, 1580, 1500, 1310, 1190, 1100, 1050, 910, 840, 700, 590, 450, 250, 200	Referenz <sup>2</sup>
H2-LR <sup>T</sup>	2480, 2000, 1380, 1240, 1010, 860, 710, 620, 510, 480, 250	Referenz <sup>2</sup>
Mic5c12 <sup>T</sup>	1910, 1620, 840, 500, 420, 320, 250, 170	Referenz <sup>2</sup>
169 <sup>T</sup>	2910, 2670, 2150, 1970, 1820, 1540, 1440, 1150, 950, 910, 840, 710, 640, 280, 250, 230	Referenz <sup>2</sup>

<sup>1</sup>errechnet mittels des Programms Bio1D anhand der Migrationsweite des GeneRuler DNA-Markers, mathematisch gerundet auf 10 bp.

<sup>2</sup>Vergleichsstamm der DSMZ mit einzigartigem Bandenmuster.

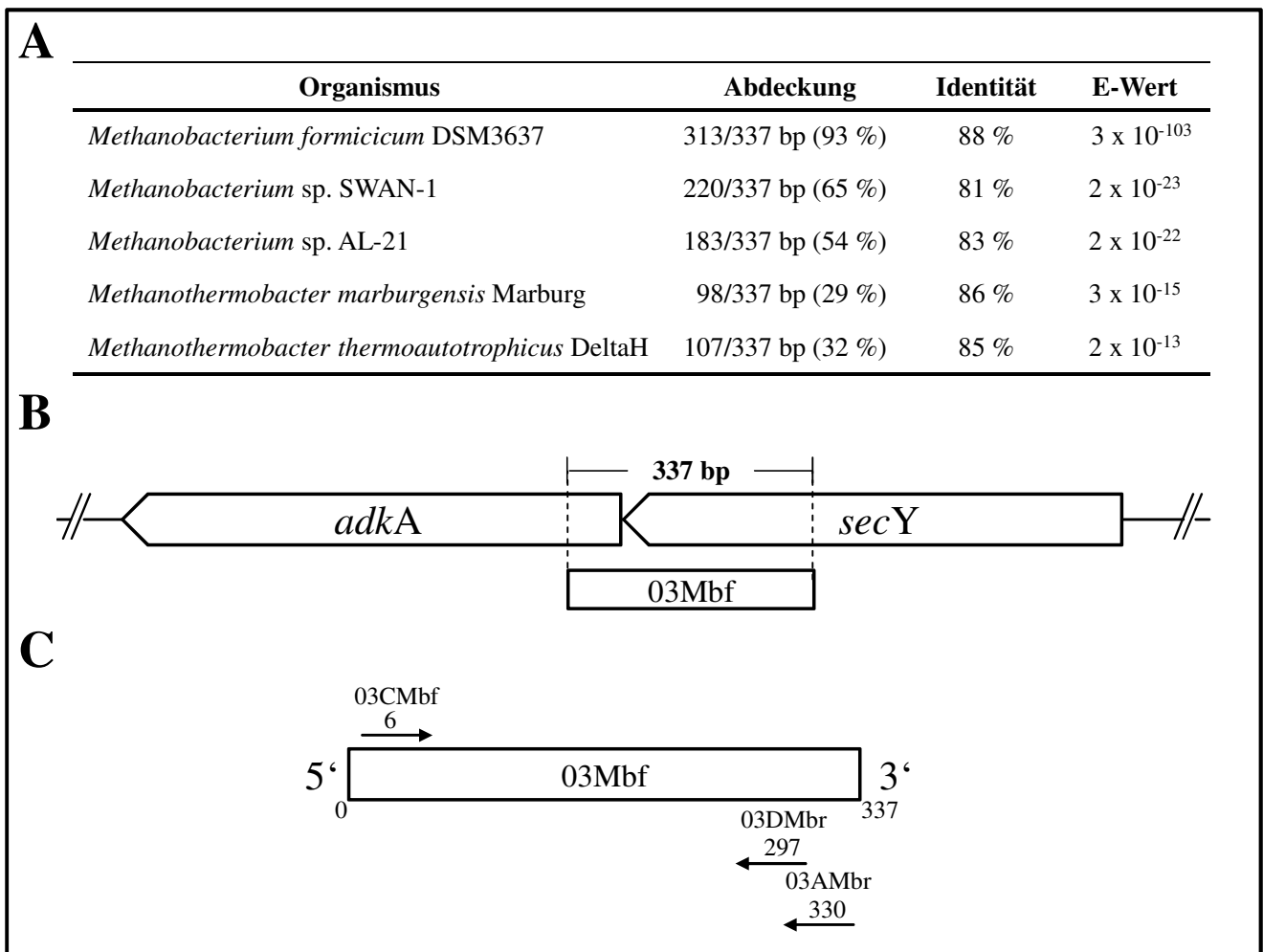
<sup>3</sup>Nach Auswertung der Gelelektrophorese.

<sup>4</sup>Amplifikat für die Entwicklung eines Nachweissystems selektiert (**III.5.4**). Abweichende Längen in benachbarten Spuren sind auf „Smiley-Effekt“ im zugrunde liegenden Gel zurückzuführen.

### III.5.4 Nachweis methanogener Archaea der Gattung *Methanobacterium* mittels SAPD-abgeleiteter Fragmentamplifikation

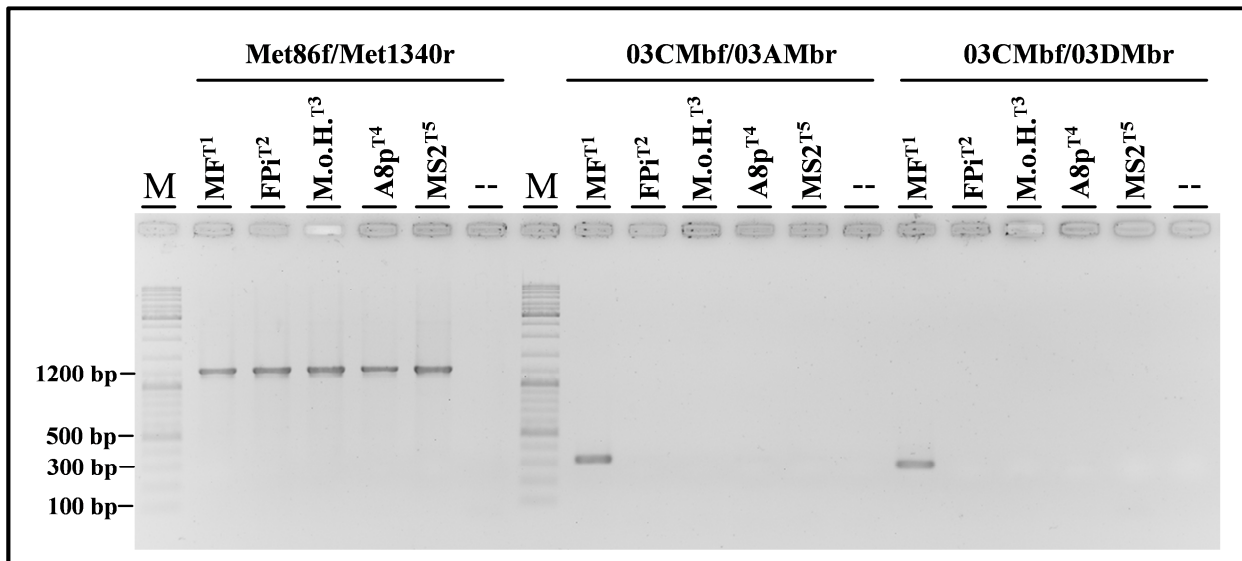
Die Entwicklung eines direkten, PCR-basierten Nachweissystems zur Detektion der Isolate Mb1 bis Mb10 der Gattung *Methanobacterium* sowie von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> in DNA-Extrakten aus Anreicherungs- bzw. Reinkulturen und BGA-Fermenterproben erfolgte auf Grundlage der A-Not-SAPD Amplifikationsmuster (**III.5.3.3**). Aufgrund des spezifischen Vorkommens in den Mustern der o.g. Isolate und des nächst verwandten Typstammes *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> wurde ein ausgeprägtes, etwa 340 bp langes DNA-Amplifikat selektiert. Nach Klonierung der DNA-Bande aus dem SAPD-Muster konnte die Länge mit 337 bp exakt bestimmt und das Insert (im Folgenden 03Mbf) erfolgreich sequenziert werden. Eine BLAST-Analyse gegen die Leserahmen der NCBI GenBank ergab keine signifikanten Übereinstimmungen. Gegen in der Datenbank hinterlegte Kompletengenom-Sequenzen erfolgten vier signifikante Treffer mit negativen E-Werten. Insbesondere die Genome der nicht weiter spezifizierten und bereits für die 23S rRNA-Gen-Analyse (**III.5.5**) herangezogenen Arten *Methanobacterium* sp. SWAN-1 und AL-21 enthielten Sequenzbereiche mit 81 % bzw. 83 % Nukleotidübereinstimmung mit der 03Mbf-Sequenz. Allerdings wurden hier mit 65 % bzw. 54 % der Gesamtsequenz nur Teilbereiche der 337 bp in die Analyse einbezogen. Ein zusätzlicher Abgleich mit den Contigs der Schrotschuss-Genomsequenz von *Mb. formicicum* PP1 ergab eine 88 %ige Sequenzidentität bei einer Abdeckung von 93 % (**Abb. 68A**). Dabei umfasste die Sequenz den 5'-Bereich des Gens für

eine postulierte Adenylatkinase AdkA (UniProt-Kennzeichnung: K2RT60\_METFO) und den anschließenden 3'-Bereich des Leserahmens für die Kodierung einer putativen Präprotein-Translokase SecY (K2QD43\_METFO) (**Abb. 68B**). Um eine gemeinsame Amplifikation mit dem Primerpaar Met86f/Met1340r durchführen und damit eine Positivkontrolle mitführen zu können, wurden die Primer zur Amplifikation eines Fragments von 03Mbf mit ähnlichen Eigenschaften entworfen. Dabei wurde der forward-Primer 03CMbf mit jeweils einem von zwei revers-Primern (03AMbr und 03DMbr) kombiniert. Über einen *in silico*-Abgleich mit der NCBI GenBank wurde eine Fehlhybridisierung mit anderen methanogenen Archaea ausgeschlossen. Für eine erfolgreiche Kombination von 03CMbf/03AMbr und 03CMbf/03DMbr wurde die Amplifikation eines 324 bp- bzw. 291 bp-03Mbf-Fragments erwartet (**Abb. 68C**).



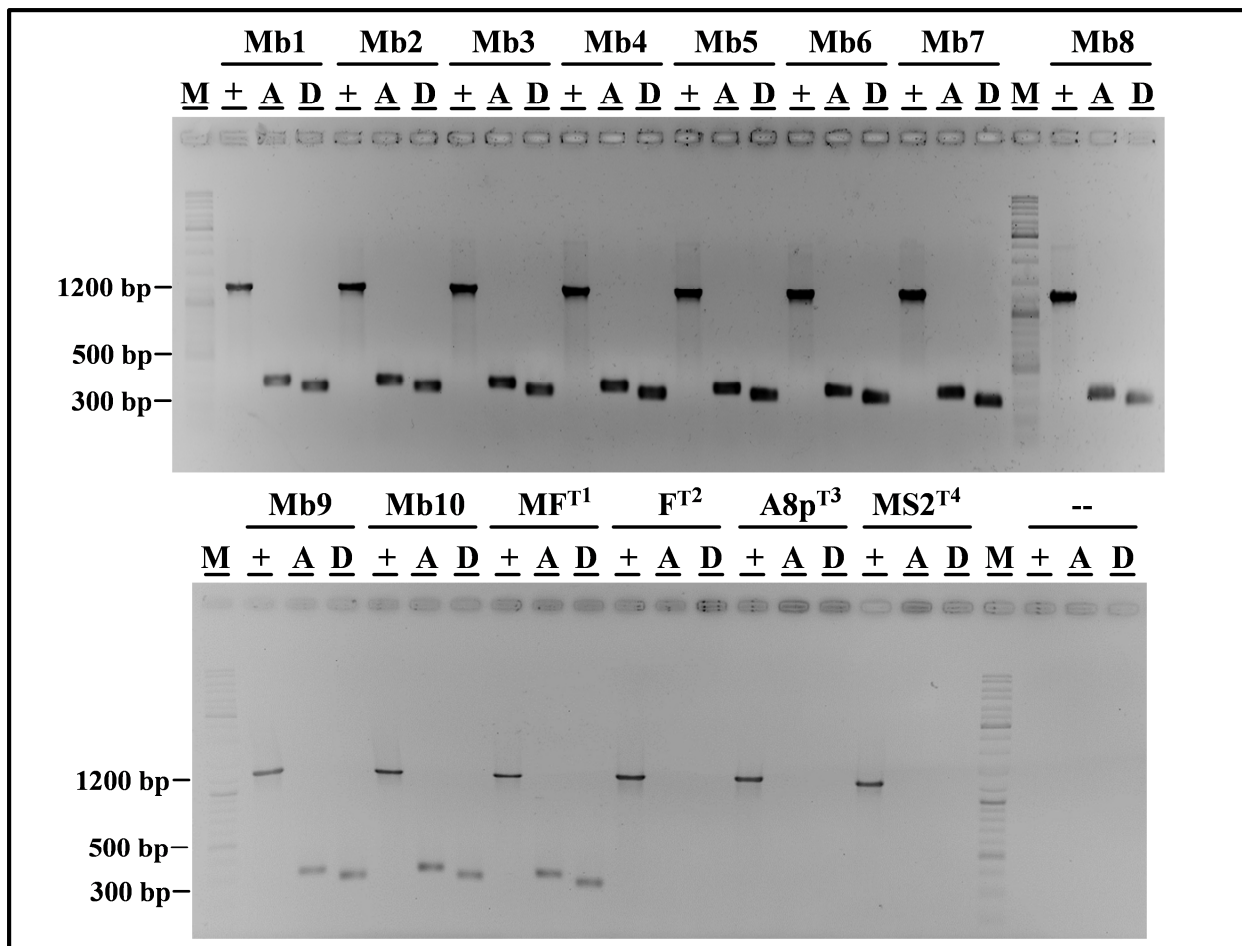
**Abb. 68: Sequenzidentität und Lage des A-Not-SAPD-Amplifikats 03Mbf im Genom von *Mb. formicicum* PP1.** Abgleich der Sequenz von 03Mbf ergab die höchste Identität mit Contig 4 der Shotgun-Genomsequenz von *Mb. formicicum* DSM3637 (A). In diesem konnte 03Mbf auf die Zusammenführung des 3'-Bereiches des putativen *adkA*-Gens mit dem 5'-Bereich von *secY* zurückgeführt werden (B). Mit zwei Primerkombinationen wurden 324 bp- bzw. 294 bp-Fragmente von 03Mbf (C) amplifiziert.

Beide Kombinationen fanden Eingang in die Spezifitätstests, da unterschiedlich hohe Wahrscheinlichkeiten für eine Selbstbinde-Fähigkeit vorhergesagt wurden. Nach Etablierung eines einstufigen PCR-Protokolls konnte mit beiden Primerkombinationen DNA-Extrakte einer Kultur von *Mb. formicum* MF<sup>T</sup> von denen von *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, *Mb. oryzae* FPi<sup>T</sup>, *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> und des gattungsfremden Archaeons *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> unterschieden werden. Dabei ergab sich ausschließlich in den Spuren von *Mb. formicum* MF<sup>T</sup> und den Positivkontrollen ein Amplifikat (**Abb. 69**).



**Abb. 69: Unterscheidung von *Mb. formicum* MF<sup>T</sup> von ausgewählten methanogenen Archaea mittels direkter PCR.** Beide Primerkombinationen führen zu Amplifikat korrekter Größe ausschließlich in Spuren der Zielspezies. <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>FPi<sup>T</sup> = *Mb. oryzae* FPi<sup>T</sup>, <sup>3</sup>M.o.H.<sup>T</sup> = *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, <sup>4</sup>A8p<sup>T</sup> = *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, <sup>5</sup>MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, -- = Negativkontrolle, M = GeneRuler<sup>TM</sup>

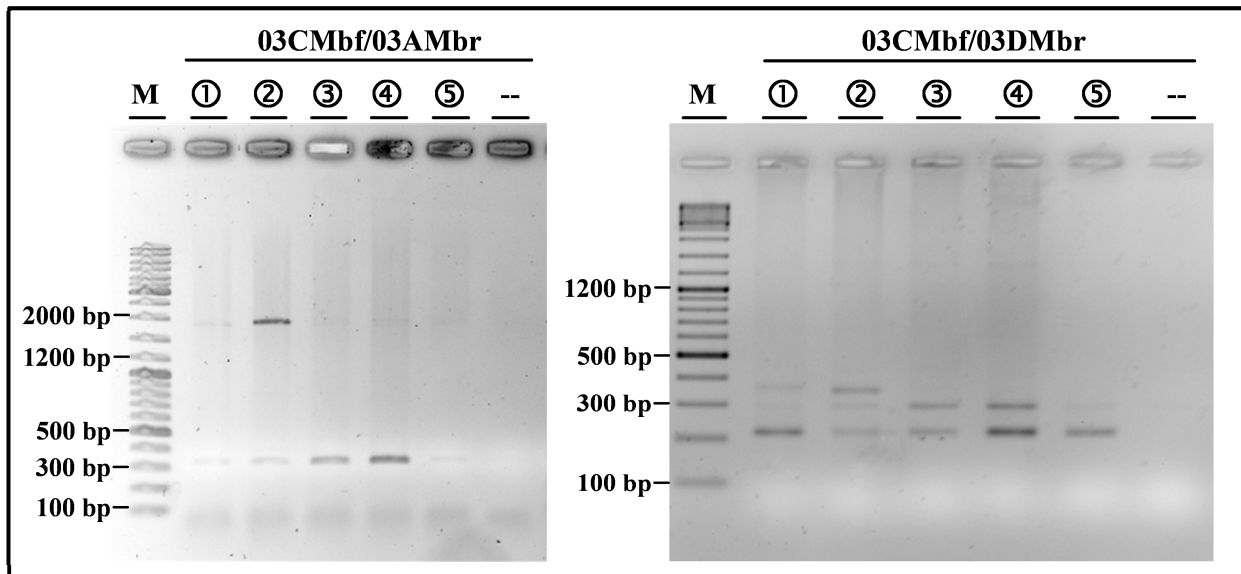
Auch die Anwendung der Primerpaare auf die Isolate Mb1 bis Mb10 ergab deutliche Banden auf den jeweils korrekten Höhen. Im Rahmen dieses Experiments konnte auch die Unterscheidungsfähigkeit des Systems gegenüber *Mb. palustre* F<sup>T</sup> bestätigt werden (**Abb. 70**). Amplifikationstests ergaben 3 µL eines DNA-Extraktes durchschnittlicher Qualität in 50 µL-Ansätzen als ideales Template-Volumen bei Anwendung des Systems auf archaeelle Kulturproben. Zur Amplifikation der 03Mbf-Fragmente aus Fermenter-DNA-Extrakten musste das Volumen des eingesetzten DNA-Extraktes auf 6 µL in 50 µL-PCR-Ansätzen erhöht werden. Daneben wurde das in gelelektrophoretischen Analysen aufgetragene PCR-Probenvolumen auf 10 µL verdoppelt, um eine gute Sichtbarkeit und Auswertung der Zielbanden zu ermöglichen. Während die Primerkombination 03CMbf/03AMbr bereits unter dem Temperaturprogramm für Kulturproben die korrekte Amplifikat-Größe ergab, zeigten die Spuren mit der Primerkombination 03CMbf/03DMbr eine Vielzahl von teils auch höhermolekularen Banden.



**Abb. 70: Amplifikation von 03Mbf-Fragmenten durch direkte PCR aus Kulturen von *Methanobacterium* sp.-Isolaten aus BGA sowie Vergleichsstämmen.** Mb1 bis Mb10 = *Mb. formicicum*-verwandte Eigenisolate Mb1 bis Mb10, <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>F<sup>T</sup> = *Mb. palustre* F<sup>T</sup>, <sup>3</sup>A8p<sup>T</sup> = *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, <sup>4</sup>MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>. Primerkombinationen: + = Positivkontrolle Met86f/Met1340r, A = 03CMbf/03AMbr, D = 03CMbf/ 03DMbr, -- = Negativkontrolle ohne DNA-Zugabe, M = GeneRuler<sup>TM</sup>

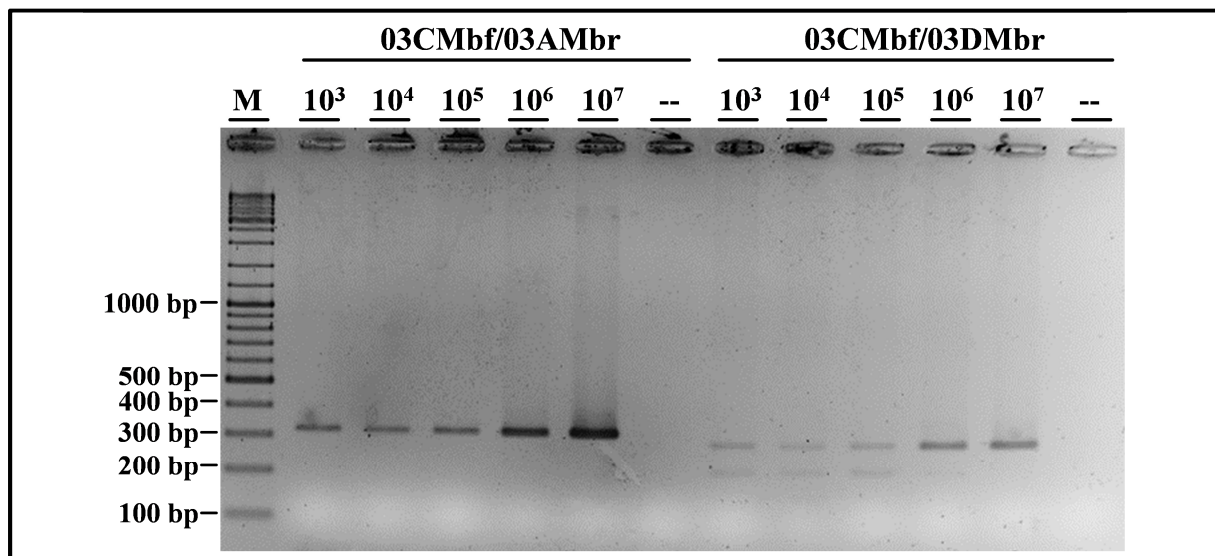
Durch Anheben der Hybridisierungstemperatur auf 56 °C bei gleichzeitigem Absenken der Elongationszeit und finalen Elongationszeit auf 20 s bzw. 150 s konnten Fragmente oberhalb einer Länge von 400 bp vermieden werden. Da jedoch auch unter diesen Bedingungen weitere Amplifikate bis zu einer Minimallänge von etwa 200 bp auftauchten (**Abb. 71**), eignete sich diese Primerpaarung für die Analyse von Fermenterextrakten nicht so sehr wie 03CMbf/03AMbr. Durch Versetzen einer Substrat-Probe der BGA Wallhalben mit einer dekadischen Reihe definierter Zellzahlen einer Kultur von Isolat Mb9 wurden beide Primerpaarungen auf ihre minimale Detektionskapazität im Direkt-PCR-System unter simulierten Praxisbedingungen untersucht. Zellfrei zentrifugierter Substratüberstand (15 min bei 16000 g) und Gesamtschlamm wurden beimpft und die DNA extrahiert. Dabei ergab sich in beiden Fällen eine erfolgreiche Amplifizierung bis herunter zu 10<sup>3</sup> Zellen (**Abb. 72**). Die zusätzlichen Banden durch Anwendung des Primerpaars 03CMbf/03DMbr zeigten sich hier erneut, doch vorwiegend in Extrakten mit niedrigen zugeimpften Titern von 10<sup>3</sup> bis 10<sup>5</sup>

Zellen. Wie zuvor verblieb das mittels 03CMbf/03AMbr erstellte Amplifikat ohne zusätzliche Bandensignale.



**Abb. 71: Amplifikation von 03Mbf-Fragmenten aus Fermenterproben.** Direktvergleich beider Primerpaarungen unter stringenteren PCR-Bedingungen. 03CMbf/03DMbr führt hier im Gegensatz zur Anwendung auf Reinkulturen zu weiteren Amplifikaten geringerer Länge. M = GeneRuler™, ① = BGA Arenrath, ② = BGA Kaschenbach, ③ = BGA Obere Blies, ④ = BGA Wallhalben, ⑤ = BGA Niederweiler, -- = Negativkontrolle.

Einen Überblick über die Bandenstärke in Abhängigkeit vom vorgelegten Zelltiter gibt die folgende Abbildung:



**Abb. 72: Ermittlung des Detektionslimits des Direkt-PCR-Systems zum Nachweis von *Methanobacterium* sp.-Eigenisolaten und von *Mb. formicum* MF<sup>T</sup>.** Zugabe der angegebenen Zellmengen einer Kultur des Isolats Mb9 zu Fermenterproben der BGA Wallhalben mit nachfolgender DNA-Extraktion und PCR. M = GeneRuler™-DNA-Marker, -- = Negativkontrolle.



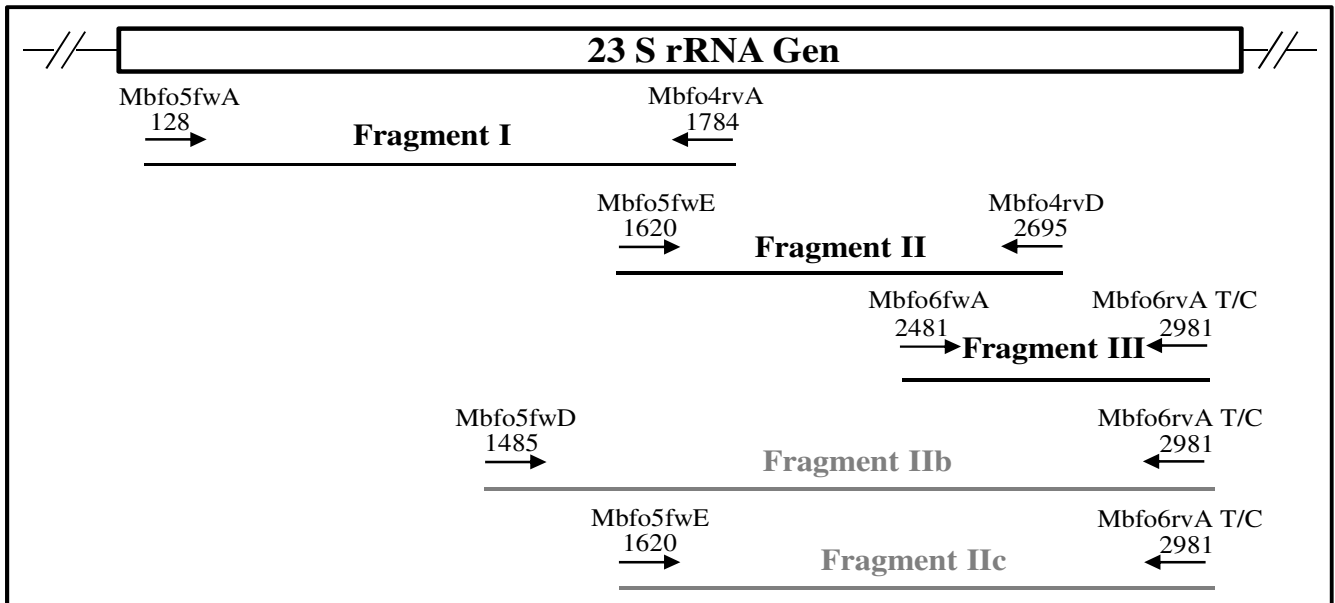
### III.5.5 Sequenzierung des 23S rRNA-Gens von Vertretern der Gattung *Methanobacterium*

Zur Schaffung einer Datengrundlage in Vorbereitung auf 23S rRNA-Gen-basierter Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung und zum Erhalt von Sequenzinformationen eines alternativen Gens zur phylogenetischen Einordnung erhaltener Isolate der Gattung *Methanobacterium* sp. wurde zunächst mittels des „primer-walking“-Ansatzes ein 23S rDNA-Fragment von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> sequenziert.

In methanogenen Archaea sind häufig multiple ORFs von rRNA-Genen zu finden, die sich bezüglich ihrer Sequenz unterscheiden. Die daraus resultierende, große Diversität zwischen den 23S rRNA-Leserahmen aller 36 alignierter Vergleichssequenzen sowohl innerhalb einer Spezies, als auch zwischen verschiedenen Spezies verhinderte das Auffinden hochkonservierter Regionen zum Erstellen von Sequenzierungsprimern. Es konnten jedoch für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und allen Vergleichssequenzen zwei Gruppen untereinander homologer Sequenzen identifiziert werden (im Folgenden als „Leserahmen A“ und „Leserahmen B“ bezeichnet). Daher wurde für jeden der beiden Leserahmen des 23S rDNA-Gens von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> ein kleineres Alignment neu konstruiert, in welches nur die homologen Sequenzen naher Verwandter Eingang fanden. Für Leserahmen A wurden über das Phylogenieprogramm ARB software suite (<http://www.arb-home.de/>) Sequenzen von *Methanobrevibacter smithii* PS<sup>T</sup> (Msm\_1799 und Msm\_1805-Leserahmen [CP000678.1, nt:516561-519382 und nt:330029-332858]) und *Methanosphaera (Msh.) stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> (*rrlC* und *rrlD*-Leserahmen [CP000102.1, nt: 943938-946800 und nt: 1164082-1166943]) als geeignete Kandidaten für ein Alignment ermittelt. Dieses wurde um 23S rRNA-Gensequenzen aus dem Kompletengenom von *Methanobacterium* sp. SWAN-1 (MSWAN\_R0038-Leserahmen, GeneID 10669500; NCBI RefSeq NC\_015574.1) und *Methanobacterium* sp. AL-21 (Metbo\_R0031-Leserahmen, GeneID 10277981; NCBI RefSeq NC\_015216.1) erweitert. Alle übrigen zur Verfügung stehenden Sequenzen bildeten eine von Leserahmen A distinkte Gruppe hoher Sequenzidentität. Somit wurde für die Erarbeitung von Primerpaarungen zur Sequenzierung dieses zweiten 23S rDNA-Leserahmens ein Alignment aus den Sequenzen MSWAN\_R0019 und MSWAN\_R0024 (GeneID 10668242 bzw. 10668304, *Methanobacterium* sp. SWAN-1; NCBI RefSeq NC\_015574.1), Metbo\_R0021 (GeneID 10276953, *Methanobacterium* sp. AL-21; NCBI RefSeq NC\_015216.1) sowie den Msp\_0351- und Msp\_0744-Leserahmen von *Msh. stadtmanae* PS<sup>T</sup> (nt: 410725-413587 bzw. nt: 856378-859241; CP000102.1) zugrunde gelegt. Aus diesen Alignments heraus gelang die Sequenzierung des *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> 23S rRNA-Leserahmens A über fünf verschiedene

Primerpaare. Nach Revision der Teilsequenzen konnte die zur Gesamtsequenzierung eines Großteils (2767 bp) benötigte Anzahl an Primerpaarungen auf drei reduziert werden. Die Sequenz des Leserahmens B wurde über vier z.T. redundante Fragmente ermittelt. Mit diesen konnten 2455 bp Sequenzinformation gewonnen werden (**II.2.3.3**). Ein Alignment der Sequenzen beider Leserahmen ergab hohe Sequenzidentität unter der Voraussetzung einer revers-komplementärer Leserichtung eines der beiden Leserahmen. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die ermittelten Leserahmen *in vivo* dieselbe 23S rRNA kodieren, jedoch auf unterschiedlichen DNA-Strängen lokalisiert sind bzw. komplementäre Sequenzen darstellen und dieser Sachverhalt auch die meisten Sequenzunterschiede im Ausgangsalignment begründet. Im Folgenden wurde aufgrund größerer Sequenzlänge stets mit der Sequenz weitergearbeitet, welche sich aus dem Primersatz zu Ermittlung des „Leserahmens A“ ergab. Über diese drei Primerpaarungen gelang ebenfalls die Sequenzierung von 23S rRNA-Genfragmenten aller zehn *Mb. formicicum*-verwandter Isolate (Mb1 - Mb10) aus BGA. Im Rahmen der Aufklärung der 23S rRNA-Gensequenz von Typstämmen weiterer *Methanobacterium*-Arten (*Mb. palustre* F<sup>T</sup>, *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, *Mb. ferruginis* Mic6c05<sup>T</sup>, *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup>, *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup>, *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> und *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup>) gelang die Amplifizierung der drei Teilbereiche unter Verwendung der drei für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> entwickelten Primerpaarungen nur für *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>. Hier konnte die Sequenzinformation eines 2692 bp langen Genfragments ermittelt werden. In allen übrigen Fällen wurden stets nur ein Anfangs- (Fragment I) und ein Endstück (Fragment III) amplifiziert. Aufgrund der daraus resultierenden, fehlenden Sequenzinformation zwischen diesen Bereichen, sonst amplifiziert über die Primerpaarung Mbfo5fwE/Mbfo4rvD, konnte auf diese Weise keine geeignete Sequenzüberlappung erzielt und keine Gesamtsequenz hergeleitet werden. Unter Rückgriff auf Primer, welche vor der Zusammenlegung die Amplifikation der 23S Gensequenz in fünf sukzessiven, überlappenden Teilfragmenten ermöglichte, konnte ein Mittelstück amplifiziert werden. Insbesondere durch Kombination der stromabwärts- bzw. „forward“- Primer Mbfo5fwD und Mbfo5fwE mit dem „revers“-Primer zur ursprünglichen Amplifikation des Endstückes, Mbfo6rvA T/C, wurde eine Abdeckung des Mittelstückes durch zwei redundante 23S rRNA-Genfragmente (Fragmente IIb und IIc) erreicht (**Abb. 73**). Aufgrund der Amplifikation eines längeren Fragments und einer damit einhergehenden vergrößerten Überlappungszone zum stromaufwärts positionierten Fragment I fokussierten sich die Sequenzierungsansätze auf das Fragment IIb mittels der Kombination Mbfo5fwD/Mbfo5fwE. Dies ermöglichte mit der Zusammensetzung der Sequenzen der Fragmente I und IIb zu einer Gesamtsequenz von einer

Länge zwischen 2600 und 2700 bp die Aufklärung eines Großteils des 23S rRNA-Leserahmens auch in diesen Arten.

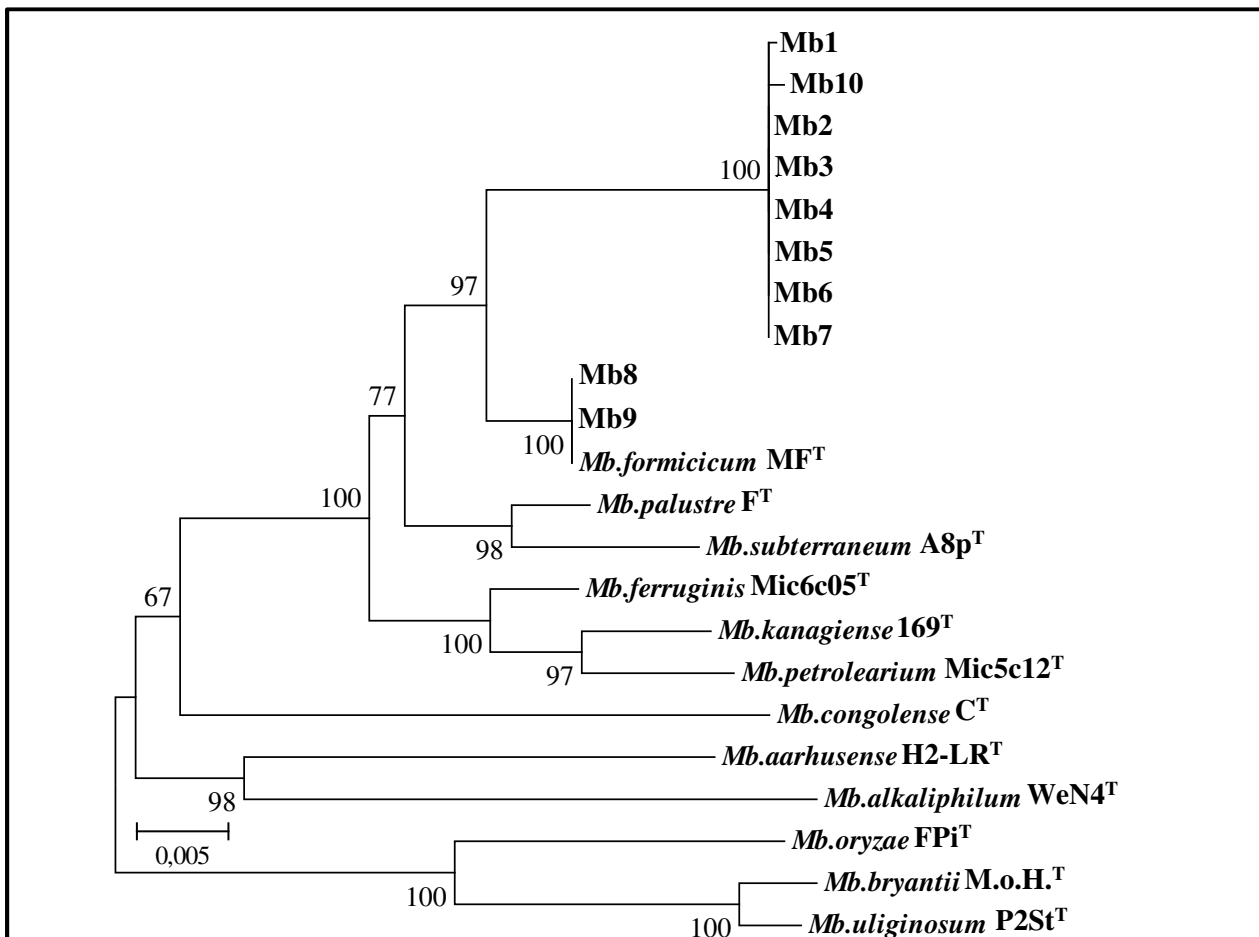


**Abb. 73: Sequenzierung des 23S rRNA-Gens von Vertretern der Gattung *Methanobacterium* sp. mittels „Primer walking“.** Für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> wurden drei überlappende Teilsequenzen (Fragment I - III, schwarz) amplifiziert, um den Leserahmen abzudecken. Für die übrigen untersuchten Arten dieser Gattung konnte Fragment II nicht mit dem angegebenen Primerpaar amplifiziert werden, weshalb dieses durch die über alternative Primerpaarungen amplifizierten Fragmente Iib und Iic (grau) abgedeckt wurde. Angegeben sind die Primerkombinationen (Tab. 25) sowie die relative Nukleotidposition der ersten Bindung im zugrunde liegenden Sequenzalignment.

