





**Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien aus  
Biogasanlagen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Jelena Bohn

Mainz, 2016



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2016



Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von März 2013 bis März 2016 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Veröffentlichungen.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Erneuerbare Energien und Biogas .....	1
1.2 Mikrobielle Prozesse in Biogasanlagen.....	3
1.2.1 Hydrolyse.....	4
1.2.2 Acidogenese .....	4
1.2.3 Acetogenese .....	5
1.2.4 Methanogenese.....	6
1.3 Milchsäurebildung durch Bakterien.....	6
1.4 Silierungsprozess durch Milchsäurebakterien .....	10
1.5 Fließschema einer Biogasanlage.....	11
1.5.1 Substrate .....	12
1.5.2 Fermenter .....	14
1.5.3 Biogasnutzung .....	16
1.6 Milchsäure in Biogasanlagen und Forschungsstand.....	16
1.7 Ziele der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Verwendete Materialien.....	19
2.1.1 Chemikalien und Gase .....	19
2.1.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits .....	21
2.1.3 Geräte und Hilfsmittel .....	22
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.5 Software .....	25
2.2 Mikrobiologische Materialien und Methoden .....	26
2.2.1 Mikroorganismen .....	26

2.2.2 Beprobte Biogasanlagen.....	26
2.2.3 Nährmedien .....	27
2.2.4 Anreicherung von milchsäurebildenden Bakterien.....	31
2.2.5 Methoden zur Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien .....	32
2.2.6 Bestimmung der Lebendkeimzahl.....	33
2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	34
2.4 Mikroskopische und physiologische Untersuchungen .....	35
2.4.1 Phasenkontrastmikroskopie.....	35
2.4.2 UV-Test zur Bestimmung der Milchsäure-Stereoisomerie .....	35
2.4.3 Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels mit API 50 CH .....	35
2.4.4 Test auf Verwertbarkeit ausgewählter Polymere.....	35
2.5 Molekularbiologische Methoden .....	36
2.5.1 DNA-Isolierung aus Reinkulturen und Fermenterproben .....	36
2.5.2 Amplifikation bakterieller 16S rDNA.....	36
2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	37
2.5.4 Gelextraktion.....	38
2.5.5 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	38
2.5.6 Sequenzierung und Analyse der PCR-Produkte .....	38
2.5.7 SAPD-PCR .....	38
2.5.8 Nested SAPD-PCR.....	39
2.5.9 Klonierung.....	40
2.5.10 Colony-PCR mit transformierten <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	41
2.14.11 Primerentwicklung.....	41
2.5.12 SCAR-PCR zur Überprüfung der Primerspezifität.....	43
2.5.13 Multiplex-PCR zum qualitativen Nachweis ausgewählter Isolate.....	44
2.5.14 Quantitativer Nachweis der Isolate in Fermenterproben mittels qPCR.....	45
3. Ergebnisse.....	51
3.1 Diversität milchsäurebildender Bakterien in Biogasanlagen .....	51

3.2 Phylogenetische Einordnung der milchsäurebildenden Isolate .....	53
3.2.1 Isolate der Ordnung Bacillales .....	55
3.2.2 Isolate der Ordnung Lactobacillales .....	55
3.2.3 Isolate der Ordnung Clostridiales.....	56
3.3 Morphologische und physiologische Charakterisierung ausgewählter Isolate.....	58
3.3.1 Morphologie der Isolate.....	58
3.3.2 Abbaufähigkeit von Polymeren und diverser Kohlenhydratverbindungen.....	60
3.3.3. Stereoisomerie der gebildeten Milchsäure.....	64
3.4 Überprüfung der Spezifität der entwickelten Primer .....	65
3.5 Qualitativer Nachweis ausgewählter Isolate in Fermenterproben .....	71
3.6 Quantifizierung der milchsäurebildenden Bakterien in Fermenterproben .....	75
3.7 Lebendkeimzahlen der Isolate in Maissilage- und Fermenterproben .....	83
4. Diskussion .....	85
4.1 Bewertung der Identifizierung der Isolate auf Art-Ebene.....	85
4.2 Beurteilung der entwickelten Nachweissysteme.....	87
4.3 Relevanz der Lactobacillaceae durch Bildung von Milchsäure als Hauptprodukt... 88	88
4.4 Erhöhter Eintrag milchsäurebildender Bakterien durch Maissilage.....	91
4.5 Schlüsselrolle des Isolates aus der <i>Streptococcus equinus</i> -Gruppe? .....	92
4.6 Abbau zahlreicher Polymere durch Bacillaceae .....	93
4.7 Geringe Anzahl an isolierten milchsäurebildenden Clostridiaceae.....	95
4.8 Einschätzung der Bedeutung der gebildeten Produkte durch die Isolate .....	96
4.9. Ausblick.....	97
5. Zusammenfassung .....	99
6. Literatur .....	102
7. Anhang.....	115
7.1 Ausgewählte Genomabschnitte der Isolate für die Primerentwicklung.....	115
7.2 Spezifitätsüberprüfung der entwickelten Primer .....	120

7.3 Prozentuale Verteilung der gebildeten D- und L-Milchsäure durch die Isolate.....	122
7.4 MPN-Werte der Lebendkeimzahlbestimmung .....	122
7.5 Messdaten zur Quantifizierung der Isolate mittels qPCR.....	123
7.6 Gruppierung der Isolate auf Basis der Fingerprintmuster durch die SAPD-PCR..	127
7.7 Daten zur 16S rDNA-Sequenzanalyse der Isolate.....	130
8. Eidesstaatliche Erklärung.....	132
9. Danksagungen .....	133
10. Lebenslauf.....	134

## Abkürzungsverzeichnis

BGA	Biogasanlage
BHKW	Blockheizkraftwerk
BMWi	Bundesministerium für Wirtschaft und Technik
bp	Basenpaare
C <sub>T</sub>	cycle-threshold
KBE	Koloniebildende Einheit
Col-PCR	Colony-PCR
$\Delta G^\circ$	Freie Energie unter biochemischen Standardbedingungen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
eH <sub>2</sub> O	Entionisiertes Wasser
F	Fermenter
FM	Festmist
FvB	Fachverband für Biogas e.V.
GeS	Getreideschrot
GHD	Gewerbe, Handel, Dienstleistungen
GPS	Ganzpflanzensilage
Gr.	Gruppe
GS	Grassilage
HF	Hydrolysefermenter
HM	Hähnchenmist
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
inkl.	inklusive
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
l <sub>N</sub>	Normliter
LRW	Langachsührwerk
M	Marker
MPN	Most probable number
MS	Maissilage
N	Negativkontrolle
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
n.b.	Nicht bestimmbar
NF	Nachfermenter oder Nachgärer
NÜ	Nicht überprüft
nSAPD	Nested Specific Amplified Polymorphic DNA
NTA	Nitrilotriacetat
oTS	Organische Trockensubstanz
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PES	Polyethersulfon
PK	Phosphoketolase
<i>Ps.</i>	<i>Pseudoramibacter</i>
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
RG	Rindergülle
rpm