### III.5.6 Phylogenetische Einordnung von Eigenisolaten der Gattung *Methanobacterium* anhand von 23S rRNA-Gensequenzinformation

Anhand der aufgeklärten Partialsequenz der 23S rRNA-Leserahmens von Eigenisolaten und Referenzstämmen der Gattung *Methanobacterium* konnte eine phylogenetische Analyse durchgeführt werden. In einer Stammbaumanalyse auf Grundlage der Neighbor-Joining-Methodik ergaben sich für die Referenzstämme vergleichbare Positionierungen in den 16S- (Abb. 63) und 23S rRNA Gen basierenden Stammbäumen (Abb. 74). Ein Unterschied ergab sich in der Positionierung von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, welcher im Fall der 16S rRNA-Genanalyse mit *Mb. palustre* F<sup>T</sup> gruppiert und innerhalb desselben Astes parallel zu *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> eingeordnet wurde: Hier ergab sich unabhängig vom Einbezug der Sequenzdaten von Eigenisolaten eine Gruppierung von *Mb. palustre* F<sup>T</sup> und *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> sowie eine davon separate Positionierung von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. In Bezug auf die Isolate ergab sich ein Hinweis auf einen hohen Verwandtschaftsgrad untereinander. Es bildete sich ein Hauptast aus zwei parallelen Gruppen, in welchen sich Vertretern der Eigenisolate positionierten. Mit Ausnahme der Isolate Mb8 und Mb9 kamen

alle Isolate in einer Gruppe ohne Referenzorganismus zu liegen. Abweichungen ergaben sich dabei hauptsächlich bei den Isolaten Mb1 und Mb10, welche eine größere evolutionäre Distanz zu den restlichen Sequenzen in dieser Gruppe aufwiesen. Der Referenzstamm *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> positionierte sich, zusammen mit den Isolaten Mb8 und Mb9, in der Parallelgruppe in diesem Ast. In einem paarweisen Sequenzvergleich beider Mikroorganismen lagen die einzigen Unterschiede in je einer unbesetzten Nukleotidposition pro Sequenzhintergrund bei einer untersuchten Fragmentlänge von 2397 bp. Im Vergleich zu *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> ergaben sich Sequenzidentitäten von 99 % (Mb8, 2359 von 2361 nt) bzw. 97 % (Mb9, 2298/2364nt). Alle anderen Referenzstämme positionierten sich außerhalb dieses Astes und spiegelten in ihrer Anordnung die Verhältnisse des 16S rRNA-Gen- Stammbaums wider.



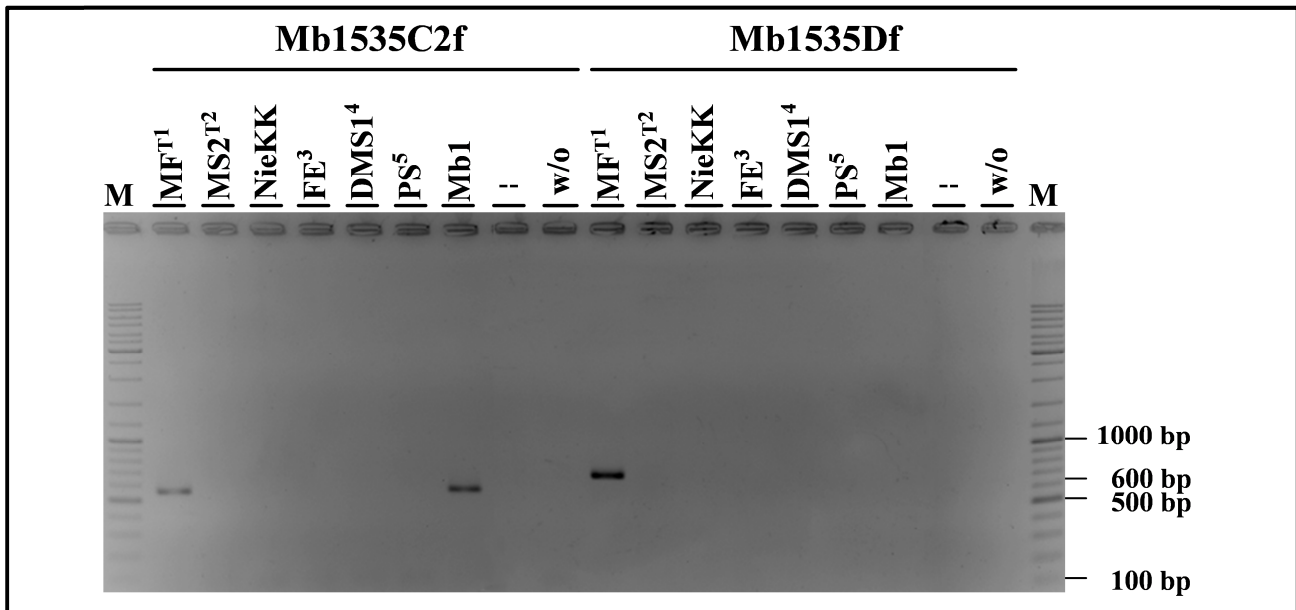
**Abb. 74: Phylogenetische Einordnung von Eigenisolaten in die Gattung *Methanobacterium* nach 23S rRNA-Genanalyse.** Stammbaum erstellt durch die Neighbor-Joining-Methode nach Saitou und Nei, 1987. Die prozentualen Ergebnisse der Bootstrap-Analyse aus 1000 Wiederholungen (Felsenstein, 1985) sind unter den Ästen angegeben. Evolutionäre Distanzen wurden unter Verwendung der Maximum Composite Likelihood-Methode (Tamura *et al.*, 2004) mit der Software MEGA5.1 (Tamura *et al.*, 2011) berechnet. Alle Positionen, in denen weniger als 50% aller 22 23S rRNA-Gensequenzen von 2126 bp Länge ein Nukleotid enthielten, wurden zuvor aus dem zugrunde liegenden Alignment entfernt. Mb1 bis Mb10 bezeichnen die Positionen der entsprechenden Isolate.

### III.5.7 Nachweis methanogener Archaea der Gattung *Methanobacterium* mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

In Vorbereitung auf eine artspezifische Detektion von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> in Fermentersubstrat von landwirtschaftlichen BGA durch Sondentechnik, wurde zunächst der 23S rRNA-Leserahmen dieser Art sequenziert. Verschiedene Oligonukleotid-Sonden auf Basis der erhaltenen Sequenz wurden entwickelt und auf ihre *in situ*-Hybridisierungsspezifität hin untersucht. Nach vollständigem Erhalt von Sequenzinformationen der Referenzstämme (III.5.5) wurden gezielt artspezifische Nukleotidfolgen gesucht und auf ihre Eignung als Sonde geprüft.

#### III.5.7.1 Entwicklung spezifischer Oligonukleotid-Sonden

Als Grundlage zur Konstruktion einer ersten Sonde erfolgte zunächst die Erweiterung des für die 23S rRNA-Gensequenzierung genutzten, multiplen Alignments methanogener Archaea um das aus der „primer-walking“-Sequenzierung (II.2.3.3) resultierende 23S rRNA-Genfragment der Zielspezies *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Darin konnten zwei Regionen mit je 5 Nukleotidunterschieden zu den Sequenzen der nächsten Verwandten *Methanobrevibacter smithii* PS<sup>T</sup> und *Msh. stadmanae* MCB-3<sup>T</sup> gefunden werden: Mb1535Df und Mb1535C2f. Zur Überprüfung der Spezifität wurden diese potentiellen Sonden in einer PCR mit dem Temperaturprogramm MBFOR1 mit revers-Primern (Mb1535C2f/Mbfo4rvD, **Tab. 25** sowie Mb1535Df/1535Arv [5'-ATT AGC CGT CCT TAT GGA T-3']) gepaart, welche während des „primer-walking“-Ansatzes bereits zum Einsatz kamen. Beide Primer-Paarungen führten im DNA-Extrakt von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> mit 577 bp bzw. 655 bp zu einem Amplifikat von korrekter Länge. Da jedoch nur die Kombination mit Mbfo1535C2f auch aus einem DNA-Extrakt des *Methanobacterium* sp.-Isolats Mb1 ein Amplifikat ermöglichte (**Abb. 75**), konzentrierten sich die Arbeiten auf den Einsatz dieses Oligonukleotids als FISH-Sonde. Aufgrund schwacher Signalintensität sowie mangelnder Spezifität bei Einsatz dieses Oligonukleotids als Sonde Cy31535C2f für die Gattung *Methanobacterium* unter den im Rahmen der Vortests gewählten Bedingungen und Protokolle wurde ein weiterer Satz an Sonden mit Spezifität für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> erstellt. Neben einem Wechsel zur Anwendung des modifizierten Protokolls nach Daims *et al.* (II.2.6.2) wurden dazu 23S rRNA-Gensequenzen aus zwei veröffentlichten Gesamtgenomen von *Methanobacterium*-Arten (*Methanobacterium* sp. SWAN-1 und AL-21) bei der Entwicklung der Sonden Cy3.51535E1, Cy3.51535E2 und Cy3.51535E3 mit in das Alignment einbezogen und spezifische Sequenzbereiche herausgesucht. Zwei weitere Sonden wurden *in silico* zur



**Abb. 75: Spezifitätsüberprüfung von Oligonukleotiden auf Basis des 23S rRNA-Gens mittels PCR.** Mb1535Df und Mb1535C2f wurden mit einem passenden, unspezifischen revers-Primer gepaart und dann mittels PCR-Programm MBFOR1 ein 23S-Teilfragment aus DNA-Extrakten von verschiedenen Kulturen und Fermenterproben amplifiziert. Nur mit Mb1535C2f gelang die Amplifikation sowohl aus der Typstamm-Kultur, als auch aus dem Eigenisolat Mb1. <sup>1</sup>MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, <sup>2</sup>MS2<sup>T</sup> = *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>, <sup>3</sup>FE = *Mst. concilii* FE, <sup>4</sup>DMS1<sup>T</sup> = *Methanomethylovorans hollandica* DMS1<sup>T</sup>, <sup>5</sup>PS<sup>T</sup> = *Methanobrevibacter smithii* PS<sup>T</sup>, NieKK = Isolat *Msc. mazei* NieKK, Mb1 = Isolat *Methanobacterium* sp. Mb1, w/o = Spur unbesetzt, -- = Negativkontrolle, M = GeneRuler<sup>TM</sup> DNA-Marker.

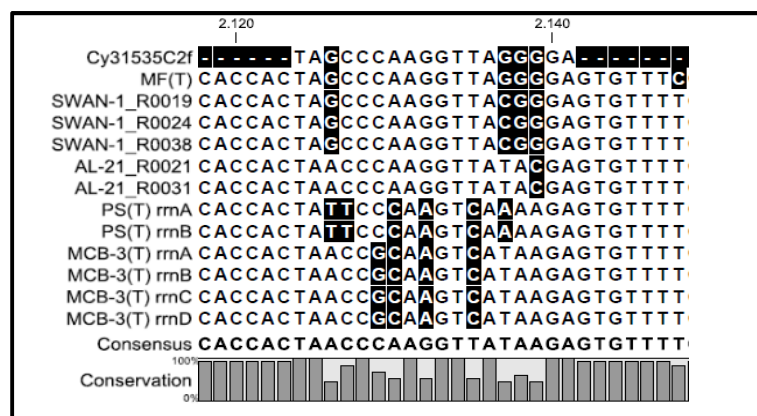
spezifischen Markierung des Isolats *Methanobacterium* sp. Mb1 erstellt. Dazu wurde zunächst die Gesamtsequenz des 23S rRNA-Gens aus dem vom Kooperationspartner Dr. Andreas Schlüter, CeBiTec Bielefeld, sequenzierten Genom dieses Eigenisolats sowohl mit den selbst sequenzierten Fragmenten des Typstammes *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> als auch des Isolats Mb1 (Fragmentlänge 2395 bp) verglichen und in das bestehende Alignment integriert. Die Gesamtgenom-Sequenzierung konnte das Ergebnis der Sequenzierung von Isolat Mb1 per „primer walking“-Methode bestätigen, es ergab sich eine Sequenzidentität von 99 %. Einzige Unterschiede stellten ein Nukleotidaustausch sowie zwei Leerstellen (sog. „Gaps“) in der „primer-walking“-Sequenz dar (**Abb. 76**). Der Vergleich der Genom abgeleiteten Sequenz mit dem 2767 bp-Fragment des 23S rRNA-Gens von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> offenbarte dagegen größere Unterschiede: Bei einer Sequenzidentität von 96 % wurden an 30 Positionen Leerstellen im Alignment eingefügt. Aus den Gesamt-Alignments unter Beteiligung von Sequenzen der erwähnten Arten wurden je eine Sonde zur Markierung des Eigenisolates Mb1 und des Typstammes *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (Cy3.5Mb1E2) sowie zur ausschließlichen Markierung des Eigenisolates Mb1 (Cy3.5Mb1D1) abgeleitet.



**Abb. 76: Sequenzunterschiede im 23S rRNA-Gen von *Methanobacterium* sp. Mb1.** Dargestellt ist der Vergleich des Sequenzergebnisses der „primer-walking“-Methode (Mb1) mit dem entsprechend annotierten Leserahmen aus der Gesamtgenom-Analyse des Isolats (Mb1 CeBiTec). Unterschiedliche Nukleotidpositionen sind **schwarz** hinterlegt. Zusätzlich angegeben sind Konsensus-Sequenz und der Konservierungs-Grad. Ausschnitt aus Gesamtalignment.

### III.5.7.2 Spezifitätstests zum Hybridisierungsverhalten entwickelter Oligonukleotid-Sonden

Die Oligonukleotid-Sonde **Cy31535C2f** stellte die erste auf Basis von 23S rRNA-Gensequenzinformationen entwickelte Sonde zur Detektion von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> dar und wurde zur Etablierung der FISH-Methodik eingesetzt. Die Nukleotidfolge konnte aus einem Alignment veröffentlichter Gensequenzen methanogener Archaea abgeleitet werden. In einer Nachbetrachtung unter Einbezug der Typstammsequenz der Zielspezies sowie der beiden in der Zwischenzeit veröffentlichten Genomsequenzen zweier nicht näher bestimmter *Methanobacterium* sp.-Arten AL-21 und SWAN-1 konnte die Bindestelle und Sequenzfolge in der Typstammsequenz verifiziert werden: Für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und den Stamm SWAN-1 konnte Sequenzidentität festgestellt werden, Stamm AL-21 zeigte nur einen Nukleotid-austausch, während *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> und *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> vier bzw. sechs Unterschiede in der Bindesteque aufwiesen (**Abb. 77**).

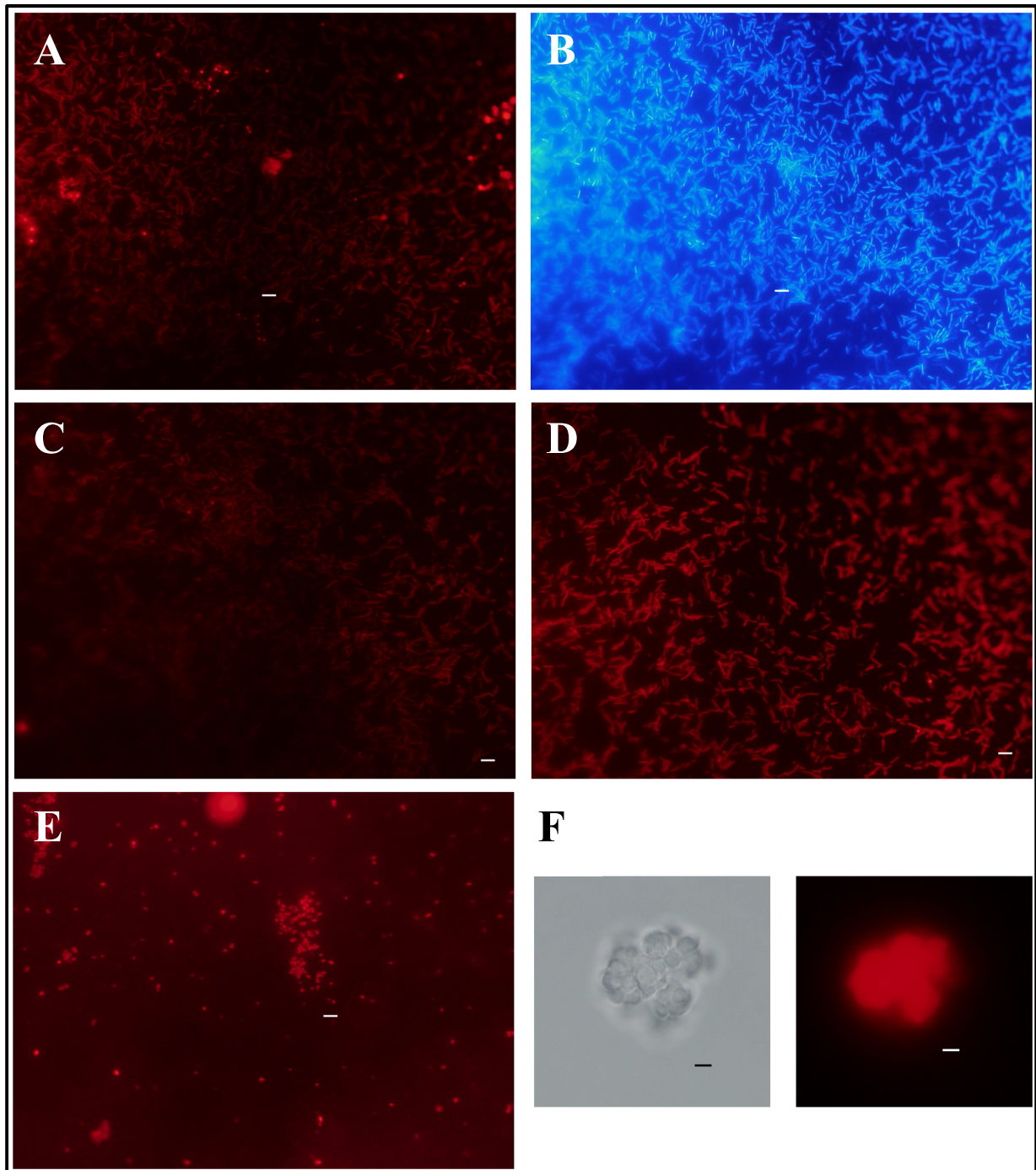


**Abb. 77: Sequenzvergleich der Sonde Cy31535C2f mit der Bindestelle in Vertretern verschiedener Gattungen.** MF(T) = Zielspezies *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, SWAN-1 = *Methanobacterium* sp. SWAN-1 (Leserahmen 19, 24 und 28), AL-21 = *Methanobacterium* sp. AL-21 (Leserahmen 21, 31), PS(T) = *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> (rRNA-Leserahmen A und B), MCB-3(T) = *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> (rRNA-Leserahmen A bis D). Unterschiedliche Nukleotidpositionen sind **schwarz** hinterlegt.

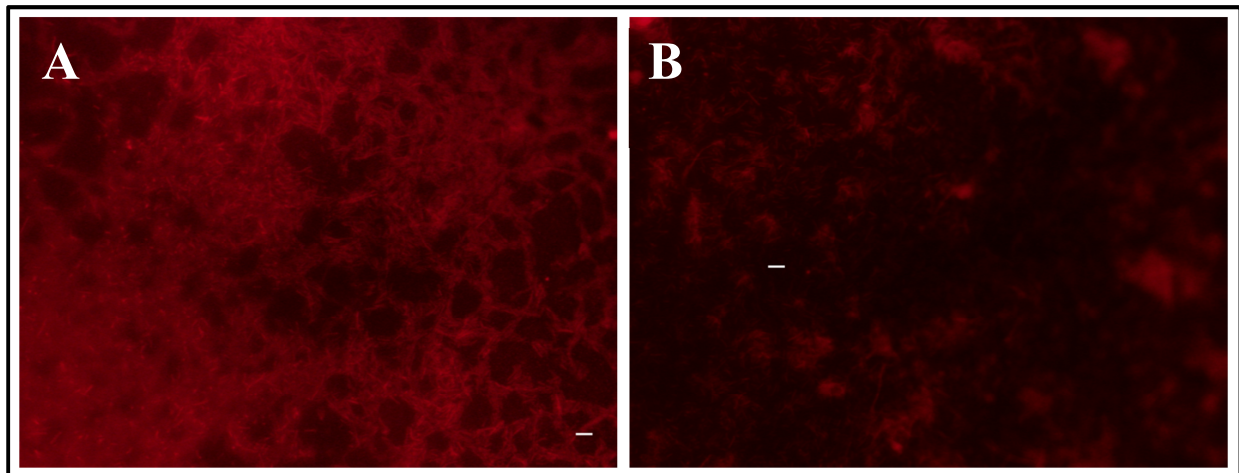
Im Rahmen von Vortests wurden die Sonde Cy31535C2f und die Positivkontroll-Sonde MB1174 auf Basis der 16S rRNA Gensequenz zur Hybridisierung nach einem Protokoll für methanogene Archaea (**Raskin et al., 1994**) sowie einem weiteren zur Hybridisierung von Spezies der Gattung *Methanosaeta* (**Tabatabei et al., 2009**) herangezogen. Mittels des Protokolls nach Tabatabei wurde die Hybridisierungsfähigkeit der Sonde an die Zielspezies *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> getestet und ein Vergleich der Signalintensität mit der Positivkontrolle gezogen. Eine Bindung beider Sonden konnte bestätigt werden, die Signalintensität und -stabilität der Positivkontrolle MB1174 war bei einer Belichtungszeit von 1,5 s deutlich besser (**Abb. 78A-D**). Die in der Literatur beschriebene Hybridisierung von MB1174 an *Msh. stadtmannae* MCB-3<sup>T</sup> konnte reproduziert werden (**Abb. 78E**). Daneben ergab sich unter diesen Bedingungen auch eine Fluoreszenzantwort nach einer Hybridisierung dieser Sonde mit Zellen des Eigenisolats *Msc. mazei* NieKK (**Abb. 78F**).

Auch unter Anwendung des Literatur-Protokolls nach Raskin konnte eine Hybridisierung von Cy31535C2f an *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Zellen beobachtet werden (**Abb. 79A**). Untersuchungen ergaben hier eine Mindest-Sondenkonzentration von 10 pM und eine maximale Signalintensität bei einem Anteil von 10 % Formamid im Hybridisierungspuffer. Die Signalintensität von Cy31535C2f war, wie zuvor, gering und trotz Antibleichmittel-Zugabe einem schnellen Signalverlust unterworfen. Neben der Hybridisierung an den Zielorganismus ergab sich zudem ein Fluoreszenzsignal in den zielfremden Organismenproben von *Msc. mazei* NieKK und *Msh. stadtmannae* MCB-3<sup>T</sup>. In Mischungen aus *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und *Msc. mazei* NieKK zeigten ebenfalls beide Organismen Fluoreszenz. Eine Erhöhung der Hybridisierungs- oder Waschttemperatur bis auf 53 °C ergab keine signifikante Verbesserung der Spezifität, weshalb bei den folgenden Sonden ein Umstieg auf das Protokoll nach **Daims et al. (2005)** erfolgte. Die Ergebnisse einer FISH-Analyse einer Reaktorprobe der BGA Wallhalben, welche mit Zellen der Zielspezies versetzt worden war, deuteten auf eine Anwendbarkeit der Methodik ab Verdünnungsstufen von 10<sup>-2</sup> an (**Abb. 79B**), da erst ab hier eine ausreichend klare und disperse Flüssigkeit in dem Substrat erreicht werden konnte, bei der eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung möglich war. Bei Reaktorproben höherer Viskosität war die Grenzverdünnung auf mindestens 10<sup>-3</sup> anzuheben.



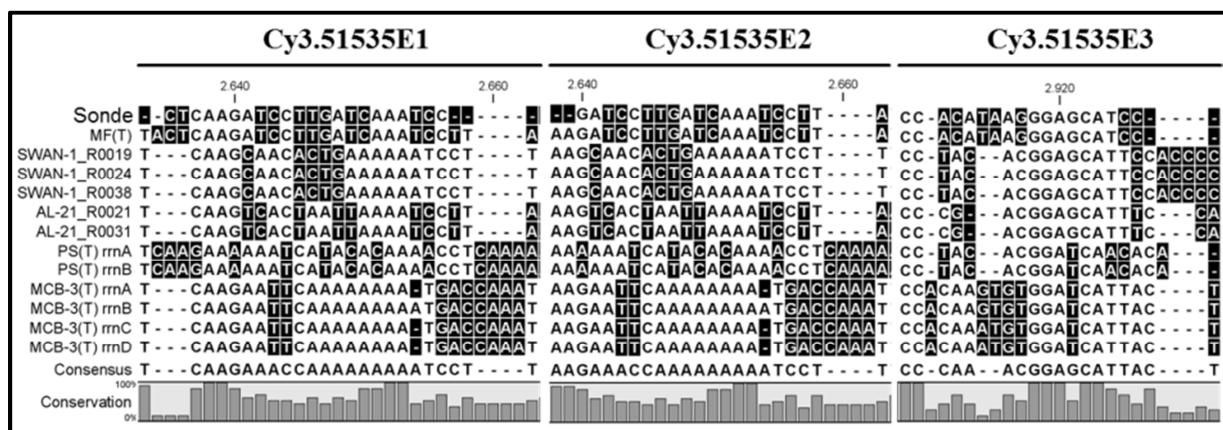


**Abb. 78: Hybridisierung von Cy31535C2f und MB1174 an methanogene Archaea.** Hybridisierung nach **Tabatabei et al. (2009)**. Fluoreszenzanregung nach Bindung der Sonde an *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (A) und nach DAPI-Gegenfärbung (B). Vergleich der Signalintensität der Sonde Cy31535C2f (C) und der Positivkontrolle MB1174 (D) bei einer Belichtungszeit von 1,5 s. Fluoreszenzsignale der Sonde MB1174 bei Proben von *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> (E) und *Msc. mazei* NieKK (F, links Hellfeld-, rechts Fluoreszenzaufnahme). Maßstab = 5 µm.



**Abb. 79: Hybridisierung von Cy31535C2f an methanogene Archaea und Reaktorproben.** Fluoreszenzsignal nach Hybridisierung an *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (A) sowie einer verdünnten und künstlich mit dem Zielorganismus versetzten Substratprobe (B). Hybridisierung nach **Raskin et al., 1994**. Maßstab = 5 µm.

Die unter Zuhilfenahme erweiterter Vergleichssequenzen hergeleiteten Sonden **Cy3.51535E1**, **Cy3.51535E2** und **Cy3.51535E3** waren gegen *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> als Zielorganismus gerichtet. Deren Sequenzen wiesen eine Reihe unterschiedlicher Nukleotidpositionen zu den für ein Vergleichsalignment herangezogenen Sequenzen nah verwandter methanogener Archaea auf. Während Cy3.51535E1 gegenüber Cy3.51535E2 nur in der Sequenz verschoben ist, hybridisiert Cy3.51535E3 *in silico* an einen anderen Lokus und überspannt im Alignment eine Lückenregion von *Methanobacterium* sp. SWAN-1 und AL-21 sowie *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup>. Nachfolgend sind die Bindestellen (**Abb. 80**) und Hybridisierungsergebnisse (**Tab. 52**) der drei Sonden mit verschiedenen *Methanobacterium* sp.-Arten zusammengefasst. Dabei erwies sich unter den nach Daims modifizierte Hybridisierungsbedingungen eine Formamid-



**Abb. 80: Vergleich der Sondensequenzen von Cy3.51535E1, Cy3.51535E2 und Cy3.51535E3 mit entsprechenden Hybridisierungsstellen in Vertretern verschiedener Gattungen methanogener Archaea.** MF(T) = Zielspezies *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, SWAN-1 = *Methanobacterium* sp. SWAN-1 (Leserahmen 19, 24 und 28), AL-21 = *Methanobacterium* sp. AL-21 (Leserahmen 21, 31), PS(T) = *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> (rRNA-Leserahmen A und B), MCB-3(T) = *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> (rRNA-Leserahmen A bis D). Unterschiedliche Nukleotidpositionen sind **schwarz** hinterlegt.

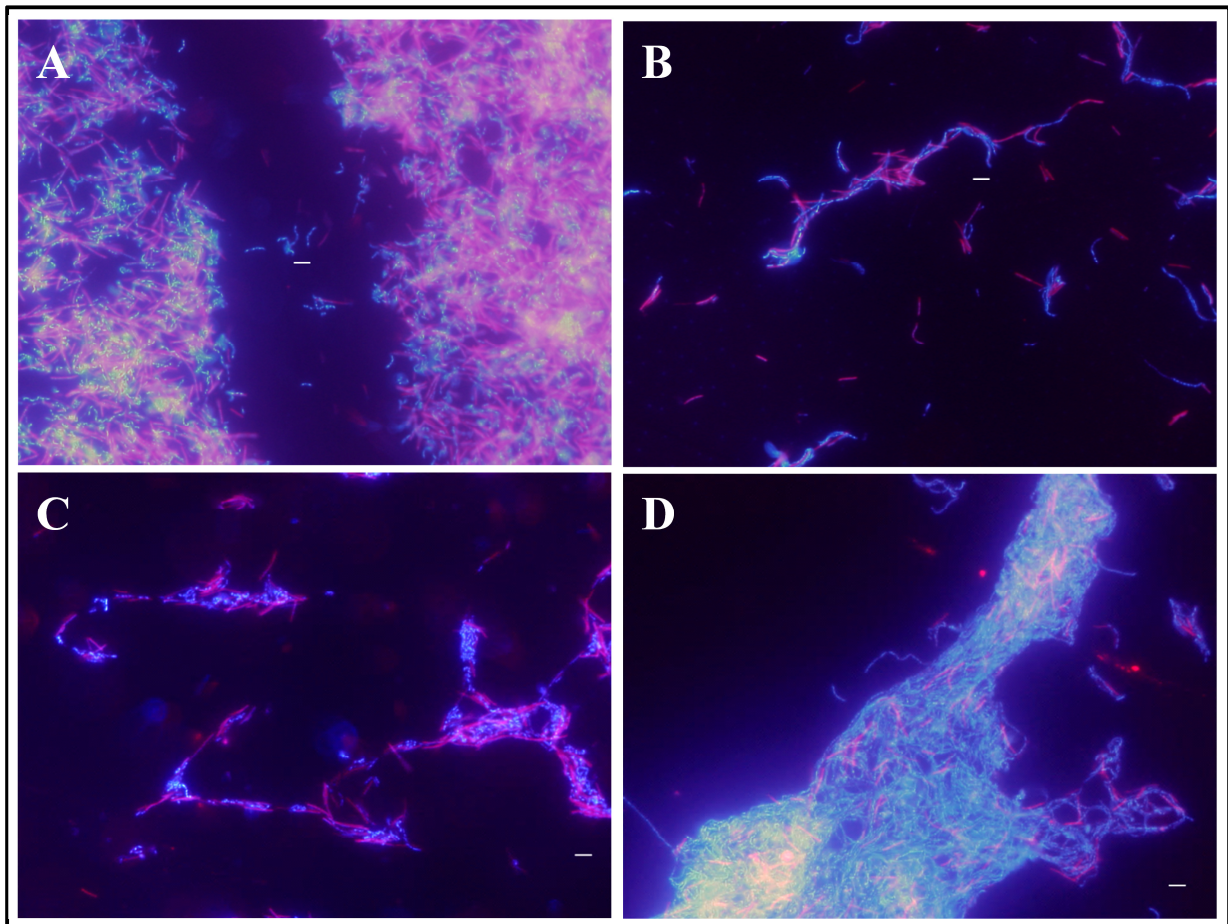
konzentration von 20 % (v/v) im Hybridisierungspuffer für Cy3.51535E1 als ideal, die Sonden Cy3.51535E2 und Cy3.51535E3 zeigten die beste Hybridisierungsfähigkeit bei 5 % bzw. 30 % (v/v).

**Tab. 52: Hybridisierungseffizienz der Oligonukleotidsonden Cy3.51535E1, Cy3.51535E2 und Cy3.51535E3 in Vertretern der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanosphaera*.**

Sonde	Teststämme <sup>1)</sup>												
	Mb1	MF <sup>T</sup>	M.o.H. <sup>T</sup>	P2St <sup>T</sup>	H2-LR <sup>T</sup>	F <sup>T</sup>	Mic6c05 <sup>T</sup>	169 <sup>T</sup>	Mic5c12 <sup>T</sup>	A8p <sup>T</sup>	Spike	MCB-3 <sup>T</sup>	PS <sup>T</sup>
Cy3.51535E1	-	+	-	-	-	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+/-
Cy3.51535E2	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
Cy3.51535E3	ND	+	-	-	-	+/-	ND	+/-	+/-	ND	+	+	+/-

<sup>1)</sup>Mb1 = Isolat *Methanobacterium* sp. Mb1, MF<sup>T</sup> = *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, M.o.H.<sup>T</sup> = *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, P2St<sup>T</sup> = *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup>, H2-LR = *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup>, F<sup>T</sup> = *Mb. palustre* F<sup>T</sup>, Mic6c05<sup>T</sup> = *Mb. ferruginis* Mic6c05<sup>T</sup>, 169<sup>T</sup> = *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup>, Mic5c12<sup>T</sup> = *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup>, A8p<sup>T</sup> = *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup>, Spike = künstlich mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> versetzte Biogasanlagen-Probe. Fremdgattungen: MCB-3<sup>T</sup> = *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup>, PS<sup>T</sup> = *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup>. Qualitative Sondenhybridisierung: - keine, +/- = schwache und + gute, Zielspezies vergleichbare Bindung. ND = nicht durchgeführt.

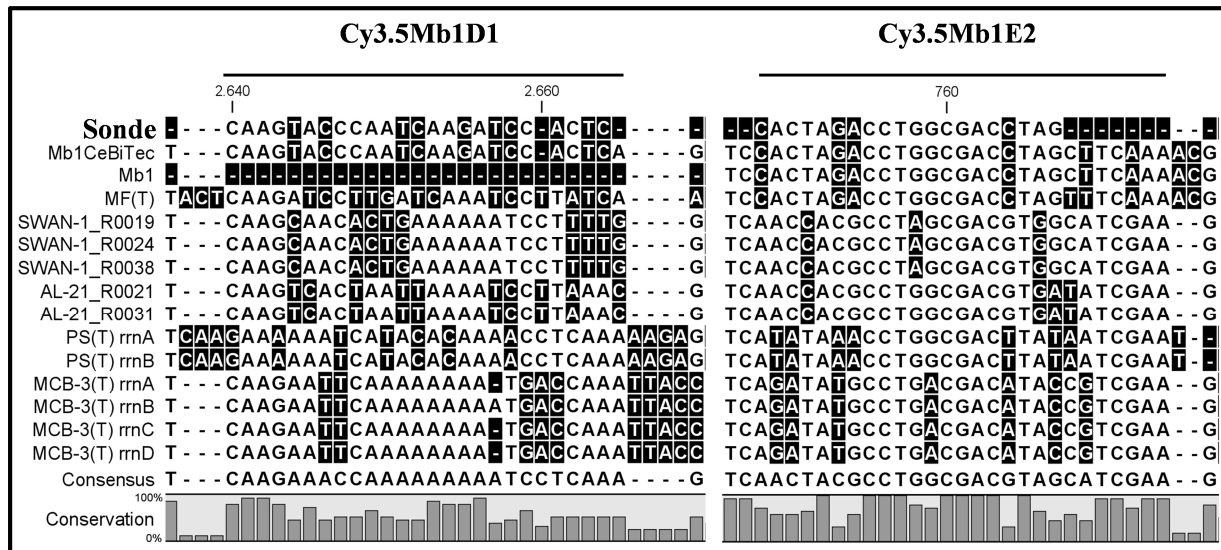
Alle drei Sonden hybridisierten mit Zellen der Zielspezies. Die Bindung der Sonde Cy3.51535E3 war in der Praxis jedoch qualitativ schlechter als bei den übrigen Sonden, weswegen diese vorrangig getestet wurden. Die Sonden folgten dabei in Bezug auf die Hybridisierungseffizienz dem 16S rRNA-Gen-basierten Stammbaum (**Abb. 63**): Während die Sonde Cy3.51535E1 die im Baum nahe zur Zielspezies positionierten Arten *Mb. ferruginis* Mic6c05<sup>T</sup>, *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> und *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> mit nahezu gleicher Effizienz hybridisierte, zeigte Cy3.51535E2 hier bereits eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität. *Mb. palustre* F<sup>T</sup>, nächster Verwandter im Stammbaum, wurde von beiden Sonden schwächer gebunden als diese Zielspezies. *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup>, *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup> und *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> wurden nicht markiert. Aufgrund der morphologischen Unterschiede zwischen Zielspezies und *Mb. uliginosum* bzw. *Mb. bryantii* konnte in Organismenmischungen gezeigt werden, dass eine spezifische Hybridisierung mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> vorlag (**Abb. 81**). Eine Hybridisierung mit dem Eigenisolat Mb1 war hingegen nicht gegeben, während eine Detektion von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Zellen nach deren Zugabe zu Biogasanlagen-Proben im Rahmen von Wiederfindungsexperimenten möglich war. Die Sonden hybridisierten mit den Vertretern der nächst verwandten Gattungen, *Msh.*



**Abb. 81:** Hybridisierungsspezifität der Oligonukleotidsonden Cy3.51535E1 (A, B) und Cy3.51535E2 (C, D). Hybridisierungsexperimente an Organismenmischungen aus der Zielspezies mit *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup> (A, C) oder *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> (B, D) vor dem Hintergrund einer DAPI-Gesamtzellfärbung. Ausschließlich gerade Stäbchen in kurzen Ketten zeigen magentafarbene Doppelmarkierung, während die im Überschuss vorhandenen Morphologien der Nicht-Zielspezies nur die blaue DAPI-Fluoreszenz aufweisen. Maßstab = 5 µm.

*stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> und *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup>, wobei unter den getesteten Bedingungen für *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> eine Zielspezies-vergleichbare, für *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> eine schwächere Fluoreszenzintensität verzeichnet wurde.

Für den parallelen Nachweis von Eigenisolat Mb1 und *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> wurde die Sonde Cy3.5Mb1E2 unter Einbezug der entsprechenden 23S rRNA-Gensequenzen (III.5.7.1) entworfen. Zur spezifischen Detektion des Eigenisolats Mb1 wurde die Sonde Cy3.5Mb1D1 abgeleitet. Einen Überblick über die Bindestellen der Oligonukleotide findet sich in **Abb. 82**. Hybridisierungsexperimente mit diesen Oligonukleotiden ergaben einen idealen Formamidanteil von 25 % - 30 % (v/v) im Puffer bei einer Hybridisierungstemperatur von 46 °C. Unter diesen Konditionen durchgeführte Spezifitätstests zeigten entgegen der *in silico*-Vorhersage eine erfolgreiche Detektion von Zellen des Typstammes und des Eigenisolats Mb1 durch beide Sonden.



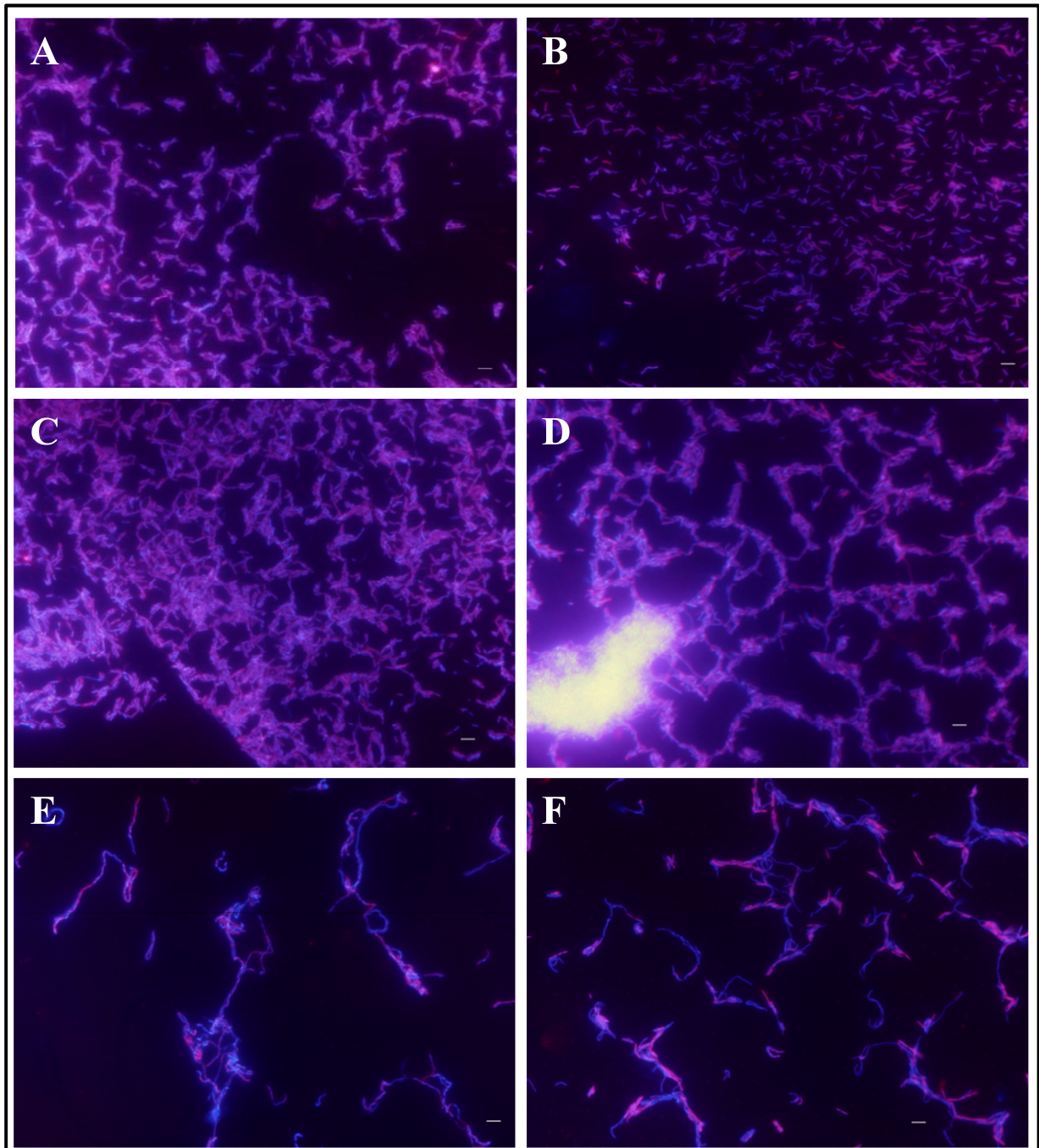
**Abb. 82:** Vergleich der Sondensequenzen von Cy3.5Mb1D1 und Cy3.5Mb1E2 mit entsprechenden Hybridisierungsstellen in Vertretern verschiedener Gattungen methanogener Archaea. Mb1CeBiTec = aus Gesamtgenom abgeleitete Sequenz des Eigenisolats Mb1, Mb1 = „primer-walking“-abgeleitete Sequenz des Eigenisolats Mb1, MF(T) = Zielspezies *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, SWAN-1 = *Methanobacterium* sp. SWAN-1 (Leserahmen 19, 24 und 28), AL-21 = *Methanobacterium* sp. AL-21 (Leserahmen 21, 31), PS(T) = *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> (rRNA-Leserahmen A und B), MCB-3(T) = *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> (rRNA-Leserahmen A bis D). Unterschiedliche Nukleotidpositionen sind **schwarz** hinterlegt.

Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale nach Cy3.5- und DAPI-Anregung führte zu einer nahezu vollständigen Doppelmarkierung (**Abb. 83A-D**). Alle übrigen untersuchten Referenzstämme wurden ebenso von beiden Sonden gebunden und emittierten stabile Fluoreszenzsignale (**Tab. 53**). Stringenztests durch beispielhafte Hybridisierung von Cy3.5Mb1D1 an *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> bei 40 % (v/v) Formamidanteil und gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur auf 51 °C ergab eine Reduktion der Fluoreszenzintensität (**Abb. 83E**). Eine Cy3.5Mb1E2-Hybridisierung an *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> (**Abb. 83F**), *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> und *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> resultierte unter Standardbedingungen in schwächeren Signalausbeuten, als bei Anwendung des Cy3.5Mb1D1-Oligonukleotids.

**Tab. 53:** Hybridisierungseffizienz der Oligonukleotidsonden Cy3.5Mb1D1 und Cy3.5Mb1E2 in Vertretern der Gattungen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* und *Methanosphaera*.

Sonde	Teststämme <sup>1)</sup>												
	Mb1	MF <sup>T</sup>	M.o.H. <sup>T</sup>	P2St <sup>T</sup>	H2-LR <sup>T</sup>	F <sup>T</sup>	Mic6c05 <sup>T</sup>	169 <sup>T</sup>	Mic5c12 <sup>T</sup>	A8p <sup>T</sup>	Spike	MCB-3 <sup>T</sup>	PS <sup>T</sup>
Cy3.5Mb1D1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Cy3.5Mb1E2	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+/-

<sup>1)</sup>Legende der Stammbezeichnungen und Kategorien der Fluoreszenzintensität, vgl. **Tab. 52**.



**Abb. 83: Hybridisierung der Oligonukleotidsonden Cy3.5Mb1D1 (A, B, E) und Cy3.5Mb1E2 (C, D, F) mit Organismenmischungen und Reinkulturen.** Überlagerung von Fluoreszenzsignalen nach Anregung der Fluorophore Cy3.5 und DAPI bei Hybridisierung mit dem Eigenisolat Mb1 (A, C) bzw. mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (B, D) und mit *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> nach Erhöhung der Formamidkonzentration auf 40% (v/v) (E). Hybridisierung mit einer Organismenmischung aus *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und *Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> (F). Maßstab = 5 µm.

### III.5.8 Quantifizierung methanogener Archaea in Fermentersubstrat von NawaRo-BGA

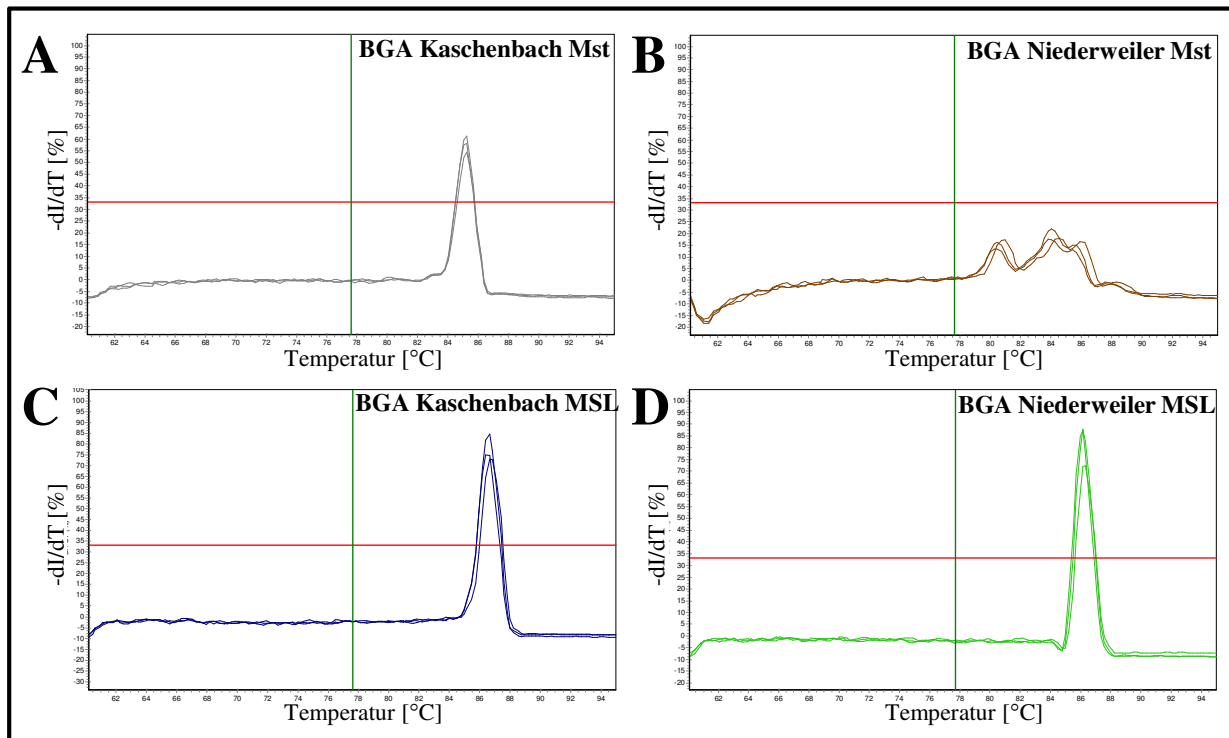
Die Zellzahl methanogener Archaea der Ordnungen Methanobacteriales, Methanosarcinales und Methanomicrobiales sowie von Vertretern der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* wurde mittels quantitativer PCR in DNA-Extrakten von Fermenterproben aller fünf BGA bestimmt. Anhand der verwendeten Primer-Sets konnten alle fünf Gruppen nachgewiesen und durch erstellte Kalibrierungsgeraden (**Tab. 54**) quantifiziert werden. Die Triplikate der Verdünnungsstufen aller Kalibrierungsgeraden zeigten nur geringfügig abweichende  $c_t$ -Werte und resultierten daher in einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 > 0,98$ . Zu dieser guten Reproduzierbarkeit ergab sich jedoch aus den Kalibrierungsgeraden der qPCR-

**Tab. 54: Statistik der Quantifizierungsläufe und korrespondierender Kalibrierungsgeraden**

Spezifität	Primer-Set	Geradengleichung	Effizienz	$R^2$
<i>Methanosarcina</i> sp.	Msar	$f(y) = -3,2487x + 39,74$	103,1 %	0,9894
Methanomicrobiales	MMB	$f(y) = -3,8618x + 48,178$	81,5 %	0,9975
Methanobacteriales	MBT	$f(y) = -3,657x + 47,058$	87,7 %	0,9817
Methanosarcinales	MSL	MMB und MBT <sup>1)</sup>		

<sup>1)</sup>Quantifizierung mittels je einer Kalibrierungsgeraden aus *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>- (MBT-Primerset) und *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>-Zellen

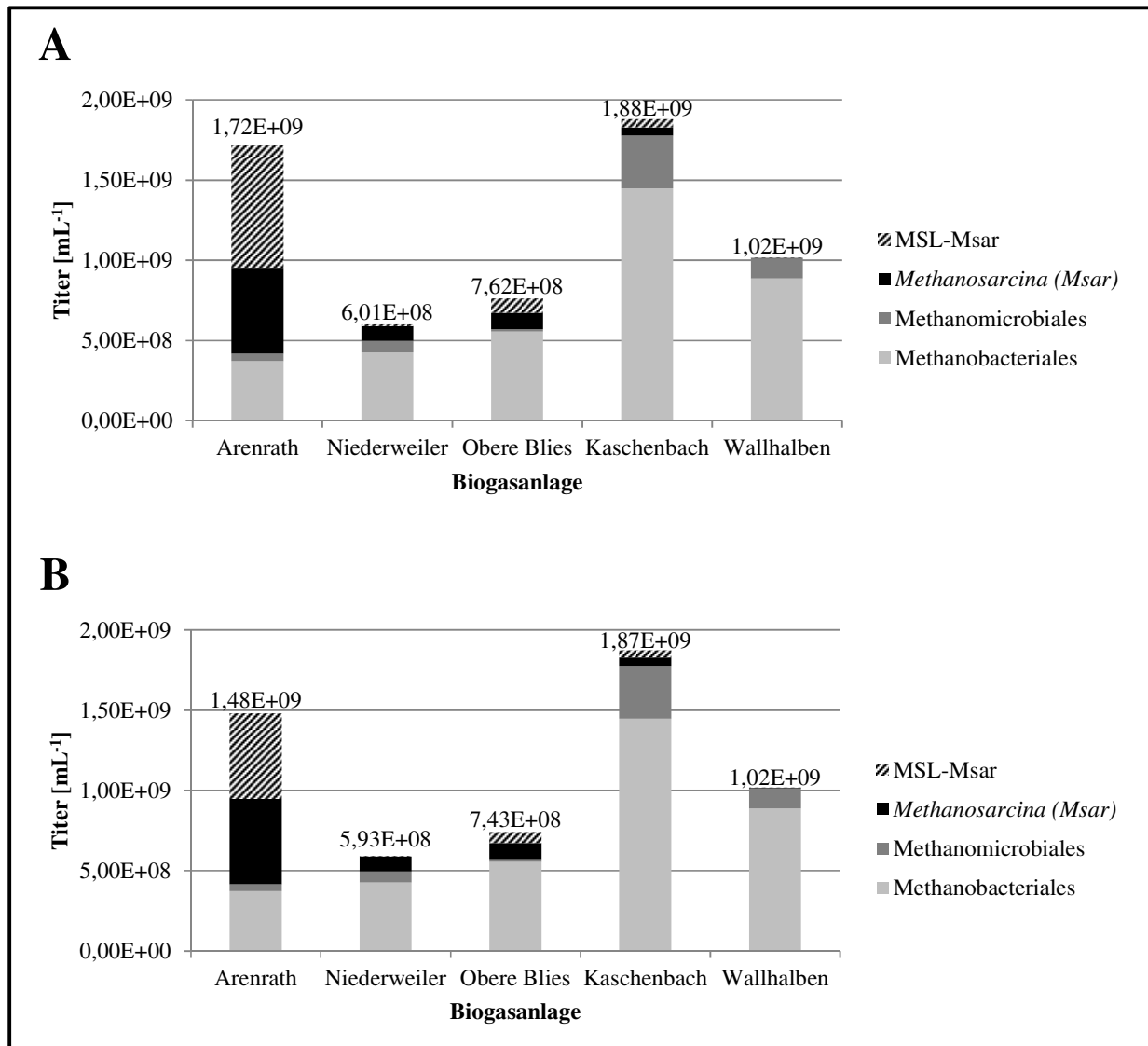
Läufe zur Quantifizierung mit den Primersets MBT und MMB eine Amplifikationseffizienz deutlich unterhalb von 100 %. Trotz vorangestelltem Gradiententest zum Ermitteln der optimalen Hybridisierungstemperatur konnte bei Anwendung des Primerpaars mit *Methanosaeta* sp.-Spezifität (**Tab. 24**) auf Fermenter-DNA-Extrakte ausschließlich für die BGA Kaschenbach eine zuverlässige Quantifizierung (**Abb. 84A**) erreicht werden. Die Schmelzkurvenanalyse von qPCR-Läufen der übrigen Fermenterproben ergab leichte Nebenamplifikatbildung im Fall der BGA Arenrath und Obere Blies. Unspezifische Amplifikate ohne klaren Fluoreszenzpeak in einem breiten Temperaturbereich zwischen 80 °C und 86 °C zeigten die Proben der BGA Niederweiler (**Abb. 84B**) und Wallhalben. Aus diesem Grund wurde der Anteil von Vertretern der Gattung *Methanosaeta* indirekt ermittelt. Dafür wurde der Anteil an Organismen der Ordnung Methanosarcinales mittels des MSL-Primersets bestimmt und von diesem der Anteil an Vertretern der Gattung *Methanosarcina* subtrahiert. Da aus der Ordnung Methanosarcinales bislang nur die Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* in BGA detektiert wurden, ergibt sich so ein Titer für die Gattung *Methanosaeta*. Die Schmelzkurvenanalyse für das MSL-Primerpaar zeigte in den Fermenterproben die geforderten diskreten Peaks ohne Nebenamplifikate (**Abb. 84C, D**).



**Abb. 84: Schmelzkurvenvergleich beispielhafter Fermenterproben in qPCR-Analysen mittels der Primerpaare Mst (A, B) und MSL (C, D).** Kontinuierliche Erhöhung der Temperatur mit der Zeit führt zur Denaturierung der Amplifikate aus der vorgeschalteten qPCR-Phase. Durch die Freisetzung des interkalierenden Fluorophor SYBR Green I endet die Fluoreszenzemission und es kommt zum Einbruch der detektierten Gesamtfluoreszenz. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität mit der Zeit ist hier negativ wiedergegeben, um Spezifitätsanalysen zu vereinfachen. Teil B gibt beispielhaft die unspezifische Amplifikation durch das Mst-Primerpaar in einer qPCR-Analyse der BGA Niederweiler wider.

Das Erstellen einer Kalibrierungsgerade über das in auszählbarer Einzelzellsuspension wachsende Archaeon *Msc. mazei* Gö scheiterte an einer schlechten PCR-Effektivität von 67 % im Zusammenspiel mit dem MSL-Primerpaar. Daher wurden Standardgeraden sowohl mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (MBT-Primerpaar) als auch mit *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> (MMB-Primerpaar) konstruiert und für die Quantifizierung der MSL-Amplifikate eingesetzt. Damit wurden Kalibrierungsgeraden auf Basis kokkenförmiger Mikroorganismen mit labiler Zellwand (*Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>) als Modell für die kokkoiden *Methanosarcina* sp., sowie stäbchenförmige Archaea mit rigider Zellwand (*Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>) als Näherung an die stäbchenförmigen *Methanosaeta* sp. in Zellscheiden, erstellt. In **Abb. 85** sind die Quantifizierungsergebnisse der Fermenterproben unter Anwendung beider Kalibrierungsgeraden zusammengefasst.





**Abb. 85: Quantifizierung methanogener Archaea in Biogasanlagen. Berechnung des Anteils an Methanosarcinales nach Kalibrierungsgeraden aus *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (MBT-Primer, A) und *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> (MMB-Primer, B). Angegeben sind Durchschnittswerte aus Dreifachbestimmung. *Methanosaeta* sp. berechnet als Wert der Differenz aus Methanosarcinales-Titer und *Methanosarcina* sp.-Titer. Angaben bezogen auf 1 mL Flüssigphase des Fermentersubstrats.**

Die Summen aus den Durchschnittspopulationsgrößen der vier Gruppen differierten nur leicht mit der jeweils gewählten Berechnungsgrundlage der Methanosarcinales. Sie lagen nach deren Quantifizierung über *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> zwischen  $5,93 \times 10^8$  Zellen mL<sup>-1</sup> (BGA Niederweiler) und  $1,87 \times 10^9$  Zellen mL<sup>-1</sup> (BGA Kaschenbach). Bei Quantifizierung mittels *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-basierter Kalibrierungsgerade stiegen die Titer auf  $6,01 \times 10^8$  Zellen mL<sup>-1</sup> bzw.  $1,88 \times 10^8$  Zellen mL<sup>-1</sup> an.

Mit Ausnahme der Fermenterprobe der BGA Arenrath bildeten die Methanobacteriales in allen übrigen Proben die dominierende Organismengruppe unter den methanogenen Archaea. In Extrakten der BGA Arenrath wurde die Dominanz der Ordnung Methanosarcinales festgestellt. Nach Abzug des *Methanosarcina*-Anteils ergaben sich nahezu identische Titer

von  $5,32$  bzw.  $5,34 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  für die beiden Gattungen dieser Ordnung. Bei Quantifizierung über die *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Kalibrierungsgerade stieg der Anteil von *Methanosaeta* sp. auf  $7,71 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  an. In den Proben der übrigen BGA machten Vertreter der Gattung *Methanosaeta* mit Zellzahlen von  $5,95 \times 10^5$  bis  $8,9 \times 10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  (Kalibrierungsgerade *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>) bzw.  $8,91 \times 10^5$  bis  $6,93 \times 10^7$  (Kalibrierungsgerade *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>) nur einen geringen Anteil an der Summenpopulation aus. Die größte Population von Archaea der Ordnung Methanomicrobiales wurde in den BGA Kaschenbach ( $3,29 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) und Wallhalben ( $1,25 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) detektiert. In den verbleibenden Anlagen waren sowohl die Methanobacteriales als auch Vertreter der Gattung *Methanosarcina* zahlreicher vorhanden. Es ergaben sich für die Ordnung Methanobacteriales Zelltitert zwischen  $3,73 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  (BGA Arenrath) und  $1,45 \times 10^9$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  (BGA Kaschenbach). Die Titer von *Methanosarcina* sp. schwankten in einem Bereich von  $5,1 \times 10^7$  (BGA Kaschenbach) und  $5,32 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  (BGA Arenrath). Zusammenfassend ergab die qPCR-Analyse in vier der fünf Anlagen eine Dominanz von Vertretern hydrogenotropher Ordnungen methanogener Archaea. Eine genaue Auflistung der Zellzahlen, sortiert nach Gruppe und Fermenter, findet sich im **Anhang**.

## Kapitel IV - Diskussion

### IV.1 Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen

Methanogene Archaea nehmen durch die Katalyse der letzten Stufe des anaeroben Abbauprozesses von organischem Material eine Schlüsselrolle im Fermentationsprozess von nachwachsenden Rohstoffen zu Biogas in landwirtschaftlichen BGA ein. Wissenschaftliche Studien beschreiben in diesem Zusammenhang wiederholt Populationen methanogener Archaea, welche sich aus Vertretern vergleichsweise weniger Gattungen zusammensetzen. Aufgrund der komplexen Vielzahl an Prozessparametern, Bauformen und Substratmischungen sowie ihrer jeweiligen Einflüsse auf die vorliegende mikrobielle Population einer BGA variiert jedoch sowohl deren qualitative als auch quantitative Zusammensetzung. In der vorliegenden Arbeit konnten die dominierenden Gattungen methanogener Archaea innerhalb der Biozönose von mesophilen Praxis-BGA identifiziert werden. Mittels mehrphasiger, molekularbiologischer Ansätze gelang übereinstimmend der Nachweis von Vertretern der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* in den Substratproben. Die Ergebnisse des Screenings der 16S rRNA Genfragment-Klondatenbanken der BGA Arenrath und der Beprobung der BGA Wallhalben des Jahres 2010 zeigten im Vorfeld die Dominanz durch *Mcu. bourgensis*. Am Beispiel einer zweiphasigen Pilotanlage zur Kofermentation von Tricicale und Rindergülle konnte **Klocke et al. (2008)** mittels Klonbibliotheken und ARDRA-Screening eine Dominanz der Gattung *Methanoculleus* ebenso zeigen. Daneben wiesen die Klonbibliotheken seiner Studie Vertreter der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* auf. Während *Methanosaeta* sp. auch in der Klonbibliothek der BGA Arenrath detektiert werden konnte, wurde *Methanosarcina* sp. hier zunächst nicht nachgewiesen. Auch eine DGGE-Analyse der Biozönose einer Anlage zur Fermentation von Schweinegülle als Hauptsubstrat ergab *Mcu. bourgensis* als dominante methanogene Spezies (**Liu et al., 2009**), weiterhin beschreiben die Autoren den Nachweis der Arten *Msp. hungatei* und *Msc. barkeri*. Mit eigenen DGGE-Untersuchungen wurde die Verbreitung von *Mcu. bourgensis* bzw. *Methanoculleus* sp. neben der BGA Arenrath auch in allen anderen Proben, insbesondere aber in denen der BGA Wallhalben und Kaschenbach, gezeigt. Die qPCR-Analysen dieser Fermenter ergaben unter den getesteten Anlagen den größten Anteil an Archaea der Ordnung Methanomicrobiales, zu welcher u.a. auch die Gattung *Methanoculleus* zugeordnet wird. Erfahrungen aus den Isolierungsversuchen stimmen mit diesen molekularbiologischen Ergebnissen überein: Das im Rahmen der Arbeit gewonnene Isolat *Mcu. bourgensis* Mcu(1) entstammte aus der BGA Wallhalben, Anreiche-

rungskulturen von Zellen mit *Methanoculleus*-Morphologie konnten in hoher Reinheit auch aus Substrat der BGA Kaschenbach gewonnen werden. *Msp. hungatei* konnte per DGGE auch in drei der fünf im Rahmen dieser Arbeit beprobten Anlagen (BGA Obere Blies, Kaschenbach und Arenrath) nachgewiesen werden, in den Klonbibliotheken wurde dieser Organismus jedoch nicht gefunden. Eine Erklärung liegt möglicherweise in dem zugrunde liegenden Genfragment. In Untersuchungen von **Nettmann et al. (2008)** wurde *Methanospirillum* sp. in 16S rRNA Genfragment-Bibliotheken nicht gefunden, eine Bibliothek auf Basis des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit der MCR enthielt dagegen einen Vertreter. Ein ähnlicher Sachverhalt konnte in dieser Studie für die hydrogenotrophe Gattung *Methanobrevibacter* beobachtet werden: Während die MCR-basierten Klonbibliotheken zu 9 % bzw. 16 % Klone dieser Gattung enthielten, waren es in der 16S rRNA-Datenbank nur 4 %. Daneben könnte die Varianz der eingesetzten Restriktionsenzym-Kombinationen ein effizienteres Screening der Klondatenbank durch verbesserte Restriktionsmuster-Differenzierung ermöglichen. Mit der modifizierten ARDRA-Variante unter Durchführung des *SmaI/XhoI*-Doppelpolverdau eines 16S rRNA-Genfragments von 1444 bp Länge konnte bereits eine verbesserte Unterscheidung der Restriktionsmuster beispielhafter Typstämme aus jeder der vier nachgewiesenen Gattungen gezeigt werden. Da die Familie Methanospirillaceae zur Ordnung Methanomicrobiales gehört, war eine Detektion von *Msp. hungatei* in den qPCR-Analysen der fünf Praxis-BGA mittels des MMB-Primerpaares nur gemeinsam mit *Mcu. bourgensis* möglich. Daher ist in den drei genannten Fermentern ein geringerer Anteil an Vertretern der Gattung *Methanoculleus* zu erwarten, als es der quantifizierte Methanomicrobiales-Titer suggeriert. Dennoch deutet die Detektion dieser Gattung in allen getesteten Anlagen sowie der Vergleich der Bandenstärken innerhalb von DGGE-Analysen auf die Dominanz von *Methanoculleus* sp. innerhalb der über das MMB-Primerpaar erfassten Population hin. Die Charakterisierung der Methan produzierenden mikrobiellen Gemeinschaften von BGA, welche mit einer Kombination aus Maissilage, Roggen und Gülle (**Kröber et al., 2009**) bzw. Kleinbeimengung von Hühnerkot (**Krause et al. 2008**) beschickt wurden, ergaben in beiden Fällen eine Dominanz der Gattung *Methanoculleus*, insbesondere der Art *Mcu. bourgensis*, innerhalb der archaeellen Subpopulation. Dabei erfolgten die Analysen mittels der 454-pyrosequencing Technologie, in der Studie von Kröber et al. unterstützt durch 16S rRNA Amplicon-Bibliotheken.

Die Klonbibliothek der BGA Wallhalben aus dem Jahre 2011 zeigte im Vergleich zu ihrer Vorjahresversion eine deutliche Zunahme der Diversität methanogener Archaea. Mit dem Rückgang der zuvor dominanten Gattung *Methanoculleus* wurde hier die Dominanz der Gattung *Methanobacterium* sowie das Aufkommen eines repräsentativen Klons der Gattung

*Methanosarcina* festgestellt. Diese Zusammensetzung wurde im vergleichbaren Maße auch über die qPCR wiedergegeben. Die einzige Bande einer DGGE-Analyse wurde dagegen *Mcu. bourgensis* zugeordnet. Diese Widersprüche lassen sich auflösen: Da die Zusammensetzung der Fermenterbiozönose nicht statisch verbleibt, sondern einen zeitlich hoch dynamischen Prozess darstellt, erlauben molekularbiologische Methoden wie DGGE, ARDRA und qPCR nur Momentaufnahmen der Diversität zu den diskreten Zeitpunkten der Probennahme. Eine kontinuierliche Beschreibung der Population wird daher erschwert. In Verbindung mit einem Abgleich mit dem Betriebsbuch der Anlage könnten dennoch Rückschlüsse auf die Auswirkungen von Baumaßnahmen und Prozessparametern auf die Zusammensetzung der Biozönose gezogen werden. Trotz einer zuverlässigen Bestimmung dominanter Gattungen methanogener Archaea aus BGA-Substrat ergab sich im Laufe der ARDRA-Screenings des Met86f/Met1340r-amplifizierten 1240 bp-Fragmentes das Problem der Zuordnung auf Art-Ebene. Die repräsentativen Klone der Restriktionsmustergruppen wiesen häufig zu mehreren Arten einer Gattung Sequenzidentität oberhalb des 97 %-Grenzwertes auf, welcher als Kriterium der Zugehörigkeit zu einer Art vorausgesetzt wird (**Stackebrandt und Goebel, 1994**). Auch die Anwendung des modifizierten ARDRA-Protokolls ergab in diesem Punkt keine Verbesserung, sodass unter Beibehaltung dieses Grenzwertes die sichere Zuweisung eines gegebenen Restriktionsmusters methanogener Archaea nur auf Gattungsebene möglich ist. Für manche bakterielle Gattungen wie *Rhizobium* (**Sullivan et al., 1996**), *Bacillus* (**Fox et al., 1992**), *Acetobacter*, *Asia*, *Gluconobacter* und *Gluconacetobacter* (**Cleenwerck und De Vos, 2008**) sind Organismen bekannt, welche trotz einer 16S rRNA-Gensequenz-Identität von über 97 % verschiedenen Arten zugeordnet werden. Das vermehrte Aufkommen von Gesamtgenomsequenzen macht die gegenwärtige Speziesdefinition zunehmend von multiplen Faktoren, wie dem Grad an (digitaler) DNA-DNA-Hybridisierung (DDH) und der durchschnittlichen genomischen Nukleotididentität (ANI, *average nucleotide identity*) abhängig. Dabei werden Organismen mit einer DDH von mindestens 70 % einer Art zugeordnet. Dies entspricht einer ANI von etwa 95 % (**Konstantinidis et al., 2006**). Solche mehrfachen Abgleiche wären auch zur Artendifferenzierung innerhalb archaeeller Gattungen denkbar. Das Beispiel von *Mb. formicicum* und *Mb. subterraneum*, welche trotz einer 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit von 97,2 % unterschiedlichen Arten innerhalb der archaeellen Gattung *Methanobacterium* zugeordnet werden (**Kotelnikova et al., 1998**), unterstreicht die Bedeutung mehrphasiger Charakterisierungen auf Art-Niveau. Der Forderung, eine Speziesdifferenzierung anhand der 16S rRNA-Gensequenz erst ab einer ausgewerteten Mindestsequenzlänge von 1300 bp vorzunehmen (**Stackebrandt et al., 2002**), konnte

innerhalb der Routinebestimmung knapp nicht nachgekommen werden. Mit dem erweiterten ARDRA-System jedoch konnten bereits etwa 1270 bp ausgewertet werden. Mit Anwendung des Doppelverdau-Systems auf eine von der Gattung *Methanoculleus* dominierte Fermenterprobe der BGA Obere Blies deutete sich eine Möglichkeit zum verbesserten Screening von Klonbibliotheken des 16S rRNA-Gens methanogener Archaea an. Die drei Muster, welche sich im Verlauf der ARDRA ergaben, ließen sich mit dieser erweiterten Sequenzlänge jeweils auf eine andere Art der Gattung mit höchster Sequenzidentität zurückführen. Dennoch verblieb auch bei dieser Zuweisung das Problem weiterer Arten mit Sequenzidentitäten oberhalb der 97 %-Marke. Trotz der Schwierigkeiten in Bezug auf eine exakte Zuordnung der Muster zu einer spezifischen Art auf Ebene der Sequenzidentität, ermöglichte der Doppelverdau die Abgrenzung von *Mcu. bourgensis*-Fragmenten von denen anderer Arten. Durch den *Hae*III-Einfachverdau konnte eine solche Differenzierung trotz Einsatzes des verlängerten Fragments nicht erfolgen.

Die absolute Quantifizierung methanogener Archaea in der Flüssigphase von BGA-Reaktorsubstrat mittels qPCR auf Basis der sequenzunabhängigen SYBR Green I-Chemie gelang, mit Ausnahme der Quantifizierung der Gattung *Methanosarcina*, vorwiegend auf Ordnungsniveau. Dafür konnten Primersets, welche in der Literatur zur sequenzspezifischen Quantifizierung eingesetzt wurden, übernommen werden. Die Amplifikationsbedingungen waren jedoch individuell anzupassen. Eine spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten der Gattung *Methanosaeta* gelang mit keinem der publizierten Primerpaare in einem statistisch verwertbaren Rahmen. Die aus *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> und *Msc. mazei* Gö erstellten Standardgeraden erfüllten die statistischen Belastbarkeitskriterien nach **Zhang und Fang (2006)** bezüglich Effizienz, Steigung und Bestimmtheitsmaß. Gegenüber der Quantifizierung methanogener Archaea anhand von Standards aus 16S rRNA Genamplifikaten liegt der Vorteil in der ähnlichen Effektivität der DNA-Extraktion von Probe und korrespondierendem Referenzstamm für die Kalibrierungsgerade durch Anwendung desselben Protokolls. Des Weiteren entfällt bei Verwendung nahe verwandter Referenzorganismen eine Einberechnung der Anzahl der vorhandenen 16S rRNA Leserahmen sowie des Einflusses einer ggf. unterschiedlichen Expression. Dem gegenüber steht eine höhere Exaktheit bei der Konstruktion der Standardgerade durch die photometrische Bestimmung der Amplifikatanzahl, da hier eine durch Fehler während des Auszählvorgangs verursachte Varianz entfällt. Die für die Fermenterproben ermittelten Zusammensetzungen der Populationen bestätigen die qualitativen Ergebnisse der Klonbibliotheken. Die bereits für die Gattung *Methanoculleus* angeführte Übereinstimmung von qPCR-Resultaten und den

Ursprüngen der Reinkulturen kann weitgehend auch für die übrigen Gattungen festgestellt werden: Isolate der Gattung *Methanobacterium* konnten aus allen Anlagen gewonnen werden, *Msc. mazei* NieKK entstammt aus einem Fermenter, dessen Subpopulation an Methanosarcinales vorwiegend aus der Gattung *Methanosarcina* besteht. Die Kultur von *Mst. concilii* Mst1.3 entstammt der BGA Arenrath, der einzigen der getesteten Anlagen, in welcher die Methanosarcinales dominant vorlagen. Nach Quantifizierung mittels der *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Kalibrierungsgeraden ist innerhalb dieser Ordnung der Titer der Gattung *Methanosaeta* am höchsten. Eine solche Dominanz konnte in der ARDRA-Analyse nicht festgestellt werden, dennoch war diese Anlage diejenige mit dem höchsten Anteil an Klonen der *Methanosaeta* sp.-Mustergruppe. Die DGGE-Analyse zeigte neben *Methanoculleus* ebenfalls das Vorkommen dieser obligat acetoklastischen Gattung. Nach Anpassung des Gradienten konnte die stärkste Bande der DGGE eindeutig *Mst. concilii* zugeordnet werden. Durch die optimierte Auftrennung war dies bereits vor Auswertung der Sequenz anhand der Positionierung der Bande auf Höhe der Bande des Referenzstammes *Mst. concilii* FE ersichtlich. Auch im Extrakt der BGA Obere Blies, der BGA mit dem zweithöchsten Titer an *Methanosaeta* sp. in den qPCR-Analysen, konnte im Verlauf der DGGE eine entsprechende Bande detektiert werden. Ein direkter Vergleich der ermittelten Zelltiter mit Literaturwerten wird dadurch erschwert, dass durch die Quantifizierung anhand von DNA-Fragmentstandards eine Angabe von detektierten Genkopien in Bezug auf die Masse der eingesetzten genomischen DNA-Vorlage (z.B.  $3,0 \times 10^6$  16S rRNA Genfragmente  $\text{ng}^{-1}$ ) weit verbreitet ist. Dennoch erscheinen die in dieser Arbeit ermittelten Zelltiter höher als in vergleichbaren Studien. So quantifizierten **Sawayama et al. (2005)** die methanogenen Archaea in einem bei 55 °C und mit einer Kombination von acetathaltigem Nährmedium und Substrat aus der Vergärung von Rinderabfall betriebenen Festbett-Laborreaktor. Dabei wurden sowohl das Inokulum als auch die Fest- und Flüssigphasen dieses artifiziellen Systems mittels qPCR untersucht. Während im Ausgangssubstrat aus der Rinderabfall-Vergärung Konzentrationen im Bereich von  $1,8 \times 10^5$  16S rRNA Genfragmenten pro  $\text{cm}^3$  für die Gattung *Methanobacterium* und  $4,6 \times 10^6$  Kopien pro  $\text{cm}^3$  für die Gattung *Methanosarcina* bei einer archaeellen Gesamtkonzentration von  $1,4 \times 10^7$  Kopien pro  $\text{cm}^3$  festgestellt wurden, erhöhte sich die Konzentration in der Flüssigphase des Reaktors auf  $3,6 \times 10^8$  archaeelle 16S rRNA Genfragmente pro  $\text{cm}^3$ . Der ermittelte Anteil von *Methanosarcina* sp. liegt mit  $7,6 \times 10^7$  Kopien pro  $\text{cm}^3$  in einem ähnlichen Bereich wie die Spanne der hier untersuchten Fermenter ( $5,1 \times 10^7$  bis  $5,3 \times 10^8$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  Flüssigphase), während der Anteil der Gattung *Methanobacterium* sp. in dieser Studie bis zu zwei Zehnerpotenzen unterhalb der in der

vorliegenden Arbeit aufgenommenen Zelltitern einzuordnen ist. Quantifizierungen methanogener Archaea in mesophilen, landwirtschaftlichen Praxisanlagen zur Fermentation von Rindergülle und Maissilage (Nettmann *et al.*, 2008) sowie von Schweinegülle, Maissilage und Getreidekörnern (Bergmann *et al.*, 2010) ergaben ebenso jeweils nur einen geringen Methanobacteriales-Anteil von 3 % bzw. 2 % der archaeellen Population. Mit 85 % bzw. 84 % wurden die Methanomicrobiales als dominante Ordnung bestimmt. Auch die Methanosarcinales (14 %, Bergmann *et al.*) bzw. die Gattung *Methanosaeta* (12 %, Nettmann *et al.*) übertrafen den Gesamtanteil an Methanobacteriales. Die schwache Ausprägung der *Methanobacterium* sp. zugeordneten DNA-Banden in den DGGE-Analysen der vorliegenden Arbeit sprechen in Übereinstimmung mit den oben aufgeführten BGA-Populationsstudien für eine untergeordnete Rolle dieser Gattung im Fermentationsprozess. Ein potentiell verfälschender Einfluss der DNA-Präparation betreffe die Ergebnisse aller hier angewandten molekularbiologischen Methoden gleichermaßen. Da die Zellwand von Archaea der Gattung *Methanobacterium* rigider ist als die nur aus einem S-Layer bestehende Zellwand von *Methanoculleus* sp. müsste man hier aufgrund der dadurch bedingten, einfacheren Zellyse eher eine Verschiebung zugunsten der Abundanz von *Mcu. bourgensis* erwarten. Da das DNA-Extraktionsprotokoll auf einem physikalischen Zellaufschluss basiert wurden jedoch auch Zellwände aufgeschlossen, welche eine höhere Resistenz gegenüber Detergenzien aufweisen als diejenigen von *Mcu. bourgensis*. Das Screening einer *mcrA*-basierten Klonbibliothek aus einer Rindergülle vergärenden Anlage durch Rastogi *et al.* (2008) ergab mit 19 % zwar höhere Anteile an Methanobacteriales, die Methanomicrobiales und Methanosarcinales verblieben jedoch auch hier in größerer Abundanz. Eine größere Übereinstimmung mit den qPCR-Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich zu einer *mcrA*-Analyse einer Anlage zur Monovergärung von Schweinegülle durch Zhu *et al.* (2010). Diese Studie wies erstmalig die Dominanz der Methanobacteriales in einem Reaktor nach. Der *in silico*-Sequenzabgleich ergab hier jedoch die höchsten Sequenzidentitäten mit einem Vertreter der Gattung *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium* sp.-Klone wurden nicht gefunden. Die Methanomicrobiales und Methanosarcinales machten nur die zweit- bzw. drittgrößten Subpopulationen aus, ähnlich wie in den hier erfassten Anlagen mit Ausnahme der BGA Arenrath. Die großen Anteile an Vertretern der Gattung *Methanobacterium* in den Klonbibliotheken deuten zunächst auf einen dominanten Anteil dieser Gattung innerhalb der in den qPCR-Experimenten quantifizierten Ordnung Methanobacteriales. Aufgrund dieser Ordnungsspezifität der qPCR-Analysen, wäre hier auch eine Koquantifizierung von Organismen der Gattung *Methanobrevibacter* sp. möglich. Diese Archaeen wurden



wiederholt in Rumen von Rindern nachgewiesen (**Tajima et al., 2001; Whitford et al., 2001**) und könnten somit über den Gülleanteil in das Substrat gelangen. In Analysen der Fermenterpopulation von mesophilen NawaRo-BGA ohne Monovergärung wurden sie jedoch nur selten und in kleinen Anteilen gefunden. Gegen das Vorkommen von *Methanobrevibacter* sp. in den Fermenterproben spricht zudem, dass weder über die in dieser Arbeit durchgeführten, molekularbiologischen Untersuchungen noch über die Kultivierungsansätze Mitglieder dieser Gattung detektiert bzw. angereichert werden konnten. Aufgrund der Ähnlichkeit der Nährmedien und Bedingungen zur Kultivierung von *Methanoculleus* sp., *Methanobacterium* sp. und *Methanobrevibacter* sp. wäre Letzteres jedoch erwartet worden. Im Vorfeld weiterer qPCR-Experimente könnte durch den Wechsel auf ein sequenzspezifisches Quantifizierungssystem (z.B. mittels TaqMan<sup>®</sup>-Sonden) unter Verwendung von DNA-Fragmentstandards bei erneuten Probennahmen eine Überprüfung der Ergebnisse erreicht und eventuelle Änderungen in der Quantifizierung der archaellen Fermenterbiozönose sichtbar werden. Die qPCR ist, wie viele molekularbiologische Methoden, stark abhängig von der Güte des eingesetzten DNA-Extraktes (**Bergmann et al., 2010**). Gerade die in Boden- und Pflanzenproben häufig vorkommenden Huminsäuren (**Tsai und Olson, 1992**) sowie manche pflanzliche Polysaccharide (**Sharma et al., 2002**) sind bekannte PCR-Inhibitoren und auch in NawaRo-Fermentersubstraten zu erwarten. Daher sollte im Rahmen weiterer qPCR-Analysen die Anwendung eines klassischen DNA-Fällungsprotokolls mittels Aquaphenol sowie die Verwendung neuartiger Reaktionskits zur Extraktion von DNA aus Bioreaktoren geprüft werden. Sollten diese Maßnahmen ein DNA-Extrakt höherer Konzentration oder Reinheit ergeben, wären ggf. bessere Amplifikationseffizienzen bei der Quantifizierung der Methanosarcinales anhand eines *Msc mazei* Gö-Zellstandards möglich. Die parallele Analyse einer Fermenterprobe durch qPCR und dem Screening einer Klonbibliothek von größerem Umfang würde anschließend einen direkten Vergleich der Methoden erlauben. Ferner eröffnet die klassische Fällungsmethode die Extraktion der DNA aus größeren Probenvolumina und könnte auch Organismen, welche auf partikulärem Pflanzenmaterial anheften, aufschließen und stärker in die Analyse mit einbeziehen.

Die Ähnlichkeit in der Zusammensetzung der Rumenbiozönose von Wiederkäuern zu derjenigen in BGA legt die Güllefraktion des Substrats als Ursprung für die Population methanogener Archaea in BGA nahe. Dazu bestätigt eine Klonbibliothek von methanogenen Archaea aus dem Rumen des Surtibüffels das Vorkommen von Methanomicrobiales und Methanobacteriales. Beide Ordnungen hatten mit 12 bzw. 10 von 23 Klonen einen vergleichbaren Anteil an der Klonbibliothek. Als Vertreter der Methanosarcinales wurde *Msc. barkeri*

mit nur einem Klon detektiert (**Singh et al., 2011**). **Jarvis et al. (2000)** gelang zuvor bereits die Isolierung dreier methanogener Arten aus dem Rumen von Rindern. Wie in der vorliegenden Arbeit konnte eines der Isolate als *Mb. formicicum* identifiziert werden, passend zur Studie von Singh et al. wurden die übrigen Isolate *Methanomicrobium mobile* und *Msc. barkeri* zugeordnet. Neben der Abwesenheit von *Methanobrevibacter* sp. widerspricht der Nachweis von Mikroorganismen dieser Ordnungen in mesophilen und thermophilen BGA zur Monovergärung von Maissilage durch **Bauer et al. (2008)** einer solchen Annahme. Da zur Verhinderung von Versäuerung und Spurenelement-Mangel auch bei monovergärenden Prozessen häufig kleine Mengen Gülle dem Substrat zugefügt werden, könnte auf diesem Wege dennoch eine Inokulierung durch Rumenmikroflora auftreten. Warum sich in diesem Fall die Dominanz von z.B. *Methanobrevibacter* sp. im Fermentersubstrat nicht fortsetzt verbleibt ungeklärt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten zur Untersuchung der Biozönose methanogener Archaea von fünf NawaRo-BGA unterstützen die in der Literatur entwickelte These einer vorrangigen Bedeutung der hydrogenotrophen Methanogenese für den landwirtschaftlichen Biogas-Prozess (**I.3.5**). In den untersuchten Fermenterproben waren Organismen der hydrogenotrophen Gattungen *Methanoculleus* und *Methanobacterium* in vier der Anlagen mit höheren Zelltitern, einer höheren Anzahl an repräsentativen Klonen oder stärkeren DNA-Banden prominenter vertreten als solche der Gattungen *Methanosarcina* und insbesondere *Methanosaeta*. Die mit Ausnahme der BGA Arenrath geringen Zelltitern dieser obligat acetoklastischen Gattung stehen in Einklang mit den höheren Faulraumbelastungen landwirtschaftl. BGA im Vergleich zu Anlagen, wie sie im Rahmen der Siedlungswasserwirtschaft betrieben werden. Zusammen mit einer niedrigen Ammonium/Ammoniak-Belastung führt dies dort oft zu hohen Zelltitern von *Methanosaeta* sp. und zur vorwiegenden Nutzung von Acetat als Substrat der Methanbildung. Aufgrund der Fähigkeit, alle Stoffwechselwege der Methanogenese katalysieren zu können, ist das Aufkommen einer kleinen Subpopulation von *Msc. mazei* in den untersuchten Anlagen trotz Zugehörigkeit zu den Methanosarcinales nicht zwingend ein Zeichen für eine Methanproduktion aus Acetat. Zusammen mit seiner Robustheit gilt die Stoffwechselvielfältigkeit als Grund für die weite Verbreitung dieses Organismus in der Natur und als „heavy-duty methanogen“ in verschiedenen Methanisierungsprozessen (**De Vrieze et al., 2012**).

Generell ist vor dem Hintergrund des anaeroben Substratabbaus in landwirtschaftl. BGA für die hydrogenotrophen Eigenisolate der Gattungen *Methanobacterium* und *Methanoculleus* eine Rolle als Partnerorganismen zu den syntrophen VFA-abbauenden Bakterien denkbar.

Dies würde die Vorteile einer vergleichsweise hohen Energieausbeute des hydrogenotrophen Methanogeneseweges mit einer indirekten Unterstützung der Substratbildung durch Entfernen von  $H_2$  aus dem Reaktionsgleichgewicht des syntrophen Partners kombinieren. Ein anaerober und leicht exergoner Abbau der VFA wäre gewährleistet und einer Übersäuerung könnte entgegengewirkt werden. In diesem Zusammenhang ist für das Isolat *Msc. mazei* NieKK eine Doppelrolle denkbar. Zum einen ist bzgl.  $H_2$  eine analoge Partnerschaft mit VFA oxidierenden Organismen möglich, zum anderen wäre insbesondere bei hohen Anteilen obligat hydrogenotropher Arten ein Abbau des aus unvollständigen Oxidationsprozessen stammenden Acetats vorstellbar. *Msc. mazei* NieKK könnte so durch Ausnutzung der weniger exergonen Reaktionen des acetoklastischen Methanogeneseweges eine Substratkonkurrenz mit den für  $H_2$  hochaffinen obligat hydrogenotrophen Arten vermeiden und trotz geringem  $pH_2$  hohe Zellteilungsraten aufrechterhalten. Durch seine Wachstumsvorteile gegenüber *Mst. concilii* Mst1.3 bei hohen Acetatkonzentrationen, welche in BGA durch die stetige Zufuhr organischen Substrats gewährleistet sind, stellt dieser keine Substratkonkurrenz für *Msc. mazei* NieKK dar.

#### **IV.2 Charakterisierung der Isolate methanogener Archaea aus landwirtschaftlichen NawaRo-BGA**

Im Verlauf der Isolierung von *Mst. concilii* Mst1.3 und *Msc. mazei* NieKK konnte durch den doppelten Selektionsdruck aus spezifischer Energiequelle und Zugabe von Antibiotika die Dominanz eines Morphotyps erreicht werden. Die Nutzung von Methanol als einzige Energiequelle würde während des Isolierungsverfahrens nicht nur ein Anwachsen von *Methanosarcina* sp. ermöglichen, sondern prinzipiell auch von methylophilen, bakteriellen Organismen. Da einige dieser Mikroorganismen auch Methanotrophie betreiben, ist deren Vorkommen im Substrat und damit im Primärinokulum nicht auszuschließen. Der für die Kultivierung methanogener Organismen obligate Sauerstoffausschluss verhindert jedoch das Wachstum von methanotrophen Bakterien, da kein  $O_2$  für eine Oxidierung von Methan zu Methanol zur Verfügung steht. Das Wachstum nichtmethanotropher, methylophiler Bakterien parallel zu methanolverwertenden Archaea wurde durch den begleitenden Antibiotika-Selektionsdruck unterbunden. Die Zugabe von Antibiotika während des Isolierungsprozesses von *Mst. concilii* Mst1.3 war von größerer Bedeutung als im Fall von *Msc. mazei* NieKK. Hier war aufgrund der obligat acetoklastischen Lebensweise kein Substratwechsel zur Vermeidung einer Konkurrenzsituation mit syntrophen Acetat-Oxidierern (vgl. **Abb. 4**) möglich. Diese gehören zu den VFA-abbauenden sekundären Gärern und wurden bereits in Assoziation mit *Methanoculleus* sp. als Acetat oxidierendes

Konsortium aus einer mesophilen BGA zur Fermentation von Abwasserschlämme isoliert (**Schnürer et al., 1999**). Gerade in Anlagen mit höheren Ammoniumkonzentrationen werden acetoklastische methanogene Archaea stärker gehemmt als hydrogenotrophe Organismen, das anfallende Acetat steht im Verdacht über die syntrophe Acetatoxidation zu H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> umgesetzt und somit dem Substratpool für die hydrogenotrophe Methanogenese zugeführt zu werden (**Schnürer et al., 1999**). Aufgrund der langsamen Wachstumsraten von *Methanosaeta* sp. besteht in Kultur generell die Gefahr eines Überwachsens durch bakterielle Organismen während des Isoliervorgangs. Da jedoch keine H<sub>2</sub>-entfernenden Organismen vorliegen, ist keine energieeffiziente Acetatoxidation möglich und inaktive Resttiter bakterieller Kokulturen werden durch die antibiotikaunterstützten Verdünnungsreihen entfernt. Im NawaRo-Praxisfermenter erscheint die syntrophe Acetatoxidation gerade wegen höherer Ammoniumkonzentrationen durch den Gülleanteil oder proteinreiche Substrate eine Möglichkeit zur Umsetzung akkumulierenden Acetats. Anstatt einer Kokultivierung bakterieller Organismen war im Verlauf der Isolierungsarbeiten für *Mcu. bourgensis* wiederholt eine Kokultivierung von *Methanobacterium* sp.-Morphotypen aufgrund ähnlicher Substratanforderungen an das Habitat zu beobachten. Antibiotikazusätze können wegen ähnlicher Resistenzspektren daher nicht unterstützend wirken. Unter den Laborbedingungen wurde die Aufreinigung durch ein schnelleres Wachstum der *Methanobacterium*-Kokultur erschwert. Erst durch die Vorschaltung eines Kultivierungsschrittes in den Grenztoleranzbereichen von *Mcu. bourgensis* bei tieferen Temperaturen und pH-Wert konnte *Mcu. bourgensis* Mcu(1) bevorteilt und in der Folge allein kultiviert werden. Bei anschließender Kultivierung unter den Normalbedingungen verblieb die irregulär-kokkoide Form der einzige autofluoreszierende Morphotyp. Die Isolate der Gattung *Methanobacterium* waren aus Anreicherungen rein stäbchenförmiger Organismen hervorgegangen, sodaß eine überwachsene *Methanoculleus* sp.-Kultur als Ursprung dieser Isolate ausgeschlossen werden kann. In diesem Zusammenhang kann der erhöhte Anteil an Kulturen der Gattung *Methanobacterium* gegenüber der einzigen *Mcu bourgensis*-Kultur nicht auf etwaige Selektionswirkung des initialen Anreicherungsschrittes in Medium 287 zugunsten von *Methanobacterium* sp. zurückgeführt werden, da dieses Medium zur Kultivierung von *Methanoculleus*-Arten (vormals Gattung *Methanogenium* zugeordnet, **Maestrojuán et al., 1990**) beschrieben und von der DSMZ angewendet wurde. Der Erhalt einer Vielzahl an *Methanobacterium* sp.-Isolaten trotz Kultivierung in diesem Medium kann als weiterer Hinweis auf dessen breite Anwendungsmöglichkeit zur Anreicherung methanogener Archaea sowie auf das Vorkommen hoher *Methanobacterium* sp.-Zelltiters in den BGA zum Zeitpunkt der Probennahme gelten.

Die molekularbiologische Charakterisierung der Isolate wurde mit Restriktionsanalysen und DGGE analog zu den Untersuchungen von Fermentersubstratproben durchgeführt. Erwartungsgemäß wurde die nach Sequenzanalyse des 16S rRNA-Genfragmentes erfolgte *in silico*-Identifizierung der Isolate durch identische *HaeII*- und *HaeIII*-Restriktionsmuster der entsprechenden Amplifikate aus den Typstämmen *in vitro* bestätigt. Die Muster von *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup>, *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup>, *Mst. concilii* FE und deren Isolate aus BGA befanden sich innerhalb des Auflösungsvermögens der Gelelektrophorese in Übereinstimmung mit den vorausgerechneten Fragmentlängen. Leichte Abweichungen ergaben sich in Bezug auf die Muster von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> bzw. Mcu(1) sowie *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und den getesteten *Methanobacterium* sp.-Isolaten. Beide Muster der *Mcu. bourgensis* Stämme zeigten ein kleineres Fragment im *HaeII*-Verdau als mit 582 bp rechnerisch erwartet wurde. Da das reale Fragment reproduzierbar in beiden Stämmen oberhalb der 500 bp-Marke zum liegen kommt, ist die Zuordnung dennoch eindeutig. Ähnlich leichte Abweichungen bezüglich der vorausgerechneten Länge von Fragmenten unterhalb der 150 bp im Muster von *Mb. formicicum* sind zu vernachlässigen, da diese Abweichungen zwischen Referenzstamm und den Isolaten konserviert sind und in einem von anderen getesteten Isolaten klar unterscheidbaren Muster resultiert. Der Grund für die Abweichung des Typstammes im Vergleich mit den *Methanobacterium* sp.-Isolaten Mb2, Mb3, Mb4, Mb5, Mb6, Mb7 und Mb9 bezüglich des Vorkommens eines Fragmentes von etwa 200 bp im *HaeIII*-Muster verbleibt ungeklärt. Eine Identität der realen 200 bp-Bande mit dem vorausgerechneten Fragment von 233 bp Länge kann ausgeschlossen werden, da diese Bande für die Restriktion der Typstamm-Sequenz errechnet wurde. Gerade hier ergibt sich, wie in den Isolaten Mb1, Mb8 und Mb10, diese Bande real jedoch nicht. Eine zweite Möglichkeit der Interpretation bestünde in dem Vorliegen einer Mischkultur aus *Mb. formicicum* und *Mb. kanagiense* oder *Mb. petrolearium* in den Isolaten mit der Bande im Restriktionsmuster. In diesem Fall wäre die Bande auf das vorausgerechnete Fragment von 202 bp (*Mb. kanagiense*) bzw. 203 bp (*Mb. petrolearium*) Länge zurückzuführen. Mehrere Gründe sprechen dabei gegen das Vorliegen einer Mischkultur. Unter der Voraussetzung einer korrekten *in silico*-Fragmentberechnung müsste die parallel durchgeführte *HaeII*-Restriktion zu einer Fragmentierung des auf das Ko-Isolat zurückzuführenden DNA-Amplifikats zu zwei Banden mit einer Länge von 1139 bp und 115 bp führen. Ein solcher Schnitt wurde jedoch in keinem Isolat beobachtet. Eine fehlerhafte Enzymfunktion wird dadurch widerlegt, dass diese Banden übereinstimmend mit der Berechnung auch im Verdau der DNA aus *Mst. concilii* FE auftreten. Auch ein Fragment von 346 bp, wie es für *Mb. kanagiense* oder *Mb. petrolearium*

erwartet werden würde, wird in der Praxis nicht beobachtet, während die Bandenstärke eines *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Fragmentes von etwa 250 bp Länge auf das Zusammenfallen der für diesen Stamm berechneten Fragmente von 247 bp und 244 bp im Gel zurückzuführen sein könnte. Ein weiterer Hinweis gegen eine Mischkultur stellen die Elektropherogramme der Sequenzierläufe dar, welche im ausgewerteten Bereich frei von signifikanten Mischsignalen an den einzelnen Nukleotidpositionen waren. DGGE-Analysen der Isolate zeigten in Ergänzung stets nur eine Bande. Obwohl eine vollständige Speziesseparation in der DGGE nicht zu erreichen war, wiesen die Referenzen der genannten Arten deutliche Unterschiede in den Migrationsweite im Vergleich zu den getesteten Isolaten auf. Die identische Migrationsweite der 16S rRNA-Genfragmente der Isolate Mb8, Mb9 und von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> konnte mit den Restriktionsanalysen nur für das Isolat Mb8 nachvollzogen werden. Das Muster von Mb9 unterschied sich von dem des Typstammes durch das zusätzliche 200 bp-Fragment. Generell bestätigte die DGGE die Identifizierung durch *in silico*-Sequenzabgleich und ermöglichte eine eindeutige Zuordnung von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> und *Mcu*(1), *Mst. concilii* FE und *Mst*1.3 sowie *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup> und NieKK. Abweichungen ergaben sich erneut nur innerhalb der Gattung *Methanobacterium*. Aufgrund unterschiedlicher zugrundeliegender Abschnitte des 16S rRNA Leserahmens in Sequenzierung und DGGE sind beide Methoden als gegenseitige Ergänzung mit Priorität auf der Sequenzauswertung zu betrachten. Der vom Primerpaar Met86f/Met1340r amplifizierte Teilbereich des Leserahmens umfasst dabei neben einem 3'-Fragment der hypervariablen Region V1 die Regionen V2 bis V8. Das in der DGGE-Analyse betrachtete Fragment umspannt aufgrund der methodenspezifischen Limitierung auf 500 bp neben dem 3'-Bereich der hypervariablen Region V6 die Regionen V7 bis V9. Erst das im Rahmen des erweiterten ARDRA-Systems verwendete Primerpaar Met86f/AR1500R enthält die Sequenzinformation aus allen neun hypervariablen Regionen. Trotz der Fokussierung auf die Regionen V6 bis V9 war ein klarer Migrationsunterschied zwischen den Vertretern der Methanobacteriales und denen der Methanosarcinales und Methanomicrobiales in der DGGE erreicht worden. Mit dieser Auftrennung konnte der taxonomisch-phylogenetischen Aufteilung der methanogenen Archaea in die Klassen I (Methanopyrales, Methanococcales und Methanobacteriales) und II (Methanosarcinales und Methanomicrobiales) im Rahmen der getesteten Organismen nachvollzogen werden. Auf Art-Ebene konnte mit allen angewandten molekularbiologischen Methoden eine Differenzierung von *Msc. mazei* S-6<sup>T</sup> und *Msc. barkeri* MS<sup>T</sup> erreicht und das Isolat *Msc. mazei* NieKK entsprechend eingeordnet werden. Die hohe Variabilität der Region V9 wurde in einer Untersuchung von 218 verschiedenen *rrs*-Genen bereits bestätigt. Im

Rahmen dieser Studie konnte daneben die besondere Eignung der Regionen V1 und insbesondere V3 für das Erstellen eines Profils der mikrobiellen Flora in Schafen mittels DGGE gezeigt werden (Yu und Morrison, 2004). Eine Folgestudie bestätigte vor einem archaeellen Hintergrund für V3 die beste Eignung zur DGGE-Analyse in gastrointestinalen Biozönosen (Yu *et al.*, 2008). Die Untersuchung von BGA-Substrat mit Gülleanteil anhand dieser Region könnte daher ergänzend weitere Aufschlüsse auf die dortige Biozönose geben und sollte daher in der Praxis überprüft werden.

### IV.3 Phylogenie der Gattung *Methanobacterium*

*Mb. formicicum* und dieser Art zugehörige DNA-Sequenzen wurden in einer Vielzahl an Anlagen und Pilotreaktoren mit verschiedenen Substratbeschickungen, teilweise als dominante Fraktion, innerhalb der archaeellen Population nachgewiesen (Akarsubasi *et al.*, 2006; Godon *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1988; Macario und Conway de Macario, 1988). Dabei wurde das Vorkommen von *Mb. formicicum* in Bioreaktoren zur Fermentation von Rinderdung schon früh bestätigt (Ranade *et al.*, 1980). Um die im Rahmen dieser Arbeit aus Substrat von NawaRo-Praxisanlagen gewonnenen Isolate in den phylogenetischen Kontext der Gattung *Methanobacterium* einordnen zu können, wurde der 23S rRNA-Leserahmen ausgewählter Vertreter sequenziert und zur Berechnung eines Stammbaums herangezogen. Anschließend erfolgte der Vergleich mit einem Stammbaum aus den bereits in Datenbanken hinterlegten 16S rRNA-Gensequenzen. Dabei stimmt die Gruppierung der einzelnen Referenzstämme in beiden Bäumen weitgehend überein, Abweichungen ergeben sich nur in der relativen Anordnung der einzelnen Gruppierungen zueinander. Während im 23S rRNA basierten Baum beispielsweise eine Gruppe aus *Mb. oryzae* FPI<sup>T</sup>, *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> und *Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup> von der Gruppe der übrigen Typstämme auf einem eigenen Ast separiert wird, so wird die korrespondierende Gruppe inmitten des 16S rRNA-basierten Stammbaums eingeordnet. Im 23S rRNA-basierten Stammbaum führt die Positionierung von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> in einen der beiden Äste des Isolat-Clusters (s.u.) zu einer Anordnung von *Mb. palustre* F<sup>T</sup> und *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> auf eigenen Ästen, während diese Arten im 16S rRNA-Baum einen direkten, gemeinsamen Knoten aufweisen. Dennoch deuten beide Analysen auf eine enge Verwandtschaft dieser Typstämme hin. Die Ähnlichkeit der Stammbäume war aufgrund der Koevolution beider zugrunde liegender Leserahmen (Liao, 2000) erwartet worden und zeigt die Eignung der 23S rRNA-Gensequenz als phylogenetische Uhr. Trotz der größeren Sequenzlänge im 23S rRNA-Gen werden in bakteriellen Organismen häufig die intergenischen Regionen (ITS) zwischen den 16S rRNA- und 23S rRNA-Genen für phylogenetische Analysen herangezogen (Houpikian und Raoult,

2001). Die hohe Variabilität bezüglich Länge und Sequenz mit konservierten, flankierenden Leserahmen machen die ITS-Region zu einem beliebten Marker phylogenetischer Studien prokaryotischer Organismen (**García-Martínez et al., 1999**). Mit der nun bekannten 23S rRNA-Gensequenz verschiedener Arten der Gattung *Methanobacterium* lassen sich nun Primerpaare zur Amplifikation der ITS entwerfen und vergleichende phylogenetische Studien mit den hier präsentierten Stammbäumen durchführen.

Im Direktvergleich der Stammbäume, welche auf Basis eines 16S rRNA-Genfragmentes von 897 bp bzw. 1255 bp. Länge berechnet wurden, ergaben sich Änderungen bezüglich der Positionierung von *Mb. alcaliphilum* WeN4<sup>T</sup>, *Mb. lacus* 17A1<sup>T</sup> und *Mb. beijingense* 8-2<sup>T</sup>. Auf Datenlage des kürzeren Fragmentes wird *Mb. alcaliphilum* WeN4<sup>T</sup> mit *Mb. movens* DSM25945<sup>T</sup> gruppiert, während mit Vergrößerung der Sequenzinformation *Mb. alcaliphilum* WeN4<sup>T</sup> als separates Taxon bestimmt wird. Ähnliches trifft auf *Mb. lacus* 17A1<sup>T</sup> und *Mb. beijingense* 8-2<sup>T</sup> zu, welche bei zunehmender Sequenzinformation eigene Äste des Stammbaums ausmachen, obwohl sie nach dem 897 bp-Fragment zueinander gruppiert wurden. Allgemein waren die Änderungen jedoch von geringem Umfang. Der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Stammbaum zeigt dabei große Übereinstimmungen mit einer publizierten phylogenetischen Analyse nah verwandter 16S rRNA- und *mcrA*-Sequenzen von *Mb. ferruginis* Mic6c05<sup>T</sup> und *Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> (**Mori und Harayama, 2011**) und sichert diese Anordnung der Spezies ab. Interessant ist in diesem Zusammenhang die enge Gruppierung der formiatverwertenden Arten *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, *Mb. palustre* F<sup>T</sup> und *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> in den Analysen der 16S- und 23S rRNA-Gensequenzen. Die Positionierung der ebenfalls formiatabbauenden Arten *Mb. beijingense* 8-2<sup>T</sup> (**Ma et al., 2005**) und *Mb. oryzae* FPi<sup>T</sup> außerhalb dieser Gruppe legt nahe, dass die Fähigkeit zur Formiat-Verwertung innerhalb der Evolution dieser Gattung nicht monophyletisch entstanden ist, sondern parallel erworben wurde. Eine fehlerhafte Anordnung dieser Arten ist aufgrund vergleichbarer Einordnungen in den veröffentlichten und im 23S rRNA-basierten Stammbaum unwahrscheinlich.

Die Isolate aus BGA werden nach 16S- und 23S rRNA-Gensequenzanalysen in einem zum Großteil der Referenzorganismen separaten Cluster angeordnet. Darin bestätigt sich trotz des Ursprungs aus vier verschiedenen BGA ein hoher Verwandtschaftsgrad der Isolate zueinander. Einzige Referenzorganismen innerhalb dieses „NawaRo-Clusters“ stellen *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (23S rRNA) bzw. *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und *Mb. palustre* F<sup>T</sup> dar (16S rRNA). Damit konnte die nächste Verwandtschaft der Isolate mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> auch anhand des 23S rRNA-Leserahmens gezeigt werden. Die Zweiteilung dieses Clusters ergab



sich ebenso unter den phylogenetischen Analysen beider Leserahmen in den getesteten Arten bzw. Isolaten. Abweichend stellte sich nur die Positionierung des Isolats Mb9 dar. Eine phylogenetische Analyse über den gesamten 16S rRNA Leserahmen würde die Positionierung absichern. Eine folgende phylogenetische Umpositionierung von Isolat Mb9 ist jedoch angesichts der identischen Positionierungen der Referenzstämme bei Erhöhung der 16S rRNA-Gensequenz-Information nicht zwingend. Die Ergebnisse der genomweiten Verteilung der *NotI*-Erkennungssequenz mittels einstufiger SAPD-PCR-Analyse unterstützt die Zuordnung der Isolate auf die unterschiedlichen Äste des „NawaRo-Clusters“: Die Aufteilung der Isolate auf die beiden entstandenen (Haupt-)Amplifikationsmuster entspricht der Anordnung im Stammbaum nach 23S rRNA-Gensequenzanalyse. In Bezug auf die Positionierung der Isolate Mb8 und Mb9 wird die phylogenetische 23S rRNA-Analyse durch die DGGE gestützt, in welcher beide Amplifikate eine vergleichbare Migrationsweite mit *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> erreichten. Innerhalb der SAPD-PCR waren Mb8 und Mb9 jedoch nicht nur von den übrigen Isolaten verschieden, sondern wiesen auch Unterschiede zu *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> auf. Das Muster dieses Typstamms wich entgegen der Ergebnisse der *in silico*-Abgleiche der 16S rRNA-Gensequenz jedoch von den Mustern jeglicher Isolaten ab. Größere Übereinstimmung liefern die Ergebnisse von phylogenetischen Analysen, der DGGE und der SAPD-PCR bezüglich der Isolate Mb1 und Mb10. Neben der leicht abseitigen Positionierung gegenüber den übrigen Isolaten im Referenzstamm freien Ast des „NawaRo-Clusters“ zeigten sich übereinstimmend sowohl leichte Unterschiede in den Amplifikationsmustern der SAPD-PCR, als auch deutlich kürzere Migrationsweite im Verlauf der DGGE. Auch eine Differenzierung gegenüber den weiteren Typstämmen außerhalb des „NawaRo-Clusters“ war durch deutliche Unterschiede im Amplifikationsmuster der SAPD-PCR gegeben. Einzelne Amplifikate waren mehreren Arten gemein, was ggf. auf die gemeinsame Gattungsangehörigkeit zurückzuführen ist.

#### **IV.4 Isolat Mb1 - Vertreter einer neuen Art?**

Im Sinne einer mehrphasigen Speziesdifferenzierung wurde das Isolat Mb1 aus der Gattung *Methanobacterium* in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern des CeBiTec der Universität Bielefeld (AG Prof. A. Pühler, Dr. A. Schlüter), der DSMZ (Dr. H-P Klenk) und der Materialprüfanstalt Bremen (MPA, Dr. J. Küver, Dr. A. Rabenstein) auf Zugehörigkeit zu einer neuen Art untersucht. Erste Hinweise deuten dabei auf das Vorliegen einer bislang unbeschriebenen Art. Die Gesamtgenom-Sequenzierung des Isolats Mb1 ergab im Vergleich zu mittlerweile veröffentlichten Genomsequenzen von *Mb. formicicum*-Stämmen eine deutlich reduzierte Genomgröße sowie einen leicht erhöhten GC-Gehalt (Maus *et al.*, 2013;

D. Wibberg, CeBiTec, pers. Kommunikation). Eine digitale DDH auf Basis dieser Genomsequenz ergab eine Hybridisierungsrate von nur 33,5 % mit dem Stamm *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (Dr. H-P Klenk, DSMZ, Braunschweig, pers. Mitteilung) und verbleibt daher deutlich unter dem als Artkriterium geltenden Grenzwert von 70 % Hybridisierungsrate. In Übereinstimmung mit den phylogenetischen Studien der vorliegenden Arbeit konnte über eine MALDI-ToF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight)-spektroskopische Analyse zum einen die nahe Verwandtschaft zu *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> zum anderen die Anordnung in einem separaten Ast innerhalb der Ähnlichkeitsanalyse zusammen mit weiteren, ausgewählten Isolaten (Dr. A. Rabenstein, pers. Mitteilung) bestätigt werden. Damit konnte unter den bislang getesteten Isolaten die Ausbildung eines der beiden Äste des „NawaRo-Clusters“ nachvollzogen werden. Inwieweit hier weitere unbeschriebene Arten vorliegen könnten, ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Weitere MALDI-ToF-Analysen könnten zeigen, ob die Einbeziehung von Isolat Mb8 auch hier eine Zweiteilung des „NawaRo-Clusters“ bewirkt. Die Einordnung von Isolat Mb1 als einer von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> verschiedenen Art würde die leicht abseitige Positionierung in den Stammbäumen, die unterschiedliche Migrationsweite gegenüber Stamm MF<sup>T</sup> und das von den Referenzstämmen abweichende SAPD-PCR-Muster erklären. Die fehlende Hybridisierung der FISH-Sonden Cy3.51535E1 und Cy3.51535E2 (s.u.) mit Isolat Mb1 bei gleichzeitig guter Bindung an *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>-Zellen erhärtet die These einer neuen Art weiter. Im Rahmen erster vergleichender physiologischer Untersuchungen von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und Isolat Mb1 ergaben sich zunächst ähnliche Wuchskurven in Abhängigkeit steigender NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentrationen im Medium, jedoch zeigte Mb1 eine leicht verringerte lag-Phase und damit einen früheren Wachstumsstart. Analoge Tests zur Propionsäuretoleranz lieferten erste Hinweise auf das Erreichen höherer Zelltiters gegenüber dem Referenzstamm in Gegenwart hoher Propionsäurekonzentrationen. Aufgrund schwankenden Wachstums der Kulturen waren die physiologischen Untersuchungen bislang statistisch nicht vollständig belastbar, sodass die ersten Vorabergebnisse für eine sichere Aussage mit der Reproduktion der Tests überprüft werden müssen. Die potentielle Eigenschaft einer erhöhten Propionsäuretoleranz ist dabei in Bezug auf eine im Verlauf der Reinkultivierung erhaltenen Kokultur von Isolat Mb1 mit einem unbekanntem bakteriellen Organismus interessant. Die Auswertung der Genomsequenzierung dieses Bakteriums der Ordnung Clostridiales ergab Hinweise auf eine syntrophe Assoziation mit Isolat Mb1 (D. Wibberg, CeBiTec, pers. Kommunikation). Da *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> wiederholt als H<sub>2</sub>-abbauender Partner in mikrobiellen, VFA-abbauenden Konsortien beschrieben wurde (Meher und Ranade, 1993; Meher *et al.*, 1996; Wu *et al.*,

1996; Yang *et al.*, 2004), kann auch über ein Vorkommen der neuen Art Mb1 in BGA in enger Assoziation mit einem Vertreter der sekundären Gärer spekuliert werden. Vor dem Hintergrund der Propionsäuretoleranz sollte daher die potentielle Bildung eines Propionsäureabbauenden Konsortium und derer Eignung als Teil einer Starterkultur für den Einsatz in BGA weiter erforscht werden.

#### IV.5 Nachweissysteme für ausgewählte Organismen der Gattung *Methanobacterium*

Die SAPD-PCR stellt eine geeignete Methode zur Entwicklung art- und stammspezifischer Primer zur Differenzierung von Bakterien (Pfannebecker und Fröhlich 2008; Sebastian *et al.* 2011) und Hefen (Blättel *et al.*, 2008) dar. Die Ausbildung zweier vom Fingerabdruck des Typstamms *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> verschiedener Hauptamplifizierungsmuster bei Anwendung der SAPD-PCR auf Isolate der Gattung *Methanobacterium* erschwerte die Identifizierung eines gemeinsamen Amplifikates als Grundlage eines PCR-basierten Nachweissystems. Neben der identifizierten Signatursequenz 03Mbf bieten die Amplifikationsmuster noch weitere geeignete Kandidaten. So wäre ein etwa 1500 bp langes Amplifikat aus den A-Not Fingerabdrücken der Isolate eine mögliche Alternative zu dem hier entwickelten System. In der Praxis weisen die Arten *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> mit 1480 bp sowie *Mb. palustre* F<sup>T</sup> (1500 bzw. 1540 bp) und *Mb. kanagiense* 169<sup>T</sup> (1540 bp) Amplifikate vergleichbarer Größe auf, sodass je nach tatsächlicher Amplifikationsspezifität mit einem breiteren Spektrum detektierter Organismen zu rechnen ist. Die Artspezifität des Primersystems auf Basis der Signatursequenz 03Mbf konnte gezeigt werden, DNA-Extrakte aus den nächsten Verwandten *Mb. palustre* F<sup>T</sup> und *Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> ergaben keinerlei Amplifikat. Wie für die Amplifizierung von Fragment D der Signatursequenz aus BGA-Proben gezeigt, kann auf die praktische Kontrolle eines SAPD-PCR-abgeleiteten Primersets nicht verzichtet werden. Obwohl beide Fragmente (A und D) die Detektion aus Laborkulturen ermöglichten, zeigte Fragment D bei Anwendung auf einen realen Probenhintergrund weitere Amplifikate, welche kleiner waren als die erwarteten 294 bp. Diese konnten auch durch Anpassung des Amplifikationsprotokolls nicht verhindert werden. Die 2000 bp-Bande bei Amplifizierung von Fragment A aus der Probe der BGA Kaschenbach ist in Bezug auf die Größe deutlich verschieden von den erwarteten 324 bp und fehlt in den Proben der übrigen Anlagen völlig. Das Resultat wird nicht beeinflusst, da das korrekte Amplifikat detektiert werden konnte. Die Reduzierung der Annealing- und/oder Elongationszeit analog zum Vorgehen bei Fragment D sollte das Entstehen von Banden dieser Größe ausschließen. Daher verbleibt das Primerpaar zur Amplifizierung von Fragment A geeigneter für die Detektion der Organismen des „Nawaro-Clusters“ in BGA. Das im Vergleich zu Kulturproben erhöhte PCR-Volumen zur

Detektion könnte dennoch einen Hinweis auf geringe Titer der detektierten Organismen in den Anlagen darstellen. In diesem Fall würden die qualitativen Bandenstärken nicht mit den Anteilen der Methanobacteriales, wie sie in der qPCR quantifiziert wurden, übereinstimmen. Dann lägen andere Vertreter der Methanobacteriales in höheren Titern vor als die hier untersuchte Gruppe, was jedoch im Widerspruch zu den übrigen molekularbiologischen Analysen steht (s.o.).

Wegen der großen Bedeutung H<sub>2</sub>-nutzender methanogener Archaea für den Biogasprozess aus NawaRo könnten weitere SAPD-PCR-abgeleitete Detektionssysteme, insbesondere zur Erfassung von Vertretern der Gattung *Methanoculleus*, einen wichtigen Beitrag zu einer schnellen Bestimmung der Fermenterbiozönose leisten. Besonders die Herleitung eines zu dem von **Petri et al. (2013)** beschriebenen analogen Multiplex-Systems könnte eine kosten-effiziente Untersuchung der Gemeinschaft methanogener Archaea ermöglichen. Da für diese Anwendung gegenwärtig veröffentlichte qPCR-Primer eine maximale Spezifität auf Gattungsebene zeigen (**Sawayama et al., 2006; Yu et al., 2005**) bestünde hier eine Möglichkeit zur Bestimmung auf Art-Niveau, ohne dafür (Meta-)Genomdaten voraus zu setzen. Alternativ könnten SAPD-abgeleitete Fragmente die Grundlage für das Design von artspezifischen qPCR-Primern darstellen. Die Durchführung einer zweiten Amplifikationsrunde im Zuge der Etablierung einer nSAPD-PCR könnte die Spezifität gegebenenfalls weiter bis auf Stamm-Ebene erhöhen und sich so als hilfreich bei der Zusammenstellung von Starterkulturen aus besonders effektiven methanogenen Archaea erweisen.

Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung mittels Oligonukleotid-Sonden auf Grundlage des 23S rRNA Leserahmens wurde bereits erfolgreich zur Differenzierung verschiedener Serotypen der Gattung *Salmonella* angewandt (**Nordentoft et al., 1997**). Für bislang in der probeBase-Datenbank (**Loy et al., 2007**) veröffentlichte Sonden auf Basis des 16S rRNA-Leserahmens zur Hybridisierung der Gattung *Methanobacterium* wurden dagegen nicht nur fehlende Art-Spezifität, sondern auch Kreuzhybridisierungen mit *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> und *Msh. stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> beschrieben (**Raskin et al., 1994**). Das im Rahmen von Vortests analysierte und für den weiteren Verlauf zunächst verworfene Oligonukleotid Mb1535Df ermöglichte bei Paarung mit dem unspezifischen Primer 1535Arv die Amplifikation eines Fragmentes von passender Länge (655 bp). Vor dem Hintergrund, dass Isolat Mb1 ggf. einen Vertreter einer neuen Art darstellt, ergibt sich hier rückwirkend die Möglichkeit einer Artspezifität. Damit wäre eine Anwendung dieses Oligonukleotids als Sonde in dem stringenten, modifizierten Protokoll nach Daims zu prüfen. Auch bei resultierenden Unspezifitäten wäre die Eignung dieses Oligonukleotids zur Amplifizierung eines artspezifischen Fragmentes zusammen mit

dem Primer 1535Arv möglich und würde ähnliche Einsatzmöglichkeiten wie 03Mbf bieten. Da die Sequenz des 23S rRNA-Leserahmens vieler methanogener Archaea gegenwärtig noch unbekannt bzw. unveröffentlicht ist, erschwert die im Vergleich zu 16S rRNA-Gen-basierter Sonden geringere Datengrundlage die Ermittlung spezifischer Hybridisierungsregionen. Für die erstellten Sonden konnte trotz teilweise erheblicher, *in silico* berechneter Nukleotid-Unterschiede in der Binderegion keine ausschließliche Spezifität für *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>, das Isolat Mb1 oder beide Taxa verifiziert werden. Das Hybridisierungsspektrum bzw. die qualitative Analyse der Fluoreszenzintensität der Oligonukleotid-Sonde Cy3.51535E2 folgte dennoch der Anordnung der Referenzstämme im 16S- und 23S rRNA-Gen Stammbaum: Die beste Hybridisierung innerhalb der Gattung *Methanobacterium* gelang mit der Zielspezies *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Weiterhin wird, wenn auch deutlich schwächer, nur eine Gruppe mit der Zielspezies nah verwandter Arten gebunden. Eine Hybridisierung von Arten mit größerer phylogenetischer Distanz, wie *Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> fand nicht statt. Dennoch ergab sich auch hier unter den getesteten Bedingungen eine Hybridisierung mit den gattungsfremden Organismen *Mbb. smithii* PS<sup>T</sup> und *Msh. stadtmannae* MCB-3<sup>T</sup>. Die Sonde Cy3.51535E1 zeigte diese Kreuzhybridisierung ebenfalls, eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität mit zunehmender phylogenetischer Distanz kann den Ergebnissen der FISH jedoch nicht entnommen werden. Die Erklärung der Sonden für eine fehlende Hybridisierung von Isolat Mb1 konnte rückwirkend durch Sequenzanalysen gefunden werden. Die durch Alignments nahegelegte Hybridisierungssequenz liegt in diesem Isolat nicht in der prognostizierten Form vor. Damit waren die für eine Bindung der Sonden notwendigen Sequenzidentitäten nicht gegeben. Die Sonden Cy3.5Mb1D1 und Cy3.5Mb1E2 zeigten hervorragende Bindungseigenschaften für alle getesteten Arten der Gattung *Methanobacterium*. Eine Speziesdifferenzierung wurde daher nicht erreicht. Eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität ergab sich erst bei den gattungsfremden Organismen. Die bisher getroffenen Maßnahmen zur Erhöhung der Stringenz bewirkten keine Zunahme der Spezifität. Durch den Test weiterer modifizierter Hybridisierungsbedingungen kann hier ggf. eine gattungsspezifische Detektion erreicht werden. Die Experimente zur Hybridisierung einer artifiziell mit Zielspezies versetzten BGA-Probe deuteten für alle getesteten Sonden eine Anwendungsmöglichkeit unter diesen Bedingungen an.

Zusammenfassend konnte mit keiner der Sonden eine bessere Spezifität erreicht werden, als sie für die Positivkontroll-Sonde MB1174 auf Basis des 16S rRNA-Leserahmens beschrieben ist. Ein mögliches Anwendungsgebiet der hier vorgestellten Sonden ergibt sich möglicherweise in Kombination mit MB1174. Durch den kombinierten Einsatz von 16S und

23S rRNA-basierter Sonden mit identischer Fluorophormarkierung könnte eine doppelte Hybridisierung der Zielspezies erreicht und durch parallele Bindung an zwei Loci somit die Fluorophordichte pro Organismus gesteigert werden. Theoretisch erscheint auf diese Weise ein intensiveres Fluoreszenzsignal oder eine Verringerung der Mindestanzahl an Ribosomen für eine effektive Detektion möglich. Besonders im Bereich von Umweltproben, wie diejenigen aus BGA, könnten damit geringere Organismen-titer nachgewiesen werden.

## Kapitel V - Zusammenfassung

Im Verlauf der vorliegenden Forschungsarbeit wurden Proben aus fünf landwirtschaftlichen NawaRo-BGA auf die Biozönose methanogener Archaea hin molekularbiologisch untersucht. Parallel wurde die Isolierung der identifizierten Spezies vorgenommen. Über „amplified rDNA restriction analysis“ (ARDRA)-Screening von Klonbibliotheken auf Basis von 16S rRNA-Genfragmenten konnte anhand zweier beispielhafter BGA das Vorkommen von Vertretern der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* nachgewiesen werden. Mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) wurde das Vorkommen dieser Mikroorganismen auch in den übrigen Anlagen gezeigt. Ergänzend dazu wurde in drei Anlagen *Methanospirillum hungatei* nachgewiesen. Veröffentlichte Primer zur sequenzspezifischen quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) konnten für den Einsatz zur Quantifizierung anhand der SYBR-Green I-Chemie adaptiert und Anwendungsprotokolle etabliert werden.

Die relative Anzahl repräsentativer methanogener Klone sowie die Quantifizierung von Vertretern der einzelnen Ordnungen in der qPCR legen die zahlenmäßige Dominanz hydrogenotropher methanogener Archaea in den beprobten Anlagen nahe und unterstrich deren Bedeutung für den biotechnologischen Prozess. Der Methananteil im Biogas entsteht damit vorwiegend aus der Carbonatatmung mit molekularem Wasserstoff als Elektronendonator.

Für jede der vier in den Klonbibliotheken detektierten Gattungen wurden spezifische Isolierungsstrategien ausgearbeitet. Dadurch konnten insgesamt zehn Vertreter der Gattung *Methanobacterium* (Isolate Mb1 bis Mb10) und jeweils ein Vertreter der Gattungen *Methanoculleus* (Isolat Mcu(1)), *Methanosarcina* (Isolat NieKK) und *Methanosaeta* (Isolat Mst1.3) aus den BGA-Proben isoliert werden. Durch *in silico*-Abgleich der partiellen 16S rRNA-Gensequenz wurden diese als Verwandte von *Methanobacterium formicicum* MF<sup>T</sup>, *Methanoculleus bourgensis* MS2<sup>T</sup>, *Methanosarcina mazei* S-6<sup>T</sup> und *Methanosaeta concilii* FE mit einer Sequenzidentität > 97 % identifiziert. Im Laufe der molekularbiologischen Charakterisierung der Isolate mittels DGGE und einer ARDRA-Analyse konnten die Isolate den Referenzstämmen zugeordnet werden. In Bezug auf die Gattung *Methanobacterium* ergaben sich jedoch leichte Abweichungen. Diese bestätigten sich in vergleichenden Analysen des genomischen Fingerabdrucks in der „specifically amplified polymorphic DNA“ (SAPD)-PCR, welche im Rahmen dieser Arbeit erstmalig erfolgreich auf archaeelle Organismen angewandt wurde. Hier zeigten die Isolate zwei von den Fingerabdrücken der

untersuchten Referenzstämme verschiedene Hauptamplifikationsmuster. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Isolate sowie dem signifikanten Vorkommen in qPCR-Analysen und Klonbibliotheken fokussierten sich die weiteren Arbeiten zur genaueren Untersuchung dieser Abweichungen auf phylogenetische Untersuchungen der Gattung *Methanobacterium* und die Entwicklung von Nachweissystemen. Die Aufklärung eines Großteils der 23S rRNA-Gensequenz der Isolate und von ausgewählten Typstämmen ermöglichte ergänzende phylogenetische Untersuchungen zu den durchgeführten 16S rRNA-Analysen. Dabei ergaben sich in beiden Stammbäumen ähnliche Positionierungen der untersuchten Organismen. Die Isolate wurden jeweils in einem Cluster abseits der meisten Referenzstämme aus der Gattung *Methanobacterium* positioniert. Analog zur Musterbildung im Rahmen der SAPD-Analyse zeigte sich eine Differenzierung in zwei Äste und ergab in Übereinstimmung mit den *in silico*-Sequenzabgleichen den höchsten Verwandtschaftsgrad mit *Methanobacterium formicicum* MF<sup>T</sup>. Trotz ihres Ursprungs aus unterschiedlichen BGA erwiesen sich die *Methanobacterium* sp.-Isolate als untereinander nahe verwandt. Dabei zeigten die Isolate Mb1 und Mb10 eine leicht erhöhte phylogenetische Distanz zu den übrigen Isolaten. Dieses ließ sich über die Analyse der Migrationsweiten innerhalb von DGGE-Experimenten ebenso nachvollziehen. Eine MALDI-ToF („Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight“-Analyse ribosomaler Proteine ausgewählter Isolate und Referenzen (MPA, Bremen) bestätigte die Positionierung in einem eigenen Isolat-Cluster mit naher Verwandtschaft zu *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>. Aktuelle, in Kooperation mit weiteren Partnern erzielte Ergebnisse von Gesamtgenom-Sequenzierungen (CeBiTec, Universität Bielefeld) und einer digitalen DNA-DNA-Hybridisierung (DSMZ, Braunschweig) von Isolat Mb1 lieferten starke Hinweise auf die Zugehörigkeit dieses Isolats zu einer bislang unbeschriebenen Art.

Die Eignung der SAPD-PCR zur Ableitung spezifischer Primerpaare konnte erstmals auch für methanogene Archaea gezeigt werden. Aus dem molekularen A-Not-Fingerabdruck gelang die Ableitung der für die Isolate und *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> spezifischen Signatursequenz 03Mbf. Klonierung und Sequenzanalyse ermöglichte die Generierung zweier Primerpaare zur Amplifikation der 03Mbf-Fragmente A und D. Während der Nachweis in Laborkulturen der Zielorganismen mit beiden Fragmenten gelang, war aufgrund der Ausbildung unspezifischer DNA-Amplifikate bei Anwendung der Primer für Fragment D auf DNA-Extrakte aus BGA das Fragment A vorzuziehen. Mit diesem gelang der Nachweis auch in BGA-Proben weitgehend ohne unspezifische Amplifikate. Unter Einbeziehung der sequenzierten 23S rRNA-Genfragmente gelang die Erstellung von Oligonukleotid-Sonden für den Einsatz in Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungs-Experimenten. Eine Hybridisierung von Sonden mit *Mb.*



*formicicum* MF<sup>T</sup> als Zielpezies an Isolat Mb1 gelang nicht und kann als weiterer Hinweis auf Mb1 als Vertreter einer neuen Art gelten. Zwei Sondensets zur Hybridisierung von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und zur parallelen Hybridisierung von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> und Isolat Mb1 wurden entworfen. Im Praxistest ergab sich für diese Sonden eine Spezifität für alle getesteten Vertreter der Gattung *Methanobacterium* sowie für *Methanosphaera stadtmanae* MCB-3<sup>T</sup> und *Methanobrevibacter smithii* PS<sup>T</sup>.

Somit konnten im Laufe der Arbeit die in NawaRo-BGA dominanten methanogenen Archaea in mehrphasigen Experimenten nachgewiesen, quantifiziert und auf wenige Gattungen eingegrenzt werden. Vertreter der vier dominanten Gattungen wurden isoliert und Nachweissysteme für Isolate und Typstämme der Gattung *Methanobacterium* erstellt.

## Kapitel VI - Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit etablierten Methoden und die Ergebnisse der Experimente ergeben eine Vielzahl von Anknüpfungspunkten für zukünftige Arbeiten im Forschungsbereich der mikrobiellen Ökologie und Populationsbestimmung methanogener Archaea in NawaRo-BGA. Die ausgearbeiteten Isolierungsstrategien können in unveränderter Form auf weitere BGA angewandt werden. Eine Modifizierung der DSMZ-Medien 287 und 119 könnte zur Gewinnung einer Anreicherungskultur von *Msp. hungatei* aus den BGA führen, aber auch die Möglichkeit zur Kultivierung weiterer Methanobacteriales in Ergänzung zu den bereits erhaltenen Isolaten bieten.

Ausgehend von den kultivierungsunabhängigen Methoden erscheint sowohl die Verwendung von Primern zur Amplifikation der hypervariablen Region V3 für den Einsatz in DGGE-Analysen als auch die zur Ableitung des 03Mbf-Fragmentes analoge Anwendung der SAPD-PCR-Methode zur Ermittlung von Signatursequenzen von (weiteren) Arten der Gattungen *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* sinnvoll. Die Konstruktion eines Multiplex-Systems würde einen parallelen Nachweis der Organismen und, bei entsprechendem Umfang an Signatursequenzen, ein preisgünstiges Schnellmonitoring der typischen Zusammensetzung der Population methanogener Archaea in NawaRo-BGA erlauben. Eine Verbesserung des qPCR-Protokolls könnte durch einen Wechsel auf ein sequenzspezifisches Detektionssystem unter Verwendung von z.B. TaqMan<sup>®</sup>-Sonden oder Scorpion<sup>®</sup>-Primer erreicht werden. Ein paralleles Ersetzen der Zellzahl-Standardgeraden gegen die Nutzung von Fragmentanzahl-Standards würde zwar den Nachteil des Wegfalls einer identischen DNA-Extraktionseffizienz von Standard und Probe mit sich bringen, auf der anderen Seite die Konstruktion von Kalibrierungsgeraden enorm vereinfachen. Im Zuge dieser Umstellung könnte die Klonierung von 16S rRNA- oder *mcrA*-Fragmenten aus jeder der zu quantifizierenden Ordnungen oder Gattungen in ein Plasmid zur Erstellung einer „Breitband-DNA-Vorlage“ für die Konstruktion von DNA-Kalibrierungsgeraden beitragen. Alternativ bietet die SAPD-PCR und deren Erweiterung zur „nested“-SAPD-PCR (nSAPD) die Möglichkeit zur Ableitung qPCR-fähiger Primerpaare mit Spezifität auf Art-Niveau und damit eine Chance zur feiner aufgelösten Quantifizierung methanogener Archaea in Umweltproben. Intensive Untersuchungen des „NawaRo-Clusters“ innerhalb der Gattung *Methanobacterium* macht gerade vor dem Hintergrund von Isolat Mb1 als putativen Kandidaten einer unbeschriebenen Art Sinn. Isolat Mb10 zeigte ähnliche Abweichungen in den polyphasischen Experimenten und stellt damit ein geeignetes Isolat für z.B.

Genomsequenzierungs-Ansätze dar. Die tatsächliche Positionierung von Mb9 in den phylogenetischen Kontext könnte weitere Erkenntnisse bezüglich der Aufspaltung des „NawaRo-Clusters“ in zwei Äste erbringen. Planungen und vorbereitende Arbeiten zum Vorhaben einer Genomsequenzierung aller in der DSMZ vorhandener Typstämme der Gattung *Methanobacterium* sowie der zehn im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Isolate werden gegenwärtig vorangetrieben. Im Bereich der FISH-Sonden ist vor weiteren Untersuchungen zunächst die Anwendung auf die komplexe Matrix frischer BGA-Proben zu prüfen. Die Spiking-Ansätze deuteten bereits auf eine Detektionfähigkeit hin. Des Weiteren ist die Durchführbarkeit einer parallelen Anwendung von 16S rRNA- und 23S rRNA-basierten Oligonukleotidsonden zum Zwecke einer potentiellen Signalintensitätssteigerung experimentell zu verifizieren.

## Kapitel VII - Literatur

- 13. AtGÄndG** (2011). Dreizehntes Gesetz zur Änderung des Atomgesetzes vom 31. Juli 2011. Bundesgesetzblatt Jahrgang 2011, Teil 1, Nr. 43 vom 05.08.2011, Seite 1704. URL: [http://www.bgbl.de/Xaver/start.xav?startbk=Bundesanzeiger\\_BGBl&bk=Bundesanzeiger\\_BGBl&start=//%5B@attr\\_id=%27bgbl111s1704.pdf%27%5D](http://www.bgbl.de/Xaver/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&bk=Bundesanzeiger_BGBl&start=//%5B@attr_id=%27bgbl111s1704.pdf%27%5D). Letzter Zugriff 26.05.2012.
- Abken H. J., Tietze M., Brodersen J., Bäumer S., Beifuss U., Deppenmeier U.** (1998). Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. J Bacteriol. 180:2027-2032.
- Akarsubasi A. T., Ince O., Oz N. A., Kirdar B., Ince B. K.** (2006). Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. Process Biochem. 41: 28-35.
- Angelidaki I., Ahring B. K.** (1993). Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. Appl Microbiol Biotechnol. 38:560-564.
- Angenent L. T., Sung S., Raskin L.** (2002). Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. Water Res. 36:4648-4654.
- Attebery H. R., Finegold S. M.** (1969). Combined screw-cap and rubber-stopper closure for Hungate tubes (pre-reduced anaerobically sterilized roll tubes and liquid media). Appl Microbiol. 18:558-561.
- Balch W. E., Fox G. E., Magrum L. J., Woese C. R., Wolfe R. S.** (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol Rev. 43:260-296.
- Bang C.** (2013). Functional analysis of antimicrobial peptides affecting methanogenic archaea and response of the innate immune system to archaea. Dissertationsschrift, angefertigt an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Baptiste E., Brochier C., Boucher Y.** (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. Archaea. 1:353-363.
- Barns S. M., Delwiche C. F., Palmer J. D., Pace N. R.** (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 93:9188-9193.
- Bauer C., Korthals M., Gronauer A., Lebuhn M.** (2008). Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. Water Sci Tech. 58:1433-1439.
- Bauer C., Lebuhn M., Gronauer A.** (2009). Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)-Schriftenreihe Vol. 12. Direkt Marketing & Digitaldruck, Hallbergmoos.
- Becher B., Müller V, Gottschalk G.** (1992). N<sup>5</sup>-methyl-tetrahydromethano-pterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an Na<sup>+</sup>-translocating membrane protein. J Bacteriol. 174:7656-7660.
- Belay N., Mukhopadhyay B., Conway de Macario E., Galask R., Daniels L.** (1990). Methanogenic bacteria in human vaginal samples. J Clin Microbiol. 28:1666-1668.
- Bell S. D., Jackson S. P.** (1998). Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. Trends Microbiol. 6:222-228.

- Bergmann I., Mundt K., Sontag M., Baumstark I., Nettmann E., Klocke M.** (2010). Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Syst Appl Microbiol.* 33:78-84.
- Bergmann I., Nettmann E., Mundt K., Klocke M.** (2010). Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Can J Microbiol.* 56:440-444.
- BGR** (2009). *Energierohstoffe 2009 – Reserven, Ressourcen, Verfügbarkeit – Erdöl, Erdgas, Kohle, Kernbrennstoffe, Geothermische Energie*, November 2009. Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover, Deutschland. ISBN: 978-3-9813373-1-0, URL:[http://www.bgr.bund.de/DE/Themen/Energie/Downloads/Energierohstoffe\\_2009\\_Teil11.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.bgr.bund.de/DE/Themen/Energie/Downloads/Energierohstoffe_2009_Teil11.pdf?__blob=publicationFile&v=2). Letzter Zugriff 17.05.2012.
- Blättel V., Petri A., Rabenstein A., Kuever J., König H.** (2008). Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using biomolecular fingerprinting methods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:4597-4606.
- BMU** (2011). *Erneuerbare Energien - Innovationen für eine nachhaltige Energiezukunft*, 8. Auflage Oktober 2011. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Silber Druck, Niestetal.
- Boone D. R.** (2001). Genus I *Methanobacterium*. In: Staley T. S., Boone D. R., Brenner D. J., Castenholz R. W., Garrity G. M., Goodfellow M., Krieg N. R., Rainey F. A., Schleifer K.-H., Holt J. G., Liston J., Moulder J. W., Murray R. G. E., Niven C. F., Pfennig N., Sneath P. H. A., Tully J. G., Williams S. T. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume One The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer-Verlag, New York, pp 215-218.
- Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P.** (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol.* 6:245-252.
- Brochier-Armanet C., Forterre P., Gribaldo S.** (2011). Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Curr Opin Microbiol.* 14:274-281.
- Burke S. A., Lo S. L., Krzycki J. A.** (1998). Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *J Bacteriol.* 180:3432-3440.
- Cheeseman P., Toms-Wood A., Wolfe R. S.** (1972). Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor 420, from *Methanobacterium* Strain M.o.H. *J Bacteriol.* 112:527-531.
- Chen M.** (1983). Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 45:1271-1276.
- Chistoserdova L., Vorholt J. A., Thauer R. K., Lidstrom M. E.** (1998). C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science.* 281:99-102.
- Chong S. C., Boone D. R.** (2001). Genus II *Methanoculleus*. In: Staley T. S., Boone D. R., Brenner D. J., Castenholz R. W., Garrity G. M., Goodfellow M., Krieg N. R., Rainey F. A., Schleifer K.-H., Holt J. G., Liston J., Moulder J. W., Murray R. G. E., Niven C. F., Pfennig N., Sneath P. H. A., Tully J. G., Williams S. T. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume One The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer-Verlag, New York, pp 251-252.
- Chun J., Lee J.-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B. K., Lim, Y. W.** (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259-2261

- Cleenwerck I, De Vos P.** (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *Int J Food Microbiol.* 125:2-14.
- Conway de Macario E., Macario A. J. L.** (2009). Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol.* 299:99-108.
- Daims H., Stoecker K., Wagner M.** (2005). Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of procaryotes. In: Osborn A. M. und Smith C. J. (ed) BIOS Advanced Methods Molecular Microbial Ecology. Taylor & Francis Group, Abingdon.
- Danson M. J., Henry J. L., Hough D. W.** (2007). Central Metabolism. In: Cavicchioli R. (ed.) Archaea – molecular and cellular biology. ASM Press, Washington DC, pp 260-287.
- De Vrieze J., Hennebel T., Boon N., Verstraete W.** (2012). *Methanosarcina*: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour Technol.* 112:1-9.
- DeLong E. F.** (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5685-5689.
- Demirel B., Scherer P.** (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 7:173–190.
- DiMarco A. A., Bobik T. A., Wolfe R. S.** (1990). Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annu Rev Biochem.* 59:355-394.
- Dolfing J., Mulder J.-W.** (1985). Comparison of methane production rate and coenzyme F<sub>420</sub> content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol.* 49:1142-1145.
- DSMZ** (2007a). 287. *Methanogenium olentangyi* medium. Nährmedien-Katalog des Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. URL: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium287.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium287.pdf). Letzter Zugriff 01.05.2013
- DSMZ** (2007b). 332. *Methanoculleus bourgense* medium. Nährmedien-Katalog des Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. URL: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium322.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium322.pdf). Letzter Zugriff 01.05.2013
- DSMZ** (2007c). 318. *Methanosarcina* (BCYT) medium. Nährmedien-Katalog des Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. URL: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium318.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium318.pdf). Letzter Zugriff 01.05.2013
- DSMZ** (2007d). 334b. *Methanosaeta harundinacea* medium. Nährmedien-Katalog des Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. URL: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium334b.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium334b.pdf). Letzter Zugriff 01.05.2013
- Eder, B.** (2012). Biogas Praxis - Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele Wirtschaftlichkeit, Umwelt. 5. überarbeitete Auflage, ökobuch Verlag, Staufeu.
- Eggen R. I., Geerling A. C., Boshoven A. B., de Vos W. M.** (1991). Cloning, sequence analysis, and functional expression of the acetyl coenzyme A synthetase gene from *Methanotherix soehngenii* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 173:6383-6389.
- Eirich L. D., Vogels G. D., Wolfe R. S.** (1979). Distribution of coenzyme F<sub>420</sub> and properties of its hydrolytic fragments. *J Bacteriol.* 140:20-27.
- Erb T. J.** (2011). Carboxylases in natural and synthetic microbial pathways (supplemental material). *Appl Environ Microbiol.* 77:8466-8477.

- Ermler U., Grabarse W., Shima S., Goubeaud M., Thauer R. K.** (1997). Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*. 278:1457-1462.
- EurObserv'ER** (2011). The state of renewable energies in europe. 11<sup>th</sup> EurObserv'ER report. Observ'ER, Paris. ISSN: 2101-9622. URL: <http://www.eurobserv-er.org/pdf/barobilan11.pdf>. Letzter Zugriff 28.10.2012.
- Färber G., Keller W., Kratky C., Jaun B., Pfaltz A., Spinner C., Kobelt A., Eschenmoser A.** (1991). Coenzyme F430 from methanogenic bacteria: Complete assignment of configuration based on an X-Ray analysis of 12,13-Diepi-F430 pentamethyl ester and on NMR spectroscopy. *Helv Chim Acta*. 74:697–716.
- Felsenstein J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Felske A., Osborn A. M.** (2005). DNA fingerprinting of microbial communities. In: Osborn A. M. und Smith C. J. (ed) *BIOS Advanced Methods Molecular Microbial Ecology*. Taylor & Francis Group, Abingdon.
- Ferry J. G., Kestead K. A.** (2007). Methanogenesis. In: Cavicchioli R. (ed.) *Archaea – molecular and cellular biology*. ASM Press, Washington DC, pp 288-314.
- Ferry J. G.** (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol Rev*. 23:13-38.
- FNR** (2010). Standortangepasste Anbausysteme für Energiepflanzen - Ergebnisse des Verbundprojektes „Entwicklung und Vergleich von optimierten Anbausystemen für die landwirtschaftliche Produktion von Energiepflanzen unter den verschiedenen Standortbedingungen Deutschlands, EVA I“. 3. veränderte und erweiterte Auflage. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.). Media Cologne Kommunikationsmedien GmbH, Hürth.
- FNR** (2011a). *Biogas – Pflanzen, Rohstoffe, Produkte*, 7. Auflage August 2011. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Druckerei Weidner, Rostock.
- FNR** (2011b) Online-Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). Grafik „Gasausbeuten verschiedener Substrate (FM)“ FNR Gülzow-Prüzen, Deutschland. URL: <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/gasausbeuten-verschiedener-substrate-fm.html> Letzter Zugriff: 09.05.2013.
- FNR** (2012). *Basisdaten Bioenergie Deutschland August 2012 - Festbrennstoffe, Biokraftstoffe, Biogas*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.). Tangram documents, Bentwisch.
- FNR** (2013a). Online-Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Grafik „Die Bedeutung der Bioenergie unter den erneuerbaren Energien / Endenergie“. FNR, Gülzow-Prüzen, Deutschland. URL: <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/die-bedeutung-der-bioenergie-unter-den-erneuerbaren-energien-endenergie.html> Letzter Zugriff 05.11.2013.
- FNR** (2013b). Online-Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Grafik „THG-Vermeidung durch die Nutzung erneuerbarer Energien in 2012“. FNR, Gülzow-Prüzen, Deutschland. URL: <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/thg-vermeidung-durch-die-nutzung-erneuerbarer-energien-in-2012.html> Letzter Zugriff 05.11.2013.
- FNR** (2013c). Online-Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). Grafik „Massebezogener Substrateinsatz in Biogasanlagen“. <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/massebezogener-substrateinsatz-in-biogasanlagen.html> Letzter Zugriff: 05.11.2013.

- FNR** (2013d) Online-Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). Grafik „Massebezogener Substrateinsatz nachwachsender Rohstoffe in Biogasanlagen 2012“. URL: <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/massebezogener-substrateinsatz-nachwachsender-rohstoffe-in-biogasanlagen.html> Letzter Zugriff: 05.11.2013.
- FNR** (2013e). Online-Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). Grafik „Entwicklung Biogasanlagen“. <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie/biogas/entwicklung-biogasanlagen.html> Letzter Zugriff: 05.11.2013.
- Fox G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T. A., Wolfe R. S., Balch W. E., Tanner R. S., Magrum L. J., Zablensky L. B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Luehrsen K. R., Chen K. N., Woese C. R.** (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209:457-463.
- Fox G. E., Wisotzkey J. D. and Jurtschuk Jr. P.** (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. 42:166-170.
- Friehe J., Weiland P., Schattauer A.** (2010). Beschreibung ausgewählter Substrate. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.) Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. 5. Auflage. Stadtdruckerei Weidner, Rostock pp.75-85.
- Fröhlich J., Pfannebecker J.** (2006). Spezies-unabhängiges Nachweisverfahren für biologisches Material. Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 022 569 A1.
- Fuhrman J. A., McCallum K., Davis A. A.** (1991). Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356:148-149
- Gallert C., Bauer S., Winter J.** (1998). Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Appl Microbiol Biotechnol*. 50:495-501.
- Gallert C., Winter J.** (1997). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:405-410
- Garcia J. L., Patel B. K., Ollivier B.** (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*. 6:205-226.
- García-Martínez J., Acinas S. G., Antón A. I., Rodríguez-Valera F.** (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods*. 36:55-64.
- Gencic S., Grahame D. A.** (2003). Nickel in subunit  $\beta$  of the acetyl-CoA decarbonylase/synthase multienzyme complex in methanogens. Catalytic properties and evidence for a binuclear Ni-Ni site. *J Biol Chem*. 278:6101-6110.
- Goberna M., Gadermaier M., García C., Wett B., Insam H.** (2010). Adaptation of methanogenic communities to the cofermentation of cattle excreta and olive mill wastes at 37°C and 55°C. *Appl Environ Microbiol*. 76:6564-6571.
- Godon J. J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R.** (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*. 63:2802-2813.
- Gong W., Hao B., Wei Z., Ferguson D. J. Jr, Tallant T., Krzycki J. A., Chan M. K.** (2008). Structure of the  $\alpha_2\epsilon_2$  Ni-dependent CO dehydrogenase component of the *Methanosarcina barkeri* acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:9558-9563.
- Grabowski B., Kelman Z.** (2003). Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol*. 57:487-516.



- Grahame D. A., DeMoll E.** (1996). Partial reactions catalyzed by protein components of the acetyl-CoA decarbonylase synthase enzyme complex from *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem.* 271:8352-8358.
- Gribaldo S., Brochier-Armanet C.** (2006). The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361:1007-1022.
- Griffin M. E., McMahon K. D., Mackie R. I., Raskin L.** (1998). Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol Bioeng.* 1998 57:342-355.
- Gupta G., Samant K., Sahu A.** (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int J Microbiol.* 2012:578925. DOI:10.1155/2012/578925.
- Guss A. M., Kulkarni G., Metcalf W. W.** (2009). Differences in hydrogenase gene expression between *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol.* 2009 191:2826-2833.
- Hand C. E., Honek J. F.** (2005). Biological chemistry of naturally occurring thiols of microbial and marine origin. *J Nat Prod.* 2005 68:293-308.
- Hartmann G. C., Klein A. R., Linder M., Thauer R. K.** (1996). Purification, properties and primary structure of H<sub>2</sub>-forming N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Arch Microbiol.* 165:187-193.
- Hedderich R., Koch J., Linder D., Thauer R. K.** (1994). The heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains sequence motifs characteristic of pyridine-nucleotide-dependent thioredoxin reductases. *Eur J Biochem.* 225:253-261.
- Hendriksen H. V., Ahring B. K.** (1991). Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 85:241-246.
- Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y.** (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Appl Environ Microbiol.* 72:1623-1630.
- Horz H.-P., Conrads G.** (2010). The discussion goes on: What is the role of euryarchaeota in humans? *Archaea.* 2010:967271, DOI: 10.1155/2010/967271
- Houpiikian P., Raoult D.** (2001). 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* 39:2768–2778.
- Huber H., Thomm M., König H., Thies G., Stetter K. O.** (1982). *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch Microbiol.* 132:47-50.
- Jacobson F., Walsh C.** (1984). Properties of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavins relevant to redox coenzyme function in methanogen metabolism. *Biochemistry* 23:979–988.
- Jaenicke S., Ander C., Bekel T., Bisdorf R., Dröge M., Gartemann K. H., Jünemann S., Kaiser O., Krause L., Tille F., Zakrzewski M., Pühler A., Schlüter A., Goesmann A.** (2011). Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One.* 6:e14519.
- Jarvis G. N., Strömpl C., Burgess D. M., Skillman L. C., Moore E. R., Joblin K. N.** (2000). Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Curr Microbiol.* 40:327-332.

- Jetten M. S. M., Stams A. J. M., Zehnder A. J. B.** (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. FEMS Microbiol Lett. 88:181–197.
- Johnson J. L., Bastian N. R., Schauer N. L., Ferry J. G., Rajagopalan K. V.** (1991). Identification of molybdopterin guanine dinucleotide in formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. FEMS Microbiol Lett. 61:213-216.
- Jones W. J., Leigh J. A., Mayer F., Woese C. R., Wolfe R. S.** (1983b). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. Arch Microbiol. 136:254-261.
- Jones W. J., Nagle D. P., Jr, Whitman W. B.** (1987). Methanogens and the diversity of archaeobacteria. Microbiol Rev. 51:135–177.
- Jones W. J., Paynter M. J. B., Gupta R.** (1983a). Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. Arch Microbiol. 135:91-97, DOI: 10.1007/BF00408015.
- Jusoffie A., Gottschalk G.** (1986). Further studies on the distribution of cytochromes in methanogenic bacteria. FEMS Microbiol Lett. 37:15-18.
- Kaesler B., Schönheit P.** (1989). The sodium cycle in methanogenesis. CO<sub>2</sub> reduction to the formaldehyde level in methanogenic bacteria is driven by a primary electrochemical potential of Na<sup>+</sup> generated by formaldehyde reduction to CH<sub>4</sub>. Eur J Biochem. 186:309-316.
- Kaiser F., Metzner T., Effenberger M., Gronauer A.** (2007). Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Schriftenreihe. LfL (ed.) Freising-Weihenstephan. Lerchl-Druck, Freising.
- Karakashev D., Batstone D. J., Angelidaki I.** (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. Appl Environ Microbiol. 71:331-338.
- Karrasch M., Börner G., Thauer R. K.** (1990). The molybdenum cofactor of formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri* is a molybdopterin guanine dinucleotide. FEBS Lett. 274:48-52.
- Keltjens J. T., Vogels G. D.** (1993). Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. In: Ferry, J. G. (ed.) Methanogenesis – ecology, physiology, biochemistry & genetics. Chapman & Hall, New York pp. 253-303.
- Kim O. S., Cho Y. J., Lee K., Yoon S. H., Kim M., Na H., Park S. C., Jeon Y. S., Lee J. H., Yi H., Won S., Chun J.** (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol 62:716–721.
- Kletzin A.** (2007). General characteristics and important model organisms. In: Cavicchioli R. (ed.) Archaea – molecular and cellular biology. ASM Press, Washington DC, pp 14-92.
- Klocke M., Mähnert P., Mundt K., Souidi K., Linke B.** (2007). Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. Syst Appl Microbiol. 30:139-151.
- Kobayashi H. A., Conway de Macario E., Williams R. S., Macario A. J.** (1988). Direct characterization of methanogens in two high-rate anaerobic biological reactors. Appl Environ Microbiol. 54:693-698.
- Koga Y., Nishihara M., Morii H., Akagawa-Matsushita M.** (1993). Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. Microbiol Rev. 57:164–182.

- König H.** (1988). Archaeobacteria. In: Rehm H.-J., Reed G. (ed) *Biotechnology*, Vol. 6b. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp 698-728.
- König H., Nusser E., Stetter K. O.** (1985). Glycogen in *Methanobolus* and *Methanococcus*. *FEMS Microbiol Lett.* 28:265–269.
- König, H.** (2009). Biology of Methanogenic Archaea. In: Chauhan AK, Varma A (ed.) *A Text Book of Molecular Biotechnology*, Vol 1. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, pp 915-933
- König, H., Kandler O.** (1979). N-Acetylglucosaminuronic acid a constituent of the pseudomurein of the genus *Methanobacterium*. *Arch Microbiol.* 123:295-299.
- Konstantinidis K. T., Ramette A., Tiedje J. M.** (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Phil Trans R Soc B.* 361:1929–1940.
- Kotelnikova S., Macario A. J., Pedersen K.** (1998). *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. *Int J Syst Bacteriol.* 48:357-367
- Krakat N, Westphal A, Schmidt S, Scherer P.** (2010c). Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. *Appl Environ Microbiol.* 76:1842-1850.
- Krakat N., Schmidt S., Scherer P.** (2010a). Mesophilic fermentation of renewable biomass: does hydraulic retention time regulate methanogen diversity? *Appl Environ Microbiol.* 76:6322-6326.
- Krakat N., Westphal A., Satke K., Schmidt S., Scherer P.** (2010b). The microcosm of a biogas fermenter: Comparison of moderate hyperthermophilic (60°C) with thermophilic (55°C) conditions. *Eng Life Sci.* 10:520-527
- Krause L., Diaz N. N., Edwards R. A., Gartemann K. H., Krömeke H., Neuweiger H., Pühler A., Runte K. J., Schlüter A., Stoye J., Szczepanowski R., Tauch A., Goesmann A.** (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J Biotechnol.* 136:91-101.
- Kröber M., Bekel T., Diaz N. N., Goesmann A., Jaenicke S., Krause L., Miller D, Runte K. J., Viehöver P., Pühler A., Schlüter A.** (2009). Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Biotechnol.* 142:38-49.
- Lebuhn, M.** (2011). Mikrobiologische Optimierung des Biogasprozesses. In: Kongressband des Biogas-Fortbildungsseminars 08.02.2011 in Kloster Banz. URL: [http://www.aelf-mn.bayern.de/internet/stmlf/behoerden/aemter/mn/erwerbsskombination/44274/linkurl\\_7.pdf](http://www.aelf-mn.bayern.de/internet/stmlf/behoerden/aemter/mn/erwerbsskombination/44274/linkurl_7.pdf). Letzter Zugriff 27.10.2012.
- Lee M. J., Zinder S. H.** (1988). Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic co-culture. *Appl Environ Microbiol.* 54:1457–1461.
- Lemmer A., Vintiloiu A., Preißler D., Bastam C., Bäuerle L., Oechsner H.** (2010). Untersuchungen zum Einsatz von Mineralstoffen in Biogasanlagen – Bedeutung der Mineralstoffe für die anaeroben Mikroorganismen und Ursachen für Konzentrationsunterschiede in Biogasfermentern. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.). *Gülzower Fachgespräche Band 35 - Einsatz von Hilfsmitteln zur Steigerung der Effizienz und Stabilität des Biogasprozesses*. ISBN: 978-3-942-147-03-3.
- Leván L., Eriksson A. R., Schnürer A.** (2007). Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiol Ecol.* 59:683-693.
- Liao D.** (2000). Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol.* 2000 51:305-317

- Liebetrau J., Friehe J., Weiland P., Schreiber A.** (2010). Betrieb von Biogasanlagen. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.) Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. 5. Auflage. Stadtdruckerei Weidner, Rostock pp.86-116.
- Liu D., Zeng R. J., Angelidaki I.** (2008). Effects of pH and hydraulic retention time on hydrogen production versus methanogenesis during anaerobic fermentation of organic household solid waste under extreme-thermophilic temperature (70°C). *Biotechnol Bioeng.* 100:1108-1114.
- Liu F. H., Wang S. B., Zhang J. S., Zhang J., Yan X., Zhou H. K., Zhao G. P., Zhou Z. H.** (2009). The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *J Appl Microbiol.* 106:952-966.
- Loy A., Maixner F., Wagner M., Horn M.** (2007). probeBase-an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35:D800-D804
- Lü Z., Lu Y.** (2012) *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic Methanogen, isolated from chinese rice field soil. *PLoS One.* 2012; 7: e35279. DOI: 10.1371/journal.pone.0035279.
- Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H., Pretorius I. S.** (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:506–577.
- Ma K., Liu X., Dong X.** (2005). *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:325-9.
- Macario A. J., Conway de Macario E.** (1988). Quantitative immunologic analysis of the methanogenic flora of digestors reveals a considerable diversity. *Appl Environ Microbiol.* 54:79-86.
- Maestrojuán G. M., Boone D. R., Xun L., Mah R. A., Zhang L.** (1990). Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the genus *Methanoculleus* gen. nov., emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and description of new strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *Int J Syst Evol Bacteriol.* 40:117-122.
- Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Cibis K., Eikmeyer F.G., König H., Pühler A., Schlüter A.** (2013). Complete genome sequence of the hydrogenotrophic archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1, isolated from a production-scale biogas plant. *J Biotechnol.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.013> (im Druck).
- Maus I., Wibberg D., Stantscheff R., Eikmeyer F.G., Seffner A., Boelter J., Szczepanowski R., Blom J., Jaenicke S., König H., Pühler A., Schlüter A.** (2012). Complete genome sequence of the hydrogenotrophic, methanogenic archaeon *Methanoculleus bourgensis* strain MS2<sup>T</sup>, isolated from a sewage sludge digester. *J Bacteriol.* 194:5487–5488.
- McCormick J. R. D., Morton G. O.** (1982). Identity of cosynthetic factor I of *Streptomyces aureofaciens* and fragment FO from coenzyme F<sub>420</sub> of *Methanobacterium* species. *J Am Chem Soc.* 104:4014–4015.
- McHugh S., Carton M., Mahony T., O'Flaherty V.** (2003). Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors *FEMS Microbiol Lett.* 219:297-304.
- McMahon K. D, Stroot P. G, Mackie R. I., Raskin L.** (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions - II: Microbial population dynamics. *Water Res.* 35:1817-1827.
- Meher K. K., Ranade D. R.** (1993). Isolation of propionate degrading bacterium in co-culture with a methanogen from a cattle dung biogas plant. *J Biosci.* 18:271-277.

- Meher K. K., Kadam P., Ranade D. R.** (1996). Short communication: Butyrate-degrading syntrophic culture from an anaerobic digester treating cattle waste. *World J Microbiol Biotechnol.* 12:105-106.
- Michalke K., Schmidt A., Huber B., Meyer J., Sulkowski M., Hirner A. V., Boertz J., Mosel F., Dammann P., Hilken G., Hedrich H. J., Dorsch M., Rettenmeier A. W., Hensel R.** (2008). Role of intestinal microbiota in transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Appl Environ Microbiol.* 74:3069–3075.
- Miller L. T., Wolin M. J.** (1974). Serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol.* 27:985-987
- Mori K., Harayama S.** (2011). *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:138-143.
- Mukhopadhyay B., Purwantini E., Pihl T. D., Reeve J. N., Daniels L.** (1995). Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the coenzyme F<sub>420</sub>-dependent methylene-5,6,7,8-tetrahydromethanopterin dehydrogenase gene from *Methano-bacterium thermoautotrophicum* strain Marburg and functional expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 270:2827-2832.
- Müller V., Blaut M., Gottschalk G.** (1993). Bioenergetics of methanogenesis. In: Ferry, J. G. (ed.) *Methanogenesis – ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Chapman & Hall, New York pp. 360-406.
- Munk B., Bauer C., Gronauer A., Lebuhn M.** (2010). Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Eng Life Sci.* 10:496–508.
- Murray P. A., Zinder S. H.** (1987). Polysaccharide reserve material in the acetotrophic methanogen, *Methanosarcina thermophila* strain TM-1: accumulation and mobilization. *Arch Microbiol.* 147:109-116.
- Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59:695-700.
- Nagamani, B., Ramasamy, K.** (1999). Biogas production technology: An Indian perspective. *Curr Sci.* 77:44-55.
- Nettmann E., Bergmann I., Mundt K., Linke B., Klocke M.** (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J Appl Microbiol.* 105:1835-1850.
- Nettmann, E., Bergmann I., Pramschüfer S., Mundt K., Plogsties V., Herrmann C., Klocke M.** (2010). Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl Environ Microbiol.* 76:2540-2548.
- Nordentoft S., Christensen H., Wegener H. C.** (1997). Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections. *J Clin Microbiol.* 35:2642-2648.
- Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H., Chee G.-J., Hattori M., Kanai A., Atomi H., Takai K., Takami H.** (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* 39:3204–3223.
- Pellerin P., Gruson B., Prensier G., Albagnac G., P. Debeire** (1987). Glycogen in *Methanothrix*. *Arch Microbiol.* 146:377-381.
- Petri A., Pfannebecker J., Fröhlich J., König H.** (2013). Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol.* 33:48-54.

- Pfannebecker J., Fröhlich J.** (2008). Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int J Food Microbiol.* 128:288-296.
- Preißler D., Lemmer A., Oechsner H., Jungbluth T.** (2009). Möglichkeiten der Prozessoptimierung in Biogasanlagen. Vortrag zur Bioenergie-Fachtagung 06.02.2009 in Herbertingen-Marbach. URL: <http://www.vlf-sig.de/media/energietag/3%20Preissler%20Moeglichkeiten%20Prozessoptimierung%20Biogasanlagen.pdf>. Letzter Zugriff 27.10.2012.
- Ragsdale S. W., Pierce E.** (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim Biophys Acta.* 1784:1873-1898.
- Ranade D. R., Gore J. A., Godbole S. H.** (1980). Methanogenic organisms from fermenting slurry of the Gobar gas plant. *Curr Sci.* 49:395-397
- Raskin L., Stromley J. M., Rittmann B. E., Stahl D. A.** (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol.* 60:1232–1240.
- Rastogi G., Ranade D. R., Yeole T. Y., Patole M. S., Shouche Y. S.** (2008). Investigation of methanogen population structure in biogas reactor by molecular characterization of methyl-coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes. *Bioresour Technol.* 99:5317-5326
- Reineke W., Schlömann M.** (2007). *Umweltmikrobiologie*, 1. Auflage 2007. Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, Deutschland. ISBN: 978-3-8274-1346-8.
- REN21** (2011). *Renewables 2011 Global Status Report, Version 2.1 August 2011.* Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, Paris, Frankreich. URL: [http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21\\_GSR2011.pdf](http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21_GSR2011.pdf). Letzter Zugriff 17.05.2012.
- Röder C.** (2007). Entwicklung von molekularen Sonden für die sichere Identifizierung von Hefen der Gattungen *Brettanomyces/Dekkera*. Dissertationsschrift, angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Saitou N., Nei M.** (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.
- Sasaki K., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y.** (2006). Archaeal population on supporting material in methanogenic packed-bed reactor. *J Biosci Bioeng.* 102:244-246.
- Sawayama S., Tsukahara K., Yagishita T.** (2006) Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresour Technol.* 97:69-76
- Scherer P., Höllriegel V., Krug C., Bokel M., Renz P.** (1984). On the biosynthesis of 5-hydroxybenzimidazolylcobamide (vitamin B<sub>12</sub>-factor III) in *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol.* 138:354-359.
- Schink B.** (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:262-280.
- Schleper C., Jurgens G., Jonuscheit M.** (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol.* 3:479-488.
- Schnürer A., Zellner G., Svensson B. H.** (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol Ecol.* 29:249-261
- Scholten J. C., Conrad R.** (2000). Energetics of syntrophic propionate oxidation in defined batch and chemostat cocultures. *Appl Environ Microbiol.* 66:2934-2942.
- Sebastian P., Herr P., Fischer U., König H.** (2011). Molecular identification of lactic acid bacteria occurring in must and wine. *S Afr J Enol Vitic.* 32:300-309.

- Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A., Harada H.** (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol.* 65:1280–1288.
- Setzke E., Hedderich R., Heiden S., Thauer R. K.** (1994). H<sub>2</sub>:heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Composition and properties. *Eur J Biochem.* 220:139-148.
- Sharma A. D., Gill P. K., Singh P.** (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:415a-415f
- Singh K. M., Pandya P. R., Parnerkar S., Tripathi A. K., Rank D. N., Kothari R. K., Joshi C. G.** (2011). Molecular identification of methanogenic archaea from Surti buffaloes (*bubalus bubalis*), reveals more hydrogenotrophic methanogens phylotypes. *Braz. J. Microbiol.* 42:132-139.
- Spring S., Scheuner C., Lapidus A., Lucas S., Glavina Del Rio T., Tice H., Copeland A., Cheng J.-F., Chen F., Nolan M., Saunders E., Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Lykidis A., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C. D., Goodwin L., Detter J. C., Brettin T., Rohde M., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J. A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N. C., Klenk H.-P.** (2010). The genome sequence of *Methanohalophilus mahii* SLPT reveals differences in the energy metabolism among members of the *Methanosarcinaceae* inhabiting freshwater and saline environments. *Archaea.* 2010; 2010:690737. Online-Veröffentlichung DOI: 10.1155/2010/690737. Letzter Zugriff: 23.09.2012.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A., Kämpfer P., Maiden M. C., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H. G., Vauterin L., Ward A. C., Whitman W. B.** (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002 52:1043-1047.
- Stackebrandt E., Goebel B. M.** (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44:846-849.
- Stupperich E., Kräutler B.** (1988). Pseudo vitamin B12 or 5-hydroxybenzimidazolylcobamide are the corrinoids found in methanogenic bacteria. *Arch Microbiol.* 149:268–271.
- Sullivan J. T., Eardly B. D., van Berkum P., Ronson C. W.** (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol.* 62:2818-2825.
- Tabatabei M., Zakaria M. R., Rahim R. A., Wright A.-D. G., Shirai Y., Abdullah N., Sakai K., Ikeno S., Mori M., Kazunori N., Sulaiman A., Hassan M. A.** (2009). PCR-based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent. *Electron J Biotechnol.* 12 DOI: 10.2225/vol12-issue3-fulltext-4
- Tajima K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Aminov R. I.** (2001). Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiol Lett.* 200:67-72.
- Tamura K., Nei M., Kumar S.** (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:11030-11035.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-2739.

- Tatsuoka N., Mohammed N., Mitsumori M., Tajima K., Hara K., Kurihara M., Itabashi H.** (2007) Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Animal Sci J* 78:512-518.
- Taylor C. D., Wolfe R. S.** (1974). Structure and Methylation of Coenzyme M (HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). *J Biol Chem.* 249:4879-4885.
- Thauer R. K.** (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology.* 144:2377-2406.
- Thauer R. K., Hedderich R., Fischer R.** (1993). Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. In: Ferry, J. G. (ed.) *Methanogenesis – ecology, physiology, biochemistry & genetics.* Chapman & Hall, New York pp. 209-252.
- Tietze M., Beuchle A., Lamla I., Orth N., Dehler M., Greiner G., Beifuss U.** (2003). Redox potentials of methanophenazine and CoB-S-S-CoM, factors involved in electron transport in Methanogenic archaea. *Chembiochem.* 4:333-335.
- Tsai Y. L., Olson B. H.** (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58:2292–2295.
- Twigg R. S.** (1945). Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature* 155:401-402.
- UNFPA** (2011). State of world population 2011. United Nations Fund for Population Activities, New York, USA. ISBN: 978-0-89714-990-7, URL: <http://foweb.unfpa.org/SWP2011/reports/EN-SWOP2011-FINAL.pdf>. Letzter Zugriff 17.05.2012.
- Veit K., Ehlers C., Schmitz R. A.** (2005). Effects of nitrogen and carbon sources on transcription of soluble methyltransferases in *Methanosarcina mazei* strain Gö1. *J Bacteriol.* 187:6147–6154.
- Visweswaran G. R. R., Dijkstra B. W., Kok J.** (2011). Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea - a comparative view. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92:921-928.
- Wang H., Vuorela M., Keränen A. L., Lehtinen T. M., Lensu A., Lehtomäki A., Rintala J.** (2010). Development of microbial populations in the anaerobic hydrolysis of grass silage for methane production. *FEMS Microbiol Ecol.* 72:496-506.
- Weiland P.** (2008). Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis. In: Gülzower Fachgespräche Band 27 - Messen, Steuern, Regeln bei der Biogas erzeugung. URL: [http://www.biogaspartner.de/fileadmin/biogas/Downloads/pdf\\_328-gf\\_band\\_27\\_biogaserzeugung\\_bf.pdf](http://www.biogaspartner.de/fileadmin/biogas/Downloads/pdf_328-gf_band_27_biogaserzeugung_bf.pdf). Letzter Zugriff 27.10.2012.
- Weiss A., Jérôme V., Freitag R., Mayer H. K.** (2008) Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:163-173.
- Weithäuser M., Scholwin F., Fischer E., Grope J., Weideler T., Gattermann H.** (2010). Gasaufbereitung und Verwertungsmöglichkeiten. In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR, ed.) *Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung.* 5. Auflage. Stadtdruckerei Weidner, Rostock pp. 117-143.
- Whitford M. F., Teather R. M., Forster R. J.** (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 2001;1:5.
- Wirth R., Kovács E., Maróti G., Bagi Z., Rákhely G., Kovács K. L.** (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels.* 5:41.
- Woese C. R., Fox G.E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5088-5090.



- Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:4576-4579.
- Wright A. D. G., Pimm C.** (2003). Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *J Microbiol Methods* 55:337– 349.
- Wu W., Jain M. K., Zeikus J. G.** (1996). Formation of fatty acid-degrading, anaerobic granules by defined species. *Appl Environ Microbiol*. 62:2037-2044.
- Yang Y., Tada C., Miah M. S., Tsukahara K., Yagishita T., Sawayama S.** (2004). Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 24:413-419.
- Yoshinaga M. Y., Wörmer L., Elvert M., Hinrichs K.-U.** (2012). Novel cardiolipins from uncultured methane-metabolizing archaea. *Archaea*. 2012: 832097. DOI: 10.1155/2012/832097
- Yu Y, Kim J, Hwang S.** (2006). Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnol Bioeng*. 93:424-433.
- Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S.** (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*. 89:670-679.
- Yu Z, García-González R, Schanbacher FL, Morrison M.** (2008). Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 74:889-893.
- Yu Z., Morrison M.** (2004). Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 70:4800-4806.
- Zeikus J. G., Wolfe R. S.** (1972). *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme Thermophile. *J Bacteriol*. 109:707–713.
- Zhang T., Fang H. H.** (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70:281-289.
- Zhou J., Bruns M. A., Tiedje J. M.** (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*. 62:316-322.
- Zhu C., Zhang J., Tang Y., Zhengkai X., Song R.** (2010). Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis. *Microbiol Res*.166:27-35.
- Zinder S. H.** (1990). Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *FEMS Microbiol Lett*. 75:125-137.



## Kapitel VIII - Anhang

### VIII.1 Nukleotidsequenzen des 23S rRNA-Gens methanogener Archaea

#### Isolat Mb1 (Extraktion aus Gesamtgenom-Sequenz, 2989 bp)

TGTTGGAAACCGCGGACTAAACAACCTCGGATCAAAAAGAACCTCGAAGCTCACATCCCAGTCCCATCAACAAGTCTTCTACT  
 CATATCCTAAAAGCTGTCTATTTTCGGGGGAAACCTCAGGCTTAGATGCTTTTCAGCCTTTATAATCTAGCGCGTAGCTGCCCG  
 GCAATGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAA  
 CAAAACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTTAAACCCAGTCAAGTTCCCTTTAATGGGCGAACAAC  
 CCCACCTTGGGTGATGCTGCACACCCAGGATGGAAAGAACCGACATCGAAGTAGCAAGCCGACGGTTCGATATGGGCTCTT  
 GCCTGCGACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTATCTCAGGCCCCCATCGACGAGGTACTCTGAGGTTCCGTTAGG  
 CCCGGCTTTCGCTCTGGATCCCATACTATGAAGAATCCAGTCAAGCCGGCTTTTGCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTC  
 CCACCTGAGCGGACCTTATCCGGCAGGCTTGATACCTTTCAAGCGGTGCCGCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTTCACC  
 CCACAAAAGTAGAGTTAGAAACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGCTTCA  
 AAACGCCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCCC  
 AATGGAAATCTCTGGCTTGTGCACCAAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATT  
 ATGCAGCCGCTTATCCGGCAAGGCTTACCTTACAGGCTTAAAGAGGTTATAGTTACCCCGCTTTACCGGCGCTTACC  
 AGGTTGAACCCCGGCTTACGTGCCGGCCTGGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGCTAGGAGCTATGT  
 TTTTATTAACAGTCCGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTCCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCAAAGTTACGGAGCC  
 ATTTTGGCGATTTCCCTAGTGTATTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCAGCTAGGGGACCAAGTGTCCGGATCTCGGTACGG  
 AATAACCAAGTCCAAATAGTTCCTTTTCAAGGGCTTCCATGGATCAGCAGCAACCATCCATACAGACGGCTAATCCAA  
 CCTACACCTGGTCTCGTATTACAGTCTTCCCAGGCTTAAACAATTAAGTGGACGACAATCCACACGGCCTAACACAAA  
 GCGTCAGAAACCAGACATAGCGTCCGCACGTATCTTGCATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTGCAATT  
 ACGATCGGCCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTTGCCAAGGATCCCTAGCCCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCAC  
 TTTACTTTGTGCTACTACTACCAGGATCCGCATCTCTGCAAGGTCCACTGGAACCTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGGA  
 CGCCTCCCTACAAAATCACACACAAAAGAATGTGTTTCAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAACCCGCTCATTTTCGGTGGCAT  
 TGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACCTTTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAATGAC  
 CCCCTTACACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCC  
 TCACCTCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATCCGAGGGATTTCCTCCCCTAAACACCCAATTAGTG  
 CTCTACTCGCCCAACCTCCAGTCAAGCTCAGCTTACCTTCGAGCTATTTCGAGAGGAACCCAGCTGTCACCGGCCTTGATTGGCCT  
 TTCACACTAGCCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACCTTCAGACCTCCATCACTCGTAAAAGCGACTTCATC  
 TTACCCTGGGCTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACACAAATGT  
 GCTGCGGAGCAGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCTTAGCCTGCCACAACAAAAAATCCCTGGCCCGTGTTC  
 AAGACGGATAAATAGTTCATAGTCCATCCTCATAACCCATGTTACCATAGTCTTTCAGAGGATCTTTCAGAGGATATCCATCCCA  
 AGCCATGCTAGGCTGTCACCATCTGGTTTCAGGTTCTTTTACCCCCCTGAAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCACGGTACTA  
 GTACGCTATCGGTCTTGAGACGATTTAGGATTGGAAGTCGATGCCTCCACATTCACGCCAATATCCAATGGACGCTACTC  
 AAGTCCCAATCAAGTCCACTCAGTATACATTTACGGGGCTATCACCTCTACGGCCAATGTACATTCAGTACAAGTTCAA  
 CTTAACCAAGCCGACCTACGATCAGGACATACACCATCTTACCCCTATTTCTAGAGGGAATTCAGTTCTGCTCTGC  
 CGTTTTGCTGACGTTACTAACGGCATCACCATTTGTTTTCTTCTCTGCTACTAAGATGTTTACGTTCCGGCAGGTTCCCG  
 CTCCACAAAGGGAGCATCCCCACAAGTGAGGATAGGATTCCCATAGGTAATCCCGGTTCAAAGGATGCATGCTCCTCG  
 CCCAGGCAATATCGCTGCTTGC CGGACCTCATCGGGCAGCTCAAGCCAAGCCATCCCCAGATGGTATAAAAGTAGCATTA

#### Isolat Mb1 (Herleitung der vorliegenden Arbeit, 2395 bp)

GCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACAAA  
 ACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGCTACGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCCA  
 CCTTGGGTGATGCTGCACACCCAGGATGGAAAGAACCGACATCGAAGTAGCAAGCCGACGGGTCGATATGGGCTCTTGCCT  
 GCGACACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTATCTCAGGCCCCCATCGACGAGGTACTCTGAGGTTCCGTTAGGCGC  
 GCTTTCGCTCTGGATCCCATACTATGAAGAATCCAGTCAAGCCGGCTTTTGCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCCAC  
 CTGAGCCGTAATTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGGTGCCGCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTCTCTCCAC  
 AAAAGTAGAGTTAGAAACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGCTTCAAAAC  
 GCCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATG  
 GAATCTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTTCATGC  
 AGCCCGTACTTATCCGGCAAGGCATTTCCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCGCTTACCAGGCTTACCAGGT  
 TGAACCCCGGCTTACGTGCCGGCCTGGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGCTAGGAGCTATGTTTTT  
 ATTAACAGTCCGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTCCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCCATT  
 TGCCGATTTCCCTTAGTGTATTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGCACCAAGTGTCCGGATCTCGGTACGGAA  
 AACAAGAATCCAAATCAGTTCCCTTTTCAAGGGCTTCCATGGATCAGCAGCAACCATCCATACAGACGGCTAATCAAGCCTA  
 CACCTGGTCTCGTATTACAGTCTTCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGCCTACCACAAAAGCGT  
 CAGAAACCAGACATAGCGTCCGCACGTATCTTGCATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTGCAATTACGA  
 TCGGCCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTTGCCAAGGATCCCTAGCCCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCACTTTA  
 CTTTGTCTACTACTACACAGGATCCGATCTCTGAAGGTCCACTGGAACCTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGGACGCC  
 TCCCTACAAAATCACACACAAAAGAATGTGTTTCAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAACCCGCTTAAACCCGCTTGGTGGCTTAC  
 CTCGATGGGTGATCTGTTACGAACCTTTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAATGACCCCT  
 TACACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCTCACT  
 CCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATCCGAGGGATTTCCTCCCCTAAACACCCAATTAGTGTCTCTA  
 CCTGCCACAAAGCTCAGTCAAGCTGACCTTCAGTCTATTTTCGAGGAAACCCAGCTGTCACCGGCTTGGTGGCTTTCAC  
 CACTAGCCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACCTTCAGACCTCCATCACTCGTAAAAGCGACTTCATCTTACC  
 CTGGGCTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACAAAATGTGCTGC  
 GAGCAGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCCTTAGCCTCGCCACAACAAAAAATCCCTGGCCCGTGTTCGAGCA  
 GGATAACATGACTTTAGTCCATACCTCCTCATACACACCATGTTACCATAGCTTCTTTCAGAGGATATCATTCTTCCAAGCCA

TGCTACGCTGTCCACCATCTGGTTTCAGTTCTTTTACCCCCCTGAAGGGTCTTTTCAGCTTTCCCTCACGGTACTAGTACGCTA  
TCGGTCTTGAGACGTATTTAGGATTGGAAGTCGATGCCTCCACATTCACGCCAATATCCAATGGAC

### Isolat Mb2 (2451 bp)

GCTGCCGGCATGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTC  
AGACAACAAAAAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCCTTTAATGGGCG  
AACAACCCACCCCTTGGGTGCTGTGTCACACCCAGGATGGAAAGAACCAGCATCGAAGTAGCAAGCCGACGGGTGATATGG  
GCTCTTGCCTGCGACCACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTATCTCAGGCCCCATCGACGAGGTACTCTGAGGTTTCG  
TTAGCCATGGAAATTCCTGGCTTGTGCACCAGAATGACAGTTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCGTGGTATAC  
CTGTCCACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCCATCTACCGGT  
GTCCTCCACAAAAGTAGAGTTAGAAACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGTCCACTAGACCTGGCGACCTAG  
TTCAAAAACGCCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGC  
TTCCAAATGGAATTCCTGGCTTGTGCACCAGAATGACAGTTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCGTGGTATAC  
CATTCATGCAGGCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCCGCGTTTACCGGCGCT  
CACCAGTTGAACCCCGCTTACGTGCCGGCAGTGGGAGGTGTCGCCCCAGTACACACCCTTTCGGGCTTGTAGGAGCT  
ATGTTTTTATTAACAGTCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGTCTCACAAGCTGGCAGTCTTATCCCAAAGTTACGG  
AGCCATTTTGGCGAATTCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACCCAGTGTCCGATCTCGG  
ACGGAATAACAAGAATCCAAATCCAGTTCCCTTTTCAAGGGTCCATGGATCAGCACGAACATCCATACAGACGGTCAAT  
CAAGCCTACACCTGGTCTCGCTATTACAGCTCTCCCAAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGCCTACCA  
CAAAGCGTCAGAAACCAGACATAGCGTCGCCACGTATCTTGCATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTCG  
AATTACGATCGGCCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGCGGTAAGATTTC  
TCACCTTACTTTGCTACTACTACCAGGATCCGATTCCTGCAAGGTCCACTGGAACTTACACCCAGCTTCCACCCACACA  
GGACGCCTCCCTACAAAATCACACACACAAGAATGTGTTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAACCCGTCCTTTCGGTGC  
CATTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCACCTTCCCATGTCTGGGGCAATG  
ACCCCTTACACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGC  
CTCACTCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAG  
TGCTCTACCTCGCCACCAACCTCCAGTCAGGCTGACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACCAGCTGTCACCGGCCTTGATTGGC  
CTTTCACCACTAGCCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGACGACAACAACCTTTCAGACCTCCATCACTCGTAAAAGCGACTTCA  
TCTTACCCTGGGCTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACACAAAT  
GTGCTGCGAGCTGGTTGGTTTCCCTACGACTACGAACTAACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCT  
TCAAGACGGATAAATGACTTTAGTCCATACCTCTCATAACACCATGTTACCATAGCTTCTTTCAGAGGATATCATTCCTTC  
CAAGCCATGCTAGCTGTACCATCTGGTTTCAGTTCTTTTACCCCCCTGAAGGGTCTTTTCAGCTTTCCCTCACGGTACTA  
GTACGCTATCGGTCTTGAGACGTATTTAGGATTGGAAGTCGATGCCTCCACATTCACGCCAATATCCAATGGACGCTACTC  
AAGTACCAATCAAGATCCACTCAGTATACATTTACGGA

### Isolat Mb3 (2432 bp)

GCTGCCGGCATGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTC  
AGACAACAAAAAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCCTTTAATGGGCG  
AACAACCCACCCCTTGGGTGCTGTGTCACACCCAGGATGGAAAGAACCAGCATCGAAGTAGCAAGCCGACGGGTGATATGG  
GCTCTTGCCTGCGACCACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTATCTCAGGCCCCATCGACGAGGTACTCTGAGGTTTCG  
TTAGCCATGGAAATTCCTGGCTTGTGCACCAGAATGACAGTTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCGTGGTATAC  
CTGTCCACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCCATCTACCGGT  
GTCCTCCACAAAAGTAGAGTTAGAAACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGTCCACTAGACCTGGCGACCTAG  
TTCAAAAACGCCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGC  
TTCCAAATGGAATTCCTGGCTTGTGCACCAGAATGACAGTTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCGTGGTATAC  
CATTCATGCAGGCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCCGCGTTTACCGGCGCT  
TCACCAGTTGAACCCCGCTTACGTGCCGGCAGTGGGAGGTGTCGCCCCAGTACACACCCTTTCGGGCTTGTAGGAGCT  
ATGTTTTTATTAACAGTCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGTCTCACAAGCTGGCAGTCTTATCCCAAAGTTACGGA  
GCCATTTTGGCGAATTCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACCCAGTGTCCGATCTCGGTA  
CGGAATAACAAGAATCCAAATCCAGTTCCCTTTTCAAGGGTCCATGGATCAGCACGAACCATCCATACAGACGGCTAATTC  
AAGCCTACACCTGGTCTCGCTATTACAGCTCTCCCAAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGCCTACCAC  
AAAGCGTCAGAAACCAGACATAGCGTCGCCACGTATCTTGCATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTCGA  
ATTACGATCGGCCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTACGAACTTCCAAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGGCGTAAAGATTCT  
CACTTTACTTTGCTGCTACTACTACCAGGATCCGATTCCTGCAAGGTCCACTGGAACTTACACCCAGCTTCCACCCACAG  
GACGCCTCCCTACAAAATCACACACACAAGAATGTGTTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAACCCGTCCTATTTTCGGTGCC  
ATTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCACCTTCCCATGTCTGGGGCAATG  
ACCCCTTACACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGC  
CTCACTCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAG  
TGCTCTACCTCGCCACCAACCTCCAGTCAGGCTGACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACCAGCTGTCACCGGCCTTGATTGGC  
CTTTCACCACTAGCCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGACGACAACAACCTTTCAGACCTCCATCACTCGTAAAAGCGACTTCA  
TCTTACCCTGGGCTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACACAAAT  
GTGCTGCGAGCTGGTTGGTTTCCCTACGACTACGAACTAACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCTTACCT  
TCAAGACGGATAAATGACTTTAGTCCATACCTCTCATAACACCATGTTACCATAGCTTCTTTCAGAGGATATCATTCCTTC  
CAAGCCATGCTAGGCTGTACCATCTGGTTTCAGTTCTTTTACCCCCCTGAAGGGTCTTTTCAGCTTTCCCTCACGGTACTA  
GTACGCTATCGGTCTTGAGACGTATTTAGGATTGGAAGTCGATGCCTCCACATTCACGCCAATATCCAATGGACGCTACTC  
AAGTACCAATCAAGATCCACTCAGTATACATTTACGGA

Isolat Mb4 (2444 bp)

CGCAATGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACA  
 ACAAACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTCAGCAGCGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACA  
 CCCACCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGAGGGTCGATATGGGCTCT  
 TGCCTGCGACCCAGCTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCATCTCAGGCCCCATCGACGAGGTACTCGGATTCGGT  
 GCCCGCTTTCCGCTCTGGATCCCATACTATGAAGAATCCAGTCAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGT  
 CCCACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTC  
 TCCACAAAAGTAGAGTTAGAAAACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGCTTC  
 AAAACGCCTCCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTC  
 CAATGGAATTCTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATT  
 CATGACGGCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTGCTACCTTAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGGCGCTTAC  
 CAGGTTGAACCCCGGCTTACGTGCCGGCACTGGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATG  
 TTTTATTAACAACAGCTGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTCCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGC  
 CATTTTGGCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACACAGTGTGGATCTCGGTACG  
 GAATAACAGAATCCAAATCCAGTTCCTTTTCAAGGGCTCCATGGATCAGCAGCAACCATCCATACAGACGGCTAATTCAA  
 GCCTACACCTGGTCTCGTATTACAGCTCTCCCAGGTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGGCTACCACAA  
 AGCCTAGAAAACACAGACTAGCGTCGCCACGTATCTGCATGTACAGGAATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTCGCTTAC  
 TACGATCGGCCCTTAGGATCGACTAACCCCTGGGTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCA  
 CTTACTTTGCTGCTACTACTACCAGGATCCGCATTCTGCAAGTCCACTGGAACTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGG  
 ACGCTCCCTACAAAATCACACACAAAAGAATGTGTTTAAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAACCCGCTCCATTTTCGGTGCCA  
 TTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACCTTTAAAGGTGGTGTCTTAAGCCACCTTCCCATCTGTGGGCAATGAC  
 CCCCTTACTACTAATTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCGCGCCCTC  
 TACTCCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCCTAAACACCCAATTAGTG  
 CTCTACCTCGCCACCAACCTCCAGTACGGTGCACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACCAGCTGTCACCGGCTTGATTGGCT  
 TTCACCTAGCCCAAAGTATAGGGGAGTGTTCGACGACAACAACCTTACAGCTCCATCACTGTAAGGCGACTTTCATC  
 TTACCTGGGCTAGCTGACGACCGCTTCGGGTTTTAAGTGTGACTGTGACTGTGACTGTGACTGTGACTGTGACTGTGACTGTG  
 GCTGCGAGCAGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCCTTAGCCTGCCACAACAAAAAATCCCTGGCCCGTGTTC  
 AAGACGGATAACATGACTTTAGTCCATACCTCCTCATACACCATGTTACCATAGCTTCTTTCAGAGGATATCATTCTTCCA  
 AGCCATGTAGGCTGTACCATCTGGTTTTCAGTTTTCACCCCTGAAGGGTCTTTTCAGCTTTCCCTCACGGTACTAGT  
 ACGTATCGGTTGAGACGTATTTAGGATTGGAAGTCGATGCCTCCACATTCACGCCCAATATCCAATGGACGCTACTCAA  
 GTACCAATCAAGATCCACTCAGTATACATTTAT

Isolat Mb5 (2353 bp)

CTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACAAAAC  
 AATTCCTAGATAGCAACCAACCTGTCTCAGCAGCGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACACCCCAAC  
 CTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGAGGGTCGATATGGGCTTTCGCTT  
 GACCACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCATCTCAGGCCCCATCGACGAGGTACTCTGAGGTTTCGTTAGGCCCGGC  
 TTTCCGCTCTGGATCCCATACTATGAAGAATCCAGTCAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCCACCT  
 GAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTCCTCCACAA  
 AAGTAGATTAGAACAACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGCTCCACTAGACTGGCGCTAGCTTCTCAAACGC  
 TCCCACCTACAGTACATCCATGCCAAGCCCCAACGACAGTAAAGCTCAGGAGTAAAGCTCAGCGGCTTCCGCTTCCAAATGGA  
 ATTCTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTATGCAG  
 GCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTGCTACCTTAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCGCTTACCAGGTTG  
 AACCCCGGCTTACGTGCCGGCACTGGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTTAT  
 TAAACAGTCCGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGTCTGCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCAATTTG  
 CCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACACAGTGTGGATCTCGGTACGGAATAA  
 CAAGAATCCAAATCCAGTTCCTTTTCAAGGGCTCCATGGATCAGCAGCAACCATCCATACAGACGGCTAATTCAGGCTACA  
 CCTGGTTCTCGTATTACAGCTCTCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGGCTACCACAAAAGCGTCA  
 GAAACAGACATCCAGTCCAGCTATCTGTCATGTACAGGAATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTCGATACGATC  
 GGCCTTAGGATCGACTAACCCCTGGGTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCACTTTACT  
 TTGCTGCTACTACTACCAGGATCCGCATTCTGCAAGTCCACTGGAACTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGGACGCCTC  
 CCTACAAAATCACACACAAAAGAATGTGTTTAAAGGTGGTGTCTTAAGCCAGTTCGTAAGCCGGCTTAAACCCGCTCCATTTTCGGTGGCAATGACCT  
 CGATGGTGTACTGTTACGAACTTTAAAGGGTGGTGTCTTAAGCCACCTTCCATTGTCTGGGGCAATGACCCCTTA  
 CACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCCCTCACTCC  
 AACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCCTAAACACCCAATTAGTGTCTACC  
 TCGCCACCAACCTCCAGTACGGTGCACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACCAGCTGTCACCGGCTTGATTGGCCCTTACCA  
 TAGCCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGACGACAACAACCTTACAGCTCCATCACTGTAAGGCGACTTCACTTACCTTACCT  
 GGGCTAGATCGGCCCGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCTCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACAAAATGTGCTGCGA  
 GCAGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCCTTAGCCTGCCACAACAAAAAATCCCTGGCCCGTGTTCAGACGG  
 ATAACATGACTTTAGTCCATACCTCCTCATACACCATGTTACCATAGCTTCTTTCAGAGGATATCATTCTTCCAAGCCATG  
 CTAGCTGTACCATCTGGTTTCACTGTTTTCACCCCTGAAGGGTCTTTTCAGCTTTCCCTCACGGTACTAGTACGCTATC  
 GGTCTTGAGACGTATTAGGATTGGG

Isolat Mb6 (2406 bp)

GGCAATGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACA  
 ACAAACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTCAGCAGCGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACA  
 CCCACCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGAGGGTCGATATGGGCTCT  
 TGCCTGCGACCCAGCTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCATCTCAGGCCCCATCGACGAGGTACTCGGATTCGGT  
 GCCCGCTTTCCGCTCTGGATCCCATACTATGAAGAATCCAGTCAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGT  
 CCCACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTC  
 TCCACAAAAGTAGAGTTAGAAAACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACAGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGCTTC  
 AAAACGCCTCCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCC

CAATGGAATTCTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTCTACCATT  
 CATGCAGGCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGGCGCTTAC  
 CAGGTTGAACCCCGGCTTCCAGCTGCGGCACTGGCAGGTGTGCGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATG  
 TTTTTATTAACAGTGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTCCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGGAGC  
 CATTTTGGCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGACACAGTGTGGATCTCGGTACG  
 GAATAACAAGAATCCAAATCCAGTTCCCTTTTCAAGGGCTCCATGGATCAGCACGAACCATCCATACAGACGGCTAATTCAA  
 GCCTACACCTGGTTCGCTATTACAGTCTCCCAAGCTTAAACAATTAATGAGGACGACAATCCACACAGGCTACCACAA  
 AGCGTCAGAAAACAGACATAGCGTGCACGATCTTGTGATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTTCGACCAATTGCAAT  
 TACGATCGGCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCTAGCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCA  
 CTTTACTTTGCTGCTACTACTACCAGGATCCGCATTCTGCAAGGTCCACTGGAACCTTACACCCACAGCTTCCACCCACACAGG  
 ACGCTCCCTACAAAACACACACAAAAGAATGTGTTTAAAGGTAAAGTACCGTACCGGCTTAAACCCGCTTACCTTTTCGGTGC  
 TTGACCTGATGGGTGATCTGTTACGAACTTTTAAAGGGTGTGCTTCTAAGGCCACCTTCCCATTTGCTGGGGCAATGAC  
 CCCCTTACACTAATCCGGCATTTTCGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCC  
 TCACTCCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAGTG  
 CTCTACCTCGCCACCAACCTCCAGTACAGGCTCGAGTCACTTTCGAGAGGAACAGCTGTACCCGGCTTATTGGCTT  
 TTACCACTAGCCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGACGACACAACCCCTCAGACCTCATCCTGTAAAAGCGACTTCATC  
 TTACCCTGGGCTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACACAAATGT  
 GCTGCGAGCAGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCCTTAGCTCGCCACAACAAAAACTCCCTGGCCCGTGTTC  
 AAGACGGATAACATGACTTTAGTCCATACCTCATAACACCAATGTTACCATAGCTTCTTTTCAGAGGATATCATTCCCTTCCA  
 AGCCATGCTAGGGTGTGATCTGTTTACGTTTCTTTTACCCTTAAAGGGTCTTTTTCAGCTTTCCCTCAGGTAAGT  
 ACGCTATCGGCTTGTAGACGATTTAGGATTGGAAGTCGATGCTCCACATTCACGCCCAATATCCAATGGACGCTAC

Isolat Mb7 (2749 bp)

TGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCTCTGTAAGGACACCTTCCCTCAGACAACAAA  
 ACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGTCACTGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCCA  
 CCCTTGGGTGCTGTCACACCCAGGATGGAAGAACCAGCTAAGTACGAAAGCCGAGGTCGATATGGGCTCTTGCCT  
 GCGACCACCCAGTTATCCCGGAGGTAGCTTTTCTGTCTCTCAGGCCCATCGACGAGGTAAGTCTGAGGTTGCTTAGGCCCCG  
 GCTTTCGCTTGGATCCCATATGAAGAATCCAGTACAGGCGGGCTTTTGCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCAC  
 CTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGGCCGCCAGCCAACTGCCCATCTACCGGTGTCTCCAC  
 AAAAGTAGATTAGAAAACACAGTCAATGAGAAGGTGTTGCTCAAGAACAGCTCCACTAGACTGACCTTCCAAAC  
 GCCTCCCACTACTGCATACCCATGACCAAGCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATG  
 GAATTCTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTCTACCATTATGC  
 AGGCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTGCTACCTTAAAGAGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCGCTTACCAGGT  
 TGAACCCCGGCTTACGTCGGCAGTGGGCAAGGTCGCTCCCAAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTT  
 ATTAACACTGCGGCCCCCTAGTCACTAGGACCTCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCCATTT  
 TGCCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACACAGTGTGGATCTCGGTACGGAAT  
 AACAAGAATCCAAATCCAGTTCCCTTTTCAAGGGCTCCATGGATCAGCACGAACCATCCATACAGACGGCTAATTCAAGCCTA  
 CACCTGGTTCTCGTATTACAGCTCTCCCCAGGCTTAAACAATTAATGAGGACGACAATCCACACGGCCCTACCACAAAGCGT  
 CAGAAAACAGACATAGCTGCGCACGATCTTGCATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTGGAATTACGA  
 TCGGCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCACTTTA  
 CTTTGTGCTACTACTACCAGGATCCGCATTCCTGCAAGGTCCACTGGAACCTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGGACGCG  
 TCCCTACAAAATCACACACAAAAGAATGTGTTTAAAGGTACCGTACCGGCTTAAACCCGCTTATTTTCGGTGCCATTGAC  
 CTCGATGGGTGATGTTTACGAACTTTTAAAGGGTGTGCTTCTTAAAGCCACTTCCATTCCATTCCAGCCCTTCCCTT  
 TACACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCTCACT  
 CCAACCTTCTACAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAGTGTCTA  
 CCTCGCCACCAACCTCCAGTACGGTACCTTCGAGTCACTTTCGAGAGGAACAGCTGTACCCGCTTATTGGCCCTTTCAC  
 CACTAGCCCAAAGGATGTTTTCGACGACAAACCTTCAAGCTCCATCCTGTAAGGCTTCCATCTGTAAGGCTTCACTTACC  
 CTGGGCTAGACTCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACACAAATGTGCTGC  
 GAGCAGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCCTTAGCCTCGCCACAACAAAAAACTCCCTGGCCCGTGTTCAGAC  
 GGATAACATGACTTTAGTCCATACCTCCTCATAACACCATGTTAAGCATAGCTTCTTTCAGAGGATATCATTCTTCCAAGCCA  
 TGCTAGGCTGTCCACTTGGTTTTCAGGTTTTCACCCCTTGAAGGGGTTCTTTTCAGCTTTCCCTCAGGCTACTAGTACG  
 CTATTCCGTTTGGAGCTATTTAGGATTGGAAGTGCATGCTCCCAAGCTTCCATCAGCCCAATATCCAATGGACGCTACTCAAGT  
 ACCCAATCAAGATCCACTCAGTATACATTTACGGGGCTATACCCCTTACGGCCAATGTACATTCCAGTACAAGTTCAACTT  
 AACCAAGCCGGACCTACGATCAGGACATACACCACATCTTACCCCTATTTCTAGAGGGAATTCAGTTTGTCTCTGCCGT  
 TTTTCGCTCGACGTTACTAACGGCATCACCATTTGTTTCTTCTCTGCTACTAAGATGTTTTCAGTTTCGGCAGGTTCCCGCTC  
 CCACAAAGGAGCATCCCCACAAGTGAAGATAGGATTCCCATTAGGTAATCCCGGGTTCAAAGGATGCATGCTCCTCGCC  
 AGGCAA

Isolat Mb8 (2368 bp)

CCGGCACTGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCTCTGTAAGGACACCTTCCCTCAGACA  
 CAACAAAACAATTCCTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGTCACTGTTCCCTTTAATGGGCGAAC  
 AACCCACCTTGGGTGCTGTCACACCCAGGATGGAAGAACCAGCTAAGTACGAAAGCCGAGGTCGATATGGGCTCTTGCCT  
 CTGCGCTGCGACACCCAGTTATCCCGGAGGTAGCTTTTCTGTCTCTCATGCCCCATCGACGAGGACTATGAGGTTGCTTAG  
 GCCGGCTTTCGCTTGTGATTTCTGACTATGGGAAATCCAGTACAGGCGGCTTTTGCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGT  
 CCCACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCTGCGCCGCCAGCCAAACTGCCCATCTACCGGTGTTT  
 TCCATAAAAATGGATTAGACACAGTCAATGAGAAGGTGTTGCTCAAGAACGGCTCCACTAGACTGACCTGACTAGTTTTC  
 AAAACGCCTCCACCTACACTGCATACCCATGACAAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGCTTACGGGGTCTTCGCTTCC  
 CAATGGAATTCTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTCTACCATT  
 CATGCAGGCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGGCGCTTAC  
 CAGGTTGAACCCCGGCTTACGTCGGCAGTGGGCAAGGTCGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATG  
 TTTTTATTAACAGTGGGCCCCCTAGTCACTAGGACAGCTTCTCACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGC  
 TATTTTGGCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACACAGTGTGGATCTCGGTACG  
 GAAAAACAAGAATTCAAATCTAACTCCCTTTTTCATGGACTCCATGGATCAGCACGAACCATCCATAAGGACGGCTAATTCAA

GCCTACACCTGGTTCTCGCTATTACAGCTCTTCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCCACACGGCCTACCTCAA  
 AGCGTCAGAAATTAGACATAGCGTCGCCACGTATCTTGATTGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCCAAATTCGAAT  
 TACGATTGGTCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCA  
 CTTTACTTTTGTCTACTACTACCAGGATCCGCATTCCTGCAAGGTCCACTGGAACTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGG  
 ACGCTCCCTACAAAATCACACTACAAATGTGTTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCATTGA  
 CCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCTTAAAGGGTGGCTGTTCTAAGCCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAATGACCCCC  
 TTATACTAATCCGGCATTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTCTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGGCCCTCAC  
 TCCAACTTCTACAGCGGTGACGAGTTCGGAGTTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAGTGCTCT  
 ACCTGCCACCAACCTCCAGTCAGGCTGACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACAGCTGTCACCGGCTTGATTGGCCTTCA  
 CCACTAGCCAAAGGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACCTTCAGACCTCCATCACTCGTAAAGGCGACTTCATGTAC  
 CCTGGGTTAGATCGACCGGCTTCCGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCTTAAAGACCTATTAAGACCTACACATAAAGATG  
 TGTCGGGGCATGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGATGATCTTCTTAGTCTCGCCACAACAGAAAACCTTGGCCGTTT  
 CAAGACGGATAACATGACTTATGTCATACCTCCTCATAACAGCCATGTTACCATGGTTTCTTTCAGAGGATATCATTCTTCC  
 AAGCCATGCTAGGCTGTCACCATCTGGTTTACGTTCTTTTACCCCCCTGAAAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCACGGTACT  
 AGTACGCTATCGGTCTTGAGACGTATTTAGGATTAGGAG

### Isolat Mb9 (2405 bp)

GCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACAAA  
 ACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCCA  
 CCCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGACAGGTCGATATGGGCTTGGCT  
 GCGACCCAGGTTATCCCGAGGTTAGCTTTTCTGTCATCTACGCCCCATCGACGAGGACTATGAGGTTCTGTTAGGCGCG  
 CTTTCGCCTGCTGATTGCTACTATGGGAAATCCAGTACGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTACTAGGTTGATCTGTCCACC  
 TGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCGTGGCCGCCAGCCAAACTGCCATCTACCGGTGTTTCCATA  
 AAAATGGAGTTAGAGACACAGTATGAGAAGGTGGTGTCTAAGAACGGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGTTTCAAAAACG  
 CCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGCTTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATGG  
 AATTCTCTGGTGTGACACCAGAAATAGCAGGTTTACAGTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTCGCA  
 GGCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCGGTTTACCGGCGCTTACCAGGTT  
 GAACCCCGGCTTACGTGCCGGCAGTGGGCAAGTGTGCGCCCAAGTACACACCCCTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTA  
 TTAACACAGTCCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTTCTCAAAAGCTGGCCTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCTATTTT  
 GCGGATTTCCCTTAGTATGTTTACCCTAAAACGCCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGACACAGTGTCCGATCTCGGTACGGAAA  
 ACAAGAATTCAAATCTAACTCCCTTTTCACTGGACTCCATGGATCAGCAGCAACCATCCATAAAGGACCGGCTAATCAAGCCTAC  
 ACCTGGTTCTCGCTATTACAGCTTTCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCCACACGGCCTACCTCAAAGCGTC  
 AGAAATTAGACATAGCGTCCGACGATCTTGATTGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCCAATTTCGAATTACGATT  
 GGTCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGCGGTAAGATTCTACTTTACT  
 TTGCTGTACTACTACAGGATCCGCTTCTGCAAGGTCCACTGGAACCTTACACCCAGCTTCCACCCACACAGGACGCCCTC  
 CCTACAAAATCACACTACAAATGTGTTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCATTGACCTCGAT  
 GGGTGTCTGTTACGAACTCTTAAAGGGTGGCTGTTCTAAGCCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAATGACCCCTTATACT  
 AATCCGGCATTTCCGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCTACTCCAACC  
 TTCTACAGCGGTGACGATGTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAGCTACCGGAA  
 CACCAACCTCCAGTCAGGCTGACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACAGCTGTCACCGGCTTGATTGGCCTTTCACCACTAG  
 CCCAAGGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACACCCCTCAGACCTCCATCACTCGTAAAAGCGACTTCATCTTACCCTGGGT  
 TAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCATTAAGACCTCGCCCTCACACATAAAGATGTGTGGC  
 GGCATGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGATGATCTTCTAGTCTGACGACAACAGAAAACCTCCATGCCCCGTTTCAAGAC  
 GGATAACATGACTTTAGTCCATACCTCCTCATAACAGCCATGTTACCATGGTTTCTTTCAGAGGATATCATTCTTCCAAGCCA  
 TGCTAGGCTGTCACCATCTGGTTTACGTTCTTTTACCCCTGAAAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCACGGTACTAGTACG  
 CTATCGGTCTTGAGACGTATTTAGGATTAGGAGTGCATGCCTCCACATTCACGCCCAATATCCAATGGACGCTACTC

### Isolat Mb10 (2151 bp)

CGAGGCATGCCATTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGA  
 CAACAAAACAATTCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAAC  
 AACCCACCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGACAGGTCGATATGGGCT  
 CTTGCCTGCGACACCCAGTATCCCGAGGTTAGCTTTTCTGTCATCTCAGGCCCCATCGACGAGGTAAGTTGAGGTTGCTTA  
 GGCCCGGCTTTCGCTTGGATCCATACTATGAAGATCCAGTACGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTTACGGTGATCTCTG  
 TCCCACGTAGCCGACTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGGTGCGGCCCAAGCCAAACTGCCCCATCTACCGGTGTC  
 CTCACAAAAGTAGAGTTAGAAAACACAGTCAATGAGAAGGTGGTGTCTAAGAACAGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGCTT  
 CAAAACGCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTTACGGGGTCTTCGCTTC  
 CCAATGGAATTTCTGGCTTGTGACACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTTCTAGTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCAT  
 TCATGACGGCCGTAATATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCGTTCA  
 CCAGGTTGAACCCCGGCTTACGTGCCGGCAGTGGGCAAGTGTGCGCCCAAGTACACACCCCTTTCGGGCTTGTAGGAGCTAT  
 GTTTTTATTAACAGTCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTCCTCAAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAG  
 CCATTTTGGCGATTTCCCTTAGTATGTTTACCCTAAAACGCCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGACACAGTGTCCGATCTCGGTAC  
 GGAATAACAAGAATCAAATCCAGTTCCTTTTCAAGGGCTCCATGGATCAGCAGCAACAGAAAACCTCCATGCCCCGTTTCAAGAC  
 AGCCTACACCTGGTTCTCGCTATTACAGTCTCCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCCACACGGCCTACCACA  
 AAGCGTCAGAAACCAGACATAGCTGCGCCACGATCTTGATGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAATTCGAA  
 TTACGATCGCCCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGCGGTAAGATTCTC  
 ACTTACTTTGCTACTACTACACAGGATCCGATTTCTCAAGTCCACTGGAACCTTACACCCAGCTTACACCCAGCTTACACAG  
 GACGCTCCCTACAAAATCACACACAAAAGAATGTGTTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAACCCGTTCAATTTTCGGTGCC  
 ATTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCTTAAAGGGTGGCTGTTCTAAGCCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAATG  
 ACCCCCTTACACTAATCCGGCATTTTCGGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCC  
 CCTACTCCAACCTTCAAGCGGTAACGAGTTCGGAGTTTGTACAGGATCCGAGGATTTCTCCACCTTAAACACCAATTAG  
 TGCTACTCCGCCACAACCTCCAGTACGGTACCTTTCAGTCAATTTTCGAGAGGAACCCAGCTGTCACCGGCTTGGATTGGC  
 CTTTACCCTAGCCAAAGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACCCCTCAGACCTCCATCACTCGTAAAAGCGACTTCA

TCTTACCCTGGGCTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCCCGCCCTCACACAAAT  
GTGCTGCGAGCAGTTGGTTTTCCCTACGACTACGAAGCTAACCTCCTTAGCCTCGCCACAACAAAAAATTCCTGG

*Mb. formicicum* MF<sup>T</sup> (2767 bp)

TGCGGGCACTGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCA  
GACAACAAAACAATTCCACTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGA  
ACAACCCACCCCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAAGAACCGACATCGAAGTAGCAAGCCGACAGGGTCTGATATGGG  
CTCTTGCCTGCGACCCAGTTATCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCATCTCATGCCCCATCGACGAGGACTATGAGGTTCTGTT  
AGGCCCGCTTTCGCTCTGGATTTCGTAATGCGAAATCCAGTCAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCT  
GTCCACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATACCTTTTCAAGCGCTGCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGT  
TCTCCATAAAAAATGGAGTTAGAGACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGAACGGCTCCACTAGACCTGGCGACCTAGTT  
TCAAAACGCCTCCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTT  
CCCAATGGAATTCTGGCTTGTGACACCAAGAATAGCAGGTTACAGCTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCA  
TTCATGCAGGCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACGGCGCTT  
ACCAGTTGAACCCCGGCTTACGTCGCCGCACTGGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTCGGGCTTGTAGGAGCTA  
TGTTTTTATTAACAGTCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTTCTACAAAGCTGGCACTCCTTATCCCAAAGTTACGGA  
GCTATTTGCGGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGCACCAGTGTGCGGATCTCGGTA  
CGGAAAAACAAGAATCAAATCTAACTCCCTTTTTCATGGACTCCATGGATCAGCACGAACCATCCCAATGAGCTTAATTC  
AAGCCTACACCTGGTTCTCGCTATTACAGCTCTTCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGCTACCTC  
AAAGCGTCAGAAATTAGACATAGCGTCGCCACGTATCTTGATTGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCCAATTGCA  
ATTACGATTTGGTCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGCGTAAAGATTCT  
CACTTACTTCTACAGCTACTACCAGGATCCGACTTCCAGGCTTTCACAGGATCCGAACTTACACCCAGCCCAATGAGCTACAG  
GACGCCTCCCTACAAAATCACACTACAAATGTGTTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCATTG  
ACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACCTTTAAAGGGTGGCTGCTTCAAGCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAATGACCC  
CCTTATACTAATCCGGCATTTCGGGACCTTAACTTAGTGTAGTTGTTTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCTC  
ACTCAACTCAGATTTCCTAGCTTACGAGTTCGGGATCCAGTTCAGGATCTTACAGGATCCGAGGATTTCTCCCTAAACACCCAATGAGTCT  
CTACCTCGCCACCAACCTCCAGTCAGGCTGACCTTCGAGTCAATTCGAGAGGAACCAGCTGTCACCGGCTTGTATTGGCCTTT  
CACCCTAGCCCAAGGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACCTTCAGACCTCCATCCTGTAAGAGCGACTTCACTT  
ACCTGGGTTAGATCGACCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCTCGCCCTCACACATAACA  
TGTGCTGCGGGATGTTGGTTTCCCTACGACTACGAAGTATGATCTTCTAGTCTCGCCACAACAGAAAACCTCCGTCGGG  
TTCAAGACGGATAACATGACTTTAGTCCATACTCCCTACACGCACTGTTACCATGTTTCTTCAGAGGATATCATTCT  
TCCAAGCATGCTAGGCTGTCACCATCTGGTTTCAGGTTCTTTTACCCCTGAAGGGGTTCTTTTCAGCTTTCCTCACGGT  
ACTAGTACGCTATCGTCTTGGAGCTATTTAGGATTAGGAGTCGATGCTCCACATTCACGCCAATATCCAATGGACGCT  
ACTACTAAGACTCTGATCAAATCCTTATCAATTTACGTTTACGGGCTATACCCTTACGGCCATGTACATTCAGTACAA  
TTCAACTTCCCAAGACCCCTTAAATCAAGAATTTACAGGCTTTCACCCCTATTACTAGGGGGAATTCAGTTTGT  
CTCTGCGTTTTTCGCTCGACGTTACTAACGGCATACAATTTGTTTTCTTCTCTGCTACTAAGATGTTTCAGTTCGGCAGG  
TCCCCGCTCCACATAAGGGAGCATCAAAAAAGGATGGGAAGTCCCATTAGGTAATCCTGGGTTCAAAAGATGCATGCTCCT  
CGCCAGGCAATATCGCGCTA

*Mb. aarhusense* H2-LR<sup>T</sup> (2661 bp)

TGCCTTGTACAGACAACCGATCGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACTACTAA  
CAATTCCATTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCAC  
CCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAAGAACCGACATCGAAGTAGCAAGCCGACAGGGTCTGATATGGGCTTTCGCTG  
CGACCACCCAGTTATCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCATCTCAGGCCCCATCGAGGGGGACGCTGAGGTTCTGTTAGGCCCTGGC  
TTTCGCTCTAGATTCTGCTTGTGCGAAATCCAGTTCAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGTTGATTCCTCCACT  
GAGCCGACCTTAGGGCGCGCTTGATATCTTTTCAAGCGCTGCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTCCTTTTTCA  
AGTTAGAGACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCATTGTTGGTCCACTAAGCCTGGCGACTTAGTTTCAAGCCTCCACCT  
ACGCTGCATACCCATGACCAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGCTTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATGGAATTTCTG  
CTTGTGACACCAGCAGGTTACTAGTTTCTAGTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTATGACAGGCGGCTACT  
TATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCGCTTACTGGGTTGAACCCAGC  
TTCAGTGGCCGACTGGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTTATTAACAGTC  
GGGCCCCCTGGTCACTGCGACAGCTGCTTGCACAGTGGCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCCATTTTGGCGATTTC  
CTTAGTATGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTACCTAGGGCCTTGTGTCGGATCTCGGTACGGAACAAGGATTCA  
TTCATAATCCCTTTTCAAGGATCCAGGATGGATCAGATTGAACCAACACCAATAGTGTCTTACCTCGTACTACCTTCTCGCTA  
TTACAGCTCTCCTCAGGCTTCAACAATTAATGGGACGACAATCCACTCAACCTACCTCGAAAAGTTAGAAATTAGACTTAG  
CGTTGCCGATGTACCTAAGTTGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGACCAGTTTCGAGTTACGACTGGCCTTAGGACCG  
ACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGCGGTTAAAGATTCTACTTTACTTTGCTGCTACTACT  
ACCAGGATCCTCATTCTGAAAGGTCCTGGAAGTACGTCACGTCACGTTTTCGCCCTAACAGGACGCCACTTACAAAATCAC  
TTTCGGTGTCTACGGTACGGTAGCCGGCTTAAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCTTTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAAC  
TCGTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCACCTTCCCATTTGCTGGGGCCAAAGACCCCTTATACTTATCCGGCATTTCGGGAC  
CTTAAACATAGTCTGAGTTGTTCTCTCGGGACACAGGCTTACCCCGCCCTGACTCCGACCTTCTACGATGGTAAACGA  
GTTCCGAGCTTTTACAGGATGCCGAGGAATTTCTCCCTTAAACACCAATTAAGTGTCTTACCTCGTACTACCTCAGGACG  
CTGGCCTTCGAGCCATTTTCGAGTGGAAACCAGCTGTCACCGGCTTGTATTGGCTTTTACCCTAGCCCAAGGTTAGAGGAGTG  
TTTTGCACGACAACAACCTTTCGGACCTCCATCCTGTAAGAGCGACTTCATCCTACCTGGGTTAGATCGACCGGCTTCGG  
GTTTTATTGCTGTGACTCCAGGCCCTATTAAGACCTTGTCCCTTGGCAAGCTGCGGACATATTGGTTTCCCTATGACTGCAAA  
GTTAAACCTTTTACTCTCGCCACAACAAAACCTTCCGCTGTTTCAAGACGGACGACGACTTTAGTTACTCACT  
CATAATCCTATGTTACCATAGTTTCTTTTCGAAAAGAGGTCATTCCTTTTCAAGCCGTGCTGGCTGTCACCTTACTGGTTTACGGCT  
CTTTTTACACCCGATAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCAGGTAAGTACGCTATCGGCTTGTAGACGTTTATGAAATTAG  
GAGTCGATGCCTCCAGATTCACGCCGGATATCCAACCCAGCACTAAGAATGACCCAAATCCTATTAATTTGATTTAC  
GGGGCTTTCACCTTACGGATGACGTTCCAGTCAATTTCAACTAATAAAGGATGTTGATCAGTCTTACTACCCACA  
TCTTCTGTAATTTCTTACAGGAATTCAGTTTGTGTCGGCTTTTCGATCGACTTACTACGGCATCGCATTCTTCTTT  
CCTCTGCTACTAAGATGTTTTCAGTTTCGGCAGGTTCCCGCTCCTTACGGAGCATCAGAAGATAGGATGTCCTTCA



*Mb. bryantii* M.o.H.<sup>T</sup> (2705 bp)

GTCAGACAACCGGTAGACCAGTGGCACCACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAAGCAACCAACACTTC  
TAGTAGATAGCAACCAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCACCCCTTGG  
GTGCTGTGCACACCCAGGATGGAAAGAACCACATCGAAGTAGCAAGCCGACGGGTGATATGGGCTCTTGGCTGCGACCA  
CCCAGTTATCCCGAGCAGTAGTCTTCTGTCTCAAGCCCTCATCGACAAGGACATTGAGGTTCTAGGCCCTTCCGCTTTCGCC  
TCTGGATTCCGTAATGAGAAATCCAGTCAAGGCTGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCCACCTGAGCCAA  
CCTTTGGGCGCGCTTGATATCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTCCTCTTTGAGTTAGAG  
ACACAGTCAACGGAATATGGTGTCTCATTAAACGGCTCCACCAGAAGTGGGCTCCTGGCTTCTAAGCCTCCCATATACACTGCA  
TAACATGACCAAGCCTCAACGACAGACTGCAGTAAAGTCTACGGGGTCTTCGCTTCCCCTAGAAAGTCAAGTGGCATGTGCA  
CCACTTATGCAGGTTACTAGGTTCCAGTACGGGACAGTAGGGACCTCGTCTACCATTATGCAGGCCGGTACTTATCCGGC  
AAGGCATTTGCTACCTAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCGCTTACCAGGTTGAACCCCGGCTTACAGTG  
CCGGCACTGGGACGGTGTGCCCCAGTACACACCTTACGGGTAGTAGGAGCTATGTTTTTAAACAGTCCGGGCCCC  
CTAGTACTGCGACCGTAGTATACAGCTGACACCTTATCCCAAAGTACGGGGCTATTTTGGCGATTTCCTTAGCTGG  
TTTACCCTAACACGCCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACCTGTGTGGATCTCGGTACGAAAAACAAAGAATTCAAATAACTCC  
CTTTACCGACTCCATGATCAACCGAACCATCCATAAGGACGGCTATTCAGCATAACCTAATTCTCGCTATTACAGCTC  
TCCTTAGGCTTCAACAATTAATGGGACGACAATCCACTCGGCCTACCTCAAAGCGTCAGAAATTAATCTAGCGTTGCCGC  
ATGTATCTTCAATGTACAGAAATTAACCTGTTTCCCTTCCGGCAGTTCGAATTACGACTGGTCTTAGGATCGACTAACCT  
TGGGTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCCGGCGTAAAGATTCTACTTTACTTTGCTGCTACTGCTACCAGGAT  
CCACATTACTGCAAGTCCACTGGAATTCACACCCAGCTTCAAATCTAACAGCAGCCTCCCTACAAAATCACATATTCTGT  
GTTCTAAGGATACGGTAAACCGGCTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCTTTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCTTTAA  
AGGATGGTCTTCTAAGCCACCTTCCATTGCTGGGGCAAAGACCCCTTACACTTATCCGGTATTAGGGACCTTAAAC  
CTTAGTCTGAGTCTTCTCTCGGGACACAGGTTACCCCGCCCTTACTCCAACCTTCCAGTATTTAGGACGAGTTCGGGA  
GTTTTACAGGATGCCGAGGAATTTCTCCCTAACACCCAATTAGTGTCTACCTCGCCACCAACCTCCAGTACGGCTGTCT  
TAGAGACATTTCCGGGAGGAACAGCTGTACCGGCTTGATTGGCTTTTACCCTAGCCCAAGGTTATACGAGTGTTTTGCA  
CGACAACAACGCTTCCGACCTCCATCACTCGTAAGAGCGACTTATCCTACCCGGGTTAGATCGACCGGCTTCCGGTTTTAC  
CGTGTGACTACAGGCTTAAAGACCTCGTCCCTGGAAACTGCGGACATGTCCGGTTTCCCTACGACTACAAGGCTCAAC  
CTTTAGTCTCGCCACAACAGCAAACTCCCTGGCCCGTGTTCAGACGGAAGACACAACACTAGTCCATTCAACTCATAATC  
CCATGTTACCACAGTTCTTTTGAAGAACTTCATTCCTCCATGCCGTGCCTGGCTGTACCACTCTGGTTTACAGGTTCTTTTAC  
CCCCATTAGGGGTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGGTACTAGTACACTACGGTCTTGGAGACGTATTTAGAATTAGGAGTGCAT  
GCCTCCAGATTACGCCAATTTCAATCGACGCTACTAAGAAGTCAAACTCAACACATCAACATACATTACGGGGCTT  
TCACCCTTACGGCTGAACATTCCAGTCCAATTCAACTTATCAAAACAAGGTTGTAAACCAAGCCTTTTACACCACATCTCCC  
CAAATATCATAAAGGATTCAGTTTGTCTACACCGTGTTCGATCGACTTACTAACGGTATCGCATAAATTGCTTTCTTT  
CCTCCGCTACTAAGATGTTTACGTTACGCGGGTTCCTCCCTCACGGAGCATCCGAAGATAGGAAGTCCCATTAGGTAATC  
CTGGTCTATGGATGCATGCTCCTCGCCAGGCATA

*Mb. ferruginis* Mic6c05<sup>T</sup> (2712 bp)

CCGGTAGACCAGAGGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACATACACAATTCCATTAGA  
TAGCAACCAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCACCCCTTGGGTGCTGC  
TGCACACCCAGGATGGAAAGAACCACATCGAAGTAGCAAGCCGACGGGTGATATGGGCTCTTGCCTGCGACCAACCCAGTT  
ATCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCTATCTATGCCCTTACGACGAGGACTATGAGGTTCTGTTAGGCCCGGCTTTCGCTCTGGAT  
TCCGTAATGGGAAATCCAGTACGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCCACCTGAGCCGCTTTGG  
GCGCGCTTGATATCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTCCTCTTACAAGTTAGAGACACAG  
TCATGAGAAGGTGGTGTCTAAGAACGGCTCCACCAGACTGGCGACTGGTTTCAAACGCCTCCCACTACACTGCATACC  
CATGACCAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGTCTACGGGGTCTTCGCTTCCAATGGAATTTCTGGCTTGTGCACCAG  
AATGACAGTTTACTAGTTCTAGTACGGGACAGTGGGAACTCGTCTACCAATTCATGCAGGCCGTAATTCGGCAAGG  
CATTTGCTACCTTAAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCGCTTACTAGGTTGTACCCAGCTTACAGTGCAGG  
ACTGGGACGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTTAAACAGTCCGGCCCCCTGGT  
CACTGAGACAGCTGTCTCACAGCTGGCACCCCTTATCCCAAAGTTACGGGGCTATTTTGGCGATTTCCTTAGCTAGTTTAC  
CCTAAAACGCCTTAGTCTTCTACCTAGGGGACACAGTGTCCGATCTCGGTACGGAAATACAAGAATTCAAATTTAATTCCT  
TTTATGACTCCATGGATCAGCACGAACCATCCATAAGGACGGCTATTCAAATCTACACCTGGTTCTCGCTATTACAGCTCT  
CCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGCTACCTCGAAGCGTCAGAACTAAACTTAGCGTCCGCCAC  
GTATCTTGTATTGACAGGAATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCAATTGCAATTACGATTGGTCTTAGGATCGACTAACCCCTG  
GCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCCGGGTTAAAGATTCTACTTTACTTTGCTGCTACTACTACCAGGATCCT  
CATTCCTGCAAGGTCCACTGGAATTCAGCCCCAATTCACCCTTGCAGAACGCCTCCCTACAAAATCACCTATTCCGGTGTTC  
TAAGGTATCGGTAGCCGGCTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCATTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCGTTAAAGG  
GTGGTGTCTTAAAGCCACCTTCCCATTTGCTGGGGCAATGACCCCTTATACTAATCCGGCATTTAGGGACCTTAACTTAA  
GCTGAGTTGTTCTCTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCCCTTACCTCAACCTTCTACAGCGGTGACAAGTTCGGAGTTT  
TACAGGATGCGAGGGATTCTCCCTTAAACACCAATTAGTGTCTACTCCGACCTACCTCGCAGTCAAGTACGCTTCC  
AGTCAATTCGAGAGGAACAGCTGTACCCGGCTTGATTGGCTTTCACCCTAGCCCAAGGTTAGGGGAGTGTTCGCACGA  
CAACAACCTTACAGCTCCATCACTCGTAAGAGCGACTTCACTTACCTGGGTTAGATCGACCGGCTTCCGGTTTTAATGCT  
GTGACTCCAGGCCCTAATAAGACCTCGCCCTCACAATGCTGCGGGCAATGTTGGTTTCCCTGCGACTTCGAGGTTGAACCTCT  
AGTCTGCGCAACAACAAAACCTTCCCTGGCCCGTGTTCGAGAGGATAACATGACTTTAGTCCATCTCCTCATACTCCAC  
GTTACCATGGTTTCTTTCGGAGAAATTCATTCTTCCAAGCCATGCTAGGCTGTACCATCTGGTTTTCAGGTTCTTTTACCCCC  
CTGAAGGGTCTTTTTCAGCTTTCCTCACGGTACTAGTACGCTATCGGTCTTGGAGACGTATTTAGGATTAGGAGTGCATGCT  
CCCCAATTCACGCCGATATCCAACCGACGCTACTCAAGAACAATGATCAAAATCTCTCAGATTACATTTACGGGGCTATCA  
CCCTTACGGCAGTCAATTCACACATTTCAACTTCTGAGGAGGACCCCTTATATGACCAAAAGCCCTTATATGACCAAAAGC  
CTTCCACTATTTCTAGTGGGAATTCAGTTTGTCCATATGCCGTGTTTCGCTCGACGTTACTAACGGCATCGCATTTTGTCTTCT  
TTCTCTGCCTACTAAGATGTTTACGTTCCGGCAGGTTCCCGCTCCTGACGGAGCATCCGAAGAATGGGAAGTCCCATTAGGT  
AATCTGGGTTCTAAGGATGCATGCTCCTCGCCAGGCATA

*Mb.kanagiense* 196<sup>T</sup> (2689 bp)

ACCGTTCGACCAGTGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACAAATCCATTAGAT  
 AGCAACCAACCTGTCTCAGGACGGTCTAAACCCAGTCCAGTTCCTTAAATGGGCGAACAACCCACCCTTGGGTGCTGT  
 GCACACCCAGGATGGAAAGAACCGCATCGAAGTAGCAAGCCGAGGGTCGATATGGGCTCTTGCCTGCGACCACCGATTA  
 TCCCGAGGTAGCTTTTGTGCAAGCTGGCATCTGCCCCATCGACGAGGACTATGAGGTTCTGTTAGGCCGGCTTCCGCTCGGATT  
 TCGTACTGTGGGAAATCCAGTCAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCACCTGAGCCGACCTTTGGG  
 CGCGCTTGATATCTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTCTCTTACGAGTTAGAGACACAGT  
 CATGAGAAGGTGGTGTCTCAACGACGGCTCCACCAGGCCGCGGACCTGGTTTCGAAGCCTCCCACCTACACTGCATACCCAT  
 GACCAAGCCTCAACCGCAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATGGAATTCTCGGCTTGTGCCACAGAAT  
 AGCAGGTTACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTCTACCATTTCATGCAGGCCGGTACTTATCCGGCAAGGCAT  
 TTCGCTACCTTAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCCGCTTCACTTGGTTGTACCCAAGCTTACGTGCCGGCACT  
 GGGCAGGTGTGCGCCCCAGTACACACCCTTTCCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTTATTAACAGTCCGGGCCCCCTTGTCACT  
 GAGACCTTCTTGTCAAAGCTGGCATCTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCTATTTTGCCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTA  
 AAACGCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGCACCAGTGTGGATCTCGGTACGGAAATCAAGAATTCGATTAATTTCCCTTTTCATG  
 GACTCCATGGATAAACCGAACCATCCATAAGGACGGCTATTC AAGTCTGCACCTGGTTCTCGTGTACAGCTTCCCAGGC  
 TTAACAATAAATGGGACGACAATCCACACGGTCTACCTCGAAGCGTCAAGAAATTAACCTTGGCTGCCACATGTATCTTG  
 ATGTACAGGAATTAACCTGTTTCCCTTTCCGCAATTCGAGTTACTATGGTCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGA  
 ACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCCGGCGGTAAGATTCTCACTTTACTTTGCTGCTACTACTACCAGGATCCTCATTCTG  
 CCAGTTCGACTGGAACCTACGCCCCAGCTTCCGCCCTGACAGAACGCCCTCCACAAAATCACCTTTCGGTGTCTAAGGTAT  
 CGGTAGCCGGCTTAATCCCGTCCATTTGCGGTGCCATTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAACTCGTTAAAGGGTGGCTGC  
 TTCTAAGCCACCTTCCATTGTCTGGGGCCAAATGACCCCTTACACTAATCCGGCATTTAGGGACCTTAACCTTAGTCTGAGT  
 TGTCTCTTTGGGACAGGCTTACCCCGCCGCTTCACTCAACTTCTACGGTGGTACGAGTTCGAGGTTTTACAGGAT  
 GCCGAGGATTTCTCCCTAAACACCAATTAGTGCTCTACCTCGCCACCTACCTCCAGTCAAGGCTGACCTTCGAGTCAATTC  
 GAGAGGAACCACTGTCACCGCCCTTGATTGGCCTTTCACCAAGCCAAAGGTTAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACC  
 CTTACAGCTCCATCACTCGTAAAGCGACTTCACTTACCCTGGGTTAGATCGACCGGCTTCCGGTTTTGATGCTGTGACTCC  
 AGGCCATTAAGACCTCGCCCTCGCGTGTCTCGGGCATTGTTGGTTTCCCTGCGACTTCGAGGTTGAACCTTAGTCTCGCC  
 ACAACAAAAAATCCCTGGCCCGTGTTC AAGACGGATAACATGACTTTAGTCCATCCTCCTCATAATCCACGTTGCCATGG  
 TTCTTTTCGGAGGAATTCATTCTTCCAAGCCATGCTAGGCTGTCACCATCTGGTTTACAGGTTCTTTTACCCCCCTTAGGGGT  
 TCTTTTACGCTTTCCCTACGGTACTAGTACGCTATCGGTTGAGACGTAATTTAGGATTTGGGAGTCGATGCCTCCCGACTTCA  
 CGCCGATATCCAACCGCAGCTACTCAAGAACCTTGATCAGATCTCTTTTAAATGCGTTTACGGGGCTTACCCCTACCGGCA  
 AGACATTCCAGTCAATTTCAACTTCTCTAAGGAGGATCCTTAACCAAGACTTATTACACCACATCTTCCCACCATTTCTGGTGG  
 GAATTCAGTTTGTCTGTGCCGTGTTCGCTCGAGTTACTAACGGCATCGCTTTTGGCTTCTTTCTCTGCCTACTAAGATGTT  
 TCAGTTCCGGCAGGTTCCCGCTCCCGACGGAGCATCCGAAGATAGGAAGTCCATTAGGTAATCCTGGGTTCAATGGATGCATG  
 TCCTCGCCAGGCATA

*Mb.palustre* F<sup>T</sup> (2741 bp)

TGCCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACAAC  
 ACAATCCATTAGATAGCAACCAACCTGTCTCAGGACGGTCTAAACCCAGTCCAGTTCCTTAAATGGGCGAACAACCCCA  
 CCCTTGGGTGCTGTGCACACCCAGGATGGAAAGAACCGCATCGAAGTAGCAAGCCGAGGGTCGATATGGGCTCTTGCCT  
 GCGACACCCAGTATCCCCGAGGTAGCTTTTGTGCAAGCTGGCATCTGCCCCATCGACGAGGACTCTGAGGTTCTGTTAGGCCGG  
 CTTTCCGCTTGGATTCCGTAAGTGGGAATCCAGTCAAGGCCGGCTTTTGGCCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCACC  
 TGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATATCTTTTCAAGCGCGTGCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGTCTCCATA  
 AAAATGGAGTTAGAAACACAGTATGAGAAGGTGGTGTCTCAACGACGGCTACACTAGACCTGGCGACCTAGTTTCAAACGC  
 CTCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATGGA  
 ATTTCTGGCTTGTGACACAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTATGCAG  
 GCCGGTACTTATCCGGCAAGGCATTTTCGCTACCTTAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCCGTTTACCGGCCGCTTACCCGGTTG  
 AACCCGGGCTTACAGTCCGGCAGTGGCAGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTCGGGCTTGCATAGGAGCTATGTTTTTAT  
 TAAACAGTCCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGTCTTCTCAAAAGCTGGACTCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCTATTTTG  
 CCGATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCCTTAGGCTTCAACCTAGGGGCACAGTGTCCGATTCGAGTACGAAAACA  
 ATGGATTCAAATCTAATTTCCCTTTTTCATGGACTCCATGGATCAGCACGAACCATCCATACAGACGGCTAATTCAGTCTACAC  
 CATGGTTCTCGTATTACAGCTTCCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACACGGCCTACCTCAAAGCGTCA  
 GAAATTAGACATAGCGTCAACCGGTACCATCATTGTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCCGGCCAATTCGAATTACGATT  
 GGTCTTAGGATCGACTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCCGGCGTAAAGATTCTCACTTCACT  
 TTGCTGCTACTACTACCAGGATCCGCATCTGCGCAGGTCCACTGGAATTCACACCCAGCTTCCACCTGACAGAACGCCCTC  
 CCTACATAATCACCTTTCGGTGTACTAAGGTATCGGTAGCCGGCTTAAATCCCGTCCATTTTCGGTGCATTGACCTCGATGGGT  
 GATCTGTTACGAACTTTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCCACCTTCCCATTGTCTGGGGCCAAAGACCCCTTATACTAATC  
 CGGCATTTAGGGACCTAACCTTAGTCTGAGTTGTTCTCTTCCGGACACAGGCTTACCCCGCCCTCACACAAAGTGTGCTCGGGCATG  
 TTGGTTTCCCTCCGACTCAAGATAATCTTCTTAGTCTCGCCACAACAGAAAACCTCCCTGGCCCGTGTTC AAGACGGATAA  
 CATGACTTTAGTCCATACCTCCTCATAATCCACGTTGCCATGGTTTCTTTCAGAAGATTTTCACTTCTTCCAAGCCATGCTAGG  
 CTGTCACCATCTGGTTTACAGGTTCTTTTACCCCCCTTAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCACGGTACTAGTACGCTATCGGT  
 CTTGAGACGTAATTTAGGATTTAGGAGTGCATGCCTCCACATTCACGCCGGATATCCAACCGACGCTACTCAAGAACCCTGATC  
 AAATCCACTAGATTACGTTTACGGGGCTTTCACCTTACGCTACGGCTAAGTCTTTCCAGTACTATTTCCTCAAGACAGGAT  
 TCTTAACNNNGCCTATAAACACATCTTCACTCCATTACTAGGAGGAATTCAGTTTGTCTATGCCGTTTTTCGCTCGACGTT  
 ACTCACGGTATCAAAATTTGTTTTCTTTCTCTGCCTACTAAGATGTTTCAATTCGGCAGGTTCCCGCTCCACATAGGGAGCA  
 TCTCAAAGAAGGAAATGGGAAGTCCATTAGGTAATCCTGGGTTCAAAGGATGCATGCTCCTCGCCAGGCAATAT

*Mb. petrolearium* Mic5c12<sup>T</sup> (2645 bp)

GGCACTGCCTTGTGACAGACAACCGGTAGACCAGTGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACA  
 ACTAACAATTCCATTAGATAGCAACCAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCCTTTAATGGGCGAACAAC  
 CCCACCCTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGACAGGGTCGATATGGGCTCTT  
 GCCTGGCCACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCTCATGCCCCATCGACGAGGACTATGATGGTCTGTAGGCG  
 CCGGCTTTCGCCTGTGATTTCTGACTGTGGGAAATCCAGTCAGGCCGGCTTTTGCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCC  
 CACCTGAGCCGACCTTTGGGCGCGCTTGATATCTTTCAAGCGCGTCCGCCCCAGCCAACTGCCCATCTACCGGTGTTCTCT  
 TACGAGTTAGAGACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAAGTTCGGCTCCACCAGACCTGGCGACCTGGTTTCGAAGCCCTCC  
 ACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCTCAACCGACAGCTGCACAGCTGGCACCCCTTATCCCAAAGTTACGGGGCTATTTTGCCGATT  
 CTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTATGCAGGCCGG  
 TACTTATCCGGCAAGGCAATTCGCTACCTAAGAGGGTTATAGTTACCCCCGCGCTTACCGGCGCTTCACTAGGTTGTACCCC  
 AGCTTACAGTGCAGGCACTGGGACGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTTATTAACA  
 GTCCTGACCCCTGCTGACTGAGACCAGTGTCTGCACAGCTGGCACCCCTTATCCCAAAGTTACGGGGCTATTTTGCCGATT  
 TCCCTTAGCTAGTTTACCCTAACACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACAGTGTCCGATCTCGGTACGGAAATCAAGAAT  
 TCGATAAATCCCTTTTCATGGGCTCCGTGGATGAACCGAACCATCCATAAGGACGGCTATTCAGGTCTACACCTGGTTCGCG  
 TATTACAGCTTCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAGTCCCACACGGCCTACCTCGAAGCGTCAGAAATTAACCTT  
 GCGTGCACACTGTATCTTGTGACTGACGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCAATTCGAATTACGATGGTCTGTAGGCT  
 GACTAACCCCTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCGGCGGTAAGATTCTAACTTTACTTTGCTGCTACTA  
 CTACCAGGATCCTCATTCTGCCAGGTGACTGGAACCTACGCCCCAGCTTCCGCCCTGACAGGACGCCTCCCTACATAATCA  
 CCTTCGGTGTCTAAGGTATCGGTAGCCGGCTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCATTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGA  
 ACTCGTTAAAGGGTGGTGTCTTAAGCCACCTTCCATTGTCTGGGGCAATGACCCCTTATACTAATCCGGCATTTAGG  
 GACCTTAACTTAGTCTGATGTTCTTCTTTCGGGACAGGCTTACCCCGCGCCCTGACTCCAACTTCACTCCGGGTCGAC  
 AAGTTCGGAGTTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAAGTGTCTACTCTGCCACCTACCTCCAGTC  
 AGGCTGGCCTTCGAGCAATTCGAGAGGAACAGCTGTACCCGGCTTGTATTGCCTTTCACCACTAGCCAAAGTTAGGGGA  
 GTGTTTCGCACGACAACAACCTTCAGACCTCCACTCGTAAGAGCGACTTCACTTACCCTGGGTTAGACTCGACCCGGCT  
 CGGGTTTTGATGCTGTGACTCCAGGCCCTAATAAGACCTTACGCCCTTACCCCGCGCCCTGACTCCAACTTCACTCCGGGTCGAC  
 GGTGAACCTCTTAGTCTCGCCACAACAAAACTCCCTGGCCCGTGTTCAGAGCGGATAACATGACTTTAGTCCATCCTCC  
 TCATAATCCACGTTGCCATGGTTCTTTCGGAGGAATTCATTCTTCCAAGCCATGCTAGGCTGTACCATCTGGTTTCAGGT  
 TCTTTTACCCCCCTTAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCACGGTACTAGTACGCTATCGGTCTTGTAGACGATTTTAGGATTGG  
 GAGTCGATGCCCTTACCGCCCAATATCCAACTTCAAGGACTACTAAGAACTTGTATCAGATCCCTTTAAATTCGTTTACG  
 GGACTATCACCTCTACGGTAAGACATTCAGTCAATTTCAACTTCTCTAAGGAGGATCTTTAATCAAGACTTATTACACCAC  
 ATCTTCCACCATTTCCGGTGGGAATTCAGTTTGTCTGTGCCGTTTTCGCTCGACGTTAATAACGGCATCGCTTTTGCTTTCTT  
 TTCTCTGCCTACTAAGATGTTTCAGTTTGGCAGGTTCCCGCTCCCGACGGAGCATCAG

*Mb. subterraneum* A8p<sup>T</sup> (2692 bp)

CCTTATCAGACAACCGGTAGACCAGAGGCGCCGACGGCTCGTTCCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAGACAACAACAC  
 AATTCCATTAGATAGCAACCAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCCTTTAATGGGCGAACAACCCACC  
 CTTGGGTGCTGCTGCACACCCAGGATGGAAGAACCAGACATCGAAGTAGCAAGCCGACAGGGTCGATATGGGCTCTTGCTGC  
 GACCACCCAGTTATCCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCTATCTCAGGCCCCATCGACGAGGACTCTGAGGTTCTGTTAGGCCGGCT  
 TTCGCTCTGGATTCTGACTATGGGAAATCCAGTCAGGCCGGCTTTGCCCCTTACACTCTACGGTGGATCTGTCTGCCACTG  
 AGCCACCTTTGGGCGCGCTTGTATCTTTTCAAGCGCGTCCGCCAACTGCCCATCTACCGGTGTCTCCACACA  
 AATGGAGTTAGAGACACAGTCATGAGAAGGTGGTGTCTCAACGACGGCTCCACCACGCCTGGCGACGCGGTTTCGAAGCCTC  
 CCACCTACACTGCATACCCATGACCAAGCCTCAACGGCAGACTGCAGTAAAGCTCTACGGGGTCTTCGCTTCCCAATGGAATT  
 CTCTGGCTTGTGCACCAGAATAGCAGGTTCACTAGGTTCTAGCTAGGGACAGTGGGGACCTCGTTTACCATTATGCAGGCC  
 GGTACTTACCGGCAAGGCAATTCGCTACCTTAAAGAGGTTATAGTTACCCCGCGCTTACCGGCGCTTACCCGGTTGAC  
 CCGGGCTTACGTCGCCGCACTGGGACGGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTTGTAGGAGCTATGTTTTTATTA  
 ACAGTCGGGCCCCCTAGTCACTGAGACCAGCTTCTCGCAAGCTGGCCTTATCCCAAAGTTACGGAGCTATTTTGCCG  
 ATTTCCCTTAGCTAGTTTACCCTAAAACGCCTTAGGCTTCTCACCTAGGGGACAGTGTGCGATCTCGGTACGGAAACAAT  
 GGATTCAAATCTAATTTCCCTTTCATGGACTCCATGGACTAGCCAAACCATCCATACAGACGGCTAATTCAGTCTACACCAT  
 GGTCTCGCTATTACAGCTCTCCCCAGGCTTAAACAATTAATGGGACGACAATCCACAAGGCCTACCTCAAAGCGTCAGAA  
 ATTAGACATAGCGTACCCGCTACCATGCTGTACAGGAATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCCATTCGAATTACGAATGGTC  
 TTAGGATCGACTAACCCTTGGGTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTTCGGCGGTAAGATTCTCACTTCACTTTGC  
 TGCTACTACTACCAGGATCCGCATTCTGCCAGGCTTCAACCCAGCTTCCACCCGACAGAAGCCCTCCCTA  
 CATAATCACCTTGGGTGTACTAAGGTATCGGTAGCCGGCTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCATTGACCTCGATGGGTGATC  
 TGTTACGAACTTTAAAGGGTGGCTGCTTCAAGCCACCTTCCATTGTCTGGGGCCAAAGACCCCTTATACTAATCCGGC  
 ATTTCCGGACCTTAACTTAGTCTGAGTTGTTTCTTTTCGGGACACAGGCTTACCCCGCGCCCTCACTCCAACCTTCTACAG  
 CGGTAACGAGTTCCGAGTTTACAGGATGCCGAGGATTTTCCCTTAAACACCCAATTAAGTGTCTACCTCGCCACCTACC  
 TCCAGTCAGGTCAGTACTGAGTCAATTCGAGAGGAACCGTGTACCAGGCTTTCAGGACTTCACTTCCAAAGCCAAAGGT  
 TAGGGGAGTGTTCGCACGACAACAACCTTTCAGACCTCCATCACTCGTAAAGCGACTTCACTTACCCTGGGTTAGATCGA  
 CCGGCTTCGGGTTTTAATGCTGTGACTCCAGGCCCTAATAAGACCTCGCCCTCACACAAATAAATGTGCTGCGGGCATGTTG  
 GTTTCCCTGCGACTTCAAGGTTAAACCTTTTAGTCTCGCCACAACAGAAAACCTTCCCTGGCCCGTGTTCAGAGCGGATAACAT  
 GACTTTAGTCCACTCTCTACTCCACGTTACCATTGGTTTCTTTTCAGAAAGACTTCACTTCCAAAGCCATGCCCCGCTG  
 TCACCATCTGGTTTACAGGTTCTTTTACCCCTTTTAGGGGTTCTTTTACGTTTCCCTCACGGTACTAGTACGCTATCGGTCTT  
 GAGACGATTTAGGATTAGGAGTGCATGCCTCCCAAAATTCAGCCCAATATCCAATGGACGCTACTCAAGTACACTAATCAA  
 ATCCACTCAGATTACATTTACGGGGCTATCCCTCTACGGCCAGCAGCATTCAGTGAAGTTCAACTTCTCAAGCCGGAT  
 CCTAATAGTCCAAAGCTTATTACACCATCTTACCCCTACTAGGGGAAATTCAGTTTATCCCTATGCCGTTTTCGCTCGA  
 CGTTACTAACGGCATCACGATTTGTTTTCTTTCTCTGCTACTAAGATGTTTCAATTCGGCAGGTTCCCGCTCCAAAAAAG  
 GAGCATCTCCAAAAGAAGGAAATGGAA

*Mb. uliginosum* P2St<sup>T</sup> (2664 bp)

TGCCTTGTCAGACAACCGGTAGACCAGTGGCACCGACGGCTCGTTCTCTCGTACTGGAGCCACCTTCCCCTCAAGCAACCAA  
 CACTTCTAGTAGATAGCAACCAACCTGTCTACGACGGTCTAAACCCAGCTACGTTCCCTTTAATGGGCGAACAACCCAC  
 CCTTGGGTGCTGCGCACCCAGGATGGAAAGAACCCGACATCGAAGTAGCAAGCCGAGGGTCGATATGGGCTCTTGCCTG  
 CGAACCCAGTTATCCCGAGGTAGCTTTTCTGTCTACATCAAGCCCTCATCGACAAGGACATTGAGGTTCTGTTAGGCCCGGC  
 TTTGCGCTCTGGATTCCGTAATGTTGAAATCCAGTCAAGGCTGGCTTTTGCCTTACACTCTACGGTGGATCTCTGTCCACCT  
 GAGCCAACTTTGGGCGCGCTTGATATCTTTCAAGCGCGTCCGCCCCAGCCAACTGCCATCTACCGGTGCTCTCTTTCGA  
 GTTAGAGACACAGTACAGGAATATGGTGTCTCATTAAACGGTCCACCAGAACTGGCGTCTGGCTTCTAAGCCTCCCATATA  
 CGTGGCATACCCATGACCAAGCTCAACGACAGACTGCAGTAAAGCTTACGGGGTCTTCGCTTCCCACTAGAAGTCAAGTGGC  
 ATGTGCACCACTTATGACAGGTTCACTAGGTTCCAGCTAGGGACAGTAGGGACCTCGTTCTACCATTCATGCAGGCCGGTACTT  
 ATCCGGCAAGGCATTTGCTACCTTAAGAGGGTTATAGTTACCCCGCGCTTACCGGCGCTTACCAGGTTGAACCCCGGCT  
 TCACGTGCCGGCACTGGGCAAGTGTGCCCCAGTACACACCTTTTCGGGCTAGCTAGGAGCTATGTTTTTATTAACAGTCCG  
 GGCCCCCTAGTCACTGCGACAGCTGTCTACACAGCTGGCACCCCTTATCCCAAAGTTACGGGGCTATTTTGGCCGATTTCCCT  
 TAGCTGGTTTACCCTAACACGCCTTAGGCTTCTACCTAGGGGACCTGTGTCCGATCTCGGTACGAAAACAAAGAATCCAAA  
 ATAGTTTCTTTTCAAGGGCTCCATGGATCAACCGAACCATCCATAAGGACGGCTATTCAAGCATACACCTAATTCTCGCTAT  
 TACAGCTCTCCTTAGGCTTCAACAATTAATGGGACGACAATCCCACTCGGCTACCTCAAAGCGTCAGAAACTAAAATCTAGC  
 GTTCCGATGTATCTTACAGGAATATTAACCTGTTTCCCTTTCGGCCAGTTCGAATTACCACTGGTCTTAGGATCGA  
 CTAACCTTGGCTGACGAACATTGCCAAGGATCCCTAGCCCTTCGGCGGTAAGATTCTCACTTTACTTTGCTGCTACTGCTA  
 CCAGGATCCACATTACTGCAAGATCCACTGGAATTCACACCCAGCTTCAAATCTAACAGCACGCTCCCTACAAAATCACAT  
 AGTTATGTGTTCTAAGGTATCGGTAACCGGCTTAATCCCGTCCATTTTCGGTGCCTTTGACCTCGATGGGTGATCTGTTACGAA  
 CTCTTAAAGGATGGTGTCTTAAGCCACCTTCCATTGTCTGGGCCAAAGACCCCTTACACTTATCCGGTATTTAGGGA  
 CCTTAACTTAGTGTGACTGCAGGCCCTATTAAGACCCCGTCCCTGGAAAACCTGCGGACATGTCGGTTTCCCTACGCAAG  
 GTTCGGAGTTTTACAGGATGCCGAGGGATTTCTCCCTTAAACACCCAATTAGTGCTCTACCTCGCCACCAACCTCCAGTCCAG  
 GCTGTCTTAGAGACATTTCCGGGAGGAACAGCTGTCACCGGCTTGATTGGCCTTTCACCACTAGCCCCAGGTTATACGAGT  
 GTTTTGCACGACAACAACGCTTCGGACCTCCATCACTCGTAAGAGGCGACTTCATCCTACCCGGGGTTAGATCGACCGGCTTCG  
 GGTTTTACCGTGTGACTGCAGGCCCTATTAAGACCCCGTCCCTGGAAAACCTGCGGACATGTCGGTTTCCCTACGCAAG  
 GATAAAACCTTTTAGTCTCGCCACAACAGCAAACCTCCCTGGCCCGTGTTCAGACGGAAGACACAACACTAGTCCATTCAAC  
 TCATAATCCCATGTTACCACAGTTCTTTTGAAGAATTCATTCTTCCATGCCGTGCCTGGCTGTCACCATCTGGTTTACAGTT  
 CTTTTACCCCCCATTAGGGGTTCTTTTCAACTTTCCCTCACGGTACTAGTACACTATCGGTTCTTGGACGATTTTAGAATTAG  
 GAGTCGATGCTCCCAATTCACGCCGAATTTCCAATCGACTACTCAAGAACCCAATCCAATCCAATTTACATTTA  
 CGGGGCTTTACCCCTACGGCTGAACATTCCAGTTCAATTCAACTTACCAAACCGGACCATAAACTGAGCCTTACTACACC  
 ACATCTCCCAAAATCACTAAGTGGGATTGATTTGTTCTACACCGTGTTCGATCGACTTACTAACGGTATCGCTAAATGTCT  
 TTCTTTCTCCGCTACTAAGATGTTTCAATTCGGCGGGTTCCTCGCTCTCACGGAGCATCCGAAGATAGGAAGTCCCA

**VIII.2 Zellzahlbestimmung mittels qPCR**

Methanosarcinales-Titer anhand *Mb. formicum* MF<sup>T</sup>-Kalibrierungsgeraden bestimmt:

BGA	Zellzahl				
	MBT <sup>1</sup>	MMB <sup>1</sup>	Msc <sup>1</sup>	MSL <sup>1</sup>	MSL-Msc <sup>1</sup>
Arenrath	3,73 x 10 <sup>8</sup>	4,43 x 10 <sup>7</sup>	5,32 x 10 <sup>8</sup>	1,30 x 10 <sup>9</sup>	7,71 x 10 <sup>8</sup>
Niederweiler	4,27 x 10 <sup>8</sup>	7,05 x 10 <sup>7</sup>	9,23 x 10 <sup>7</sup>	1,03 x 10 <sup>8</sup>	1,08 x 10 <sup>7</sup>
Obere Blies	5,56 x 10 <sup>8</sup>	1,50 x 10 <sup>7</sup>	1,02 x 10 <sup>8</sup>	1,91 x 10 <sup>8</sup>	8,90 x 10 <sup>7</sup>
Kaschenbach	1,45 x 10 <sup>9</sup>	3,29 x 10 <sup>8</sup>	5,11 x 10 <sup>7</sup>	1,04 x 10 <sup>8</sup>	5,28 x 10 <sup>7</sup>
Wallhalben	8,88 x 10 <sup>8</sup>	1,25 x 10 <sup>8</sup>	2,77 x 10 <sup>6</sup>	3,37 x 10 <sup>6</sup>	5,95 x 10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>MBT = Ordnung Methanobacteriales, MMB = Ordnung Methanomicrobiales, MSL = Ordnung Methanosarcinales, Msc = *Methanosarcina* sp., MSL-Msc = kalkulierter *Methano-saeta* sp.-Anteil. Durchschnittswerte aus Dreifachbestimmung.

Methanosarcinales-Titer anhand *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>- Kalibrierungsgeraden bestimmt:

BGA	Zellzahl				
	MBT <sup>1</sup>	MMB <sup>1</sup>	Msc <sup>1</sup>	MSL <sup>1</sup>	MSL-Msc <sup>1</sup>
Arenrath	3,73 x 10 <sup>8</sup>	4,43 x 10 <sup>7</sup>	5,32 x 10 <sup>8</sup>	1,07 x 10 <sup>9</sup>	5,34 x 10 <sup>8</sup>
Niederweiler	4,27 x 10 <sup>8</sup>	7,05 x 10 <sup>7</sup>	9,23 x 10 <sup>7</sup>	9,52 x 10 <sup>7</sup>	2,93 x 10 <sup>6</sup>
Obere Blies	5,56 x 10 <sup>8</sup>	1,50 x 10 <sup>7</sup>	1,02 x 10 <sup>8</sup>	1,71 x 10 <sup>8</sup>	6,93 x 10 <sup>7</sup>
Kaschenbach	1,45 x 10 <sup>9</sup>	3,29 x 10 <sup>8</sup>	5,11 x 10 <sup>7</sup>	9,60 x 10 <sup>7</sup>	4,48 x 10 <sup>7</sup>
Wallhalben	8,88 x 10 <sup>8</sup>	1,25 x 10 <sup>8</sup>	2,77 x 10 <sup>6</sup>	3,66 x 10 <sup>6</sup>	8,91 x 10 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>s.o.

Zelltiter methanogener Archaea in BGA

<b>Primer:<sup>1</sup></b>	<b>MBT<sup>1</sup></b>			<b>MMB<sup>1</sup></b>			<b>Msc<sup>1</sup></b>			<b>MSL<sup>1</sup></b>		
<b>Gerade:<sup>2</sup></b>	<i>Mb. formicicum</i> MF <sup>T</sup>			<i>Mcu. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup>			<i>Msc. mazei</i> Gö			<i>Mb. formicicum</i> MF <sup>T</sup> (MBT) <sup>3</sup>		
<b>BGA</b>	Ø	Max.	Min.	Ø	Max.	Min.	Ø	Max.	Min.	Ø	Max.	Min.
Arenrath	3,73 x 10 <sup>8</sup>	3,98 x 10 <sup>8</sup>	3,48 x 10 <sup>8</sup>	4,43 x 10 <sup>7</sup>	4,62 x 10 <sup>7</sup>	4,22 x 10 <sup>7</sup>	5,32 x 10 <sup>8</sup>	5,72 x 10 <sup>8</sup>	5,11 x 10 <sup>8</sup>	1,30 x 10 <sup>9</sup>	1,54 x 10 <sup>9</sup>	1,07 x 10 <sup>9</sup>
Niederweiler	4,27 x 10 <sup>8</sup>	4,40 x 10 <sup>8</sup>	4,08 x 10 <sup>8</sup>	7,05 x 10 <sup>7</sup>	7,44 x 10 <sup>7</sup>	6,60 x 10 <sup>7</sup>	9,23 x 10 <sup>7</sup>	9,72 x 10 <sup>7</sup>	8,87 x 10 <sup>7</sup>	1,03 x 10 <sup>8</sup>	1,18 x 10 <sup>8</sup>	8,48 x 10 <sup>7</sup>
Obere Blies	5,56 x 10 <sup>8</sup>	5,99 x 10 <sup>8</sup>	5,24 x 10 <sup>8</sup>	1,50 x 10 <sup>7</sup>	1,57 x 10 <sup>7</sup>	1,46 x 10 <sup>7</sup>	1,02 x 10 <sup>8</sup>	1,03 x 10 <sup>8</sup>	1,00 x 10 <sup>8</sup>	1,91 x 10 <sup>8</sup>	2,18 x 10 <sup>8</sup>	1,70 x 10 <sup>8</sup>
Kaschenbach	1,45 x 10 <sup>9</sup>	1,55 x 10 <sup>9</sup>	1,39 x 10 <sup>9</sup>	3,29 x 10 <sup>8</sup>	3,72 x 10 <sup>8</sup>	3,02 x 10 <sup>8</sup>	5,11 x 10 <sup>7</sup>	5,52 x 10 <sup>7</sup>	4,65 x 10 <sup>7</sup>	1,04 x 10 <sup>8</sup>	1,09 x 10 <sup>8</sup>	1,06 x 10 <sup>8</sup>
Wallhalben	8,88 x 10 <sup>8</sup>	9,66 x 10 <sup>8</sup>	7,80 x 10 <sup>8</sup>	1,25 x 10 <sup>8</sup>	1,30 x 10 <sup>8</sup>	1,21 x 10 <sup>8</sup>	2,77 x 10 <sup>6</sup>	2,89 x 10 <sup>6</sup>	2,69 x 10 <sup>6</sup>	3,37 x 10 <sup>6</sup>	3,86 x 10 <sup>6</sup>	2,88 x 10 <sup>6</sup>

<b>Primer:<sup>1</sup></b>	<b>MSL<sup>1</sup></b>		
<b>Gerade:<sup>2</sup></b>	<i>Mcu. bourgensis</i> MS2 <sup>T</sup> (MMB) <sup>4</sup>		
<b>BGA</b>	Ø	Max.	Min.
Arenrath	1,07 x 10 <sup>9</sup>	1,25 x 10 <sup>9</sup>	8,80 x 10 <sup>8</sup>
Niederweiler	9,52 x 10 <sup>7</sup>	1,08 x 10 <sup>8</sup>	7,90 x 10 <sup>7</sup>
Obere Blies	1,71 x 10 <sup>8</sup>	1,95 x 10 <sup>8</sup>	1,53 x 10 <sup>8</sup>
Kaschenbach	9,60 x 10 <sup>7</sup>	1,00 x 10 <sup>8</sup>	9,11 x 10 <sup>7</sup>
Wallhalben	3,66 x 10 <sup>6</sup>	4,17 x 10 <sup>6</sup>	3,15 x 10 <sup>6</sup>

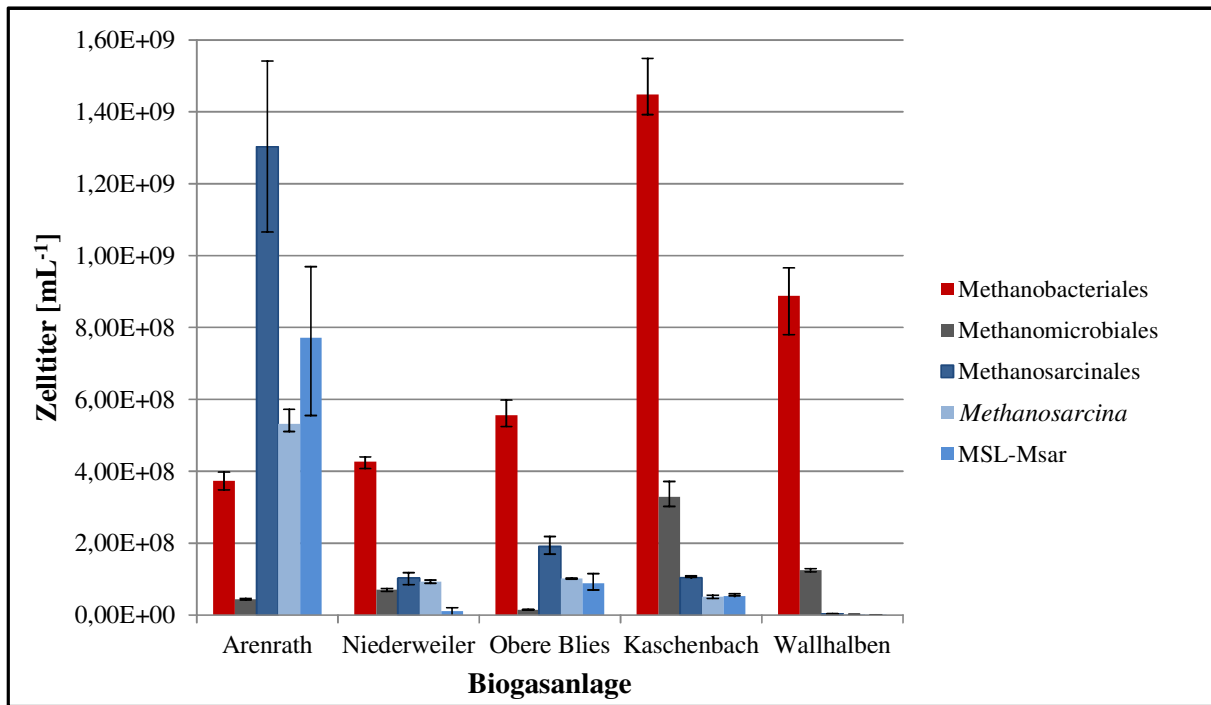
Angegeben sind die durchschnittlichen (Ø), maximalen (Max.) und minimalen (Min.) Zelltiter der Dreifachbestimmung.

<sup>1</sup>Spezifität der eingesetzten Primer: MBT = Ordnung Methanobacteriales, MMB = Ordnung Methanomicrobiales, MSL = Ordnung Methanosarcinales, Msc = Gattung *Methanosarcina* sp.

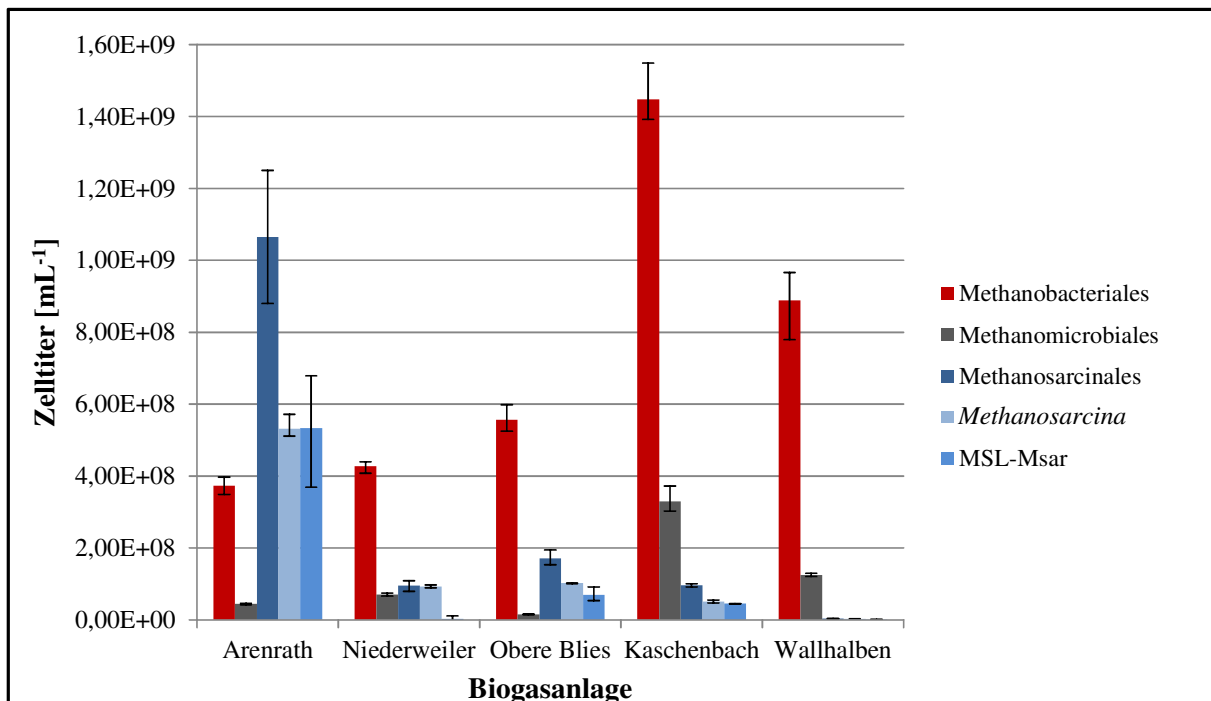
<sup>2</sup>Erstellung der Kalibrierungsgerade anhand definierter Zelltiter aus Reinkulturen des angegebenen methanogenen Archaeons.

<sup>3</sup>Quantifizierung des Methanosarcinales-Titers anhand einer Kalibrierungsgerade des MBT-Primersets mit definierten Zelltitern von *Mb. formicicum* MF<sup>T</sup>.

<sup>4</sup>Quantifizierung des Methanosarcinales-Titers anhand einer Kalibrierungsgerade des MMB-Primersets mit definierten Zelltitern von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup>.



**Abb. 86A:** Zelltitervarianz bei Quantifizierung methanogener Archaea aus Biogasanlagen mittels qPCR in Dreifachbestimmung. Berechnung des Anteils an Methanosarcinales nach Kalibrierungsgeraden aus definierten Zelltitern von *Mb. formicum* MF<sup>T</sup> (MBT-Primer). Fehlerbalken bezeichnen jeweils die minimalen und maximalen Zelltitertiter einer Dreifachbestimmung. *Methanosaeta* sp.-Titer berechnet als Differenz aus Methanosarcinales-Titer und *Methanosarcina* sp.-Titer (MSL-Msar). Zur Staffelung der Zellzahlen der verschiedenen Ordnungen vgl. **Abb. 85A**.



**Abb. 86B:** Zelltitervarianz bei Quantifizierung methanogener Archaea aus Biogasanlagen mittels qPCR in Dreifachbestimmung. Berechnung des Anteils an Methanosarcinales nach Kalibrierungsgeraden aus definierten Zelltitern von *Mcu. bourgensis* MS2<sup>T</sup> (MMB-Primer). Fehlerbalken bezeichnen jeweils die minimalen und maximalen Zelltitertiter einer Dreifachbestimmung. *Methanosaeta* sp.-Titer berechnet als Differenz aus Methanosarcinales-Titer und *Methanosarcina* sp.-Titer (MSL-Msar). Zur Staffelung der Zellzahlen der verschiedenen Ordnungen vgl. **Abb. 85B**.

# Erklärung

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



---

(Robbin Stantscheff, Mainz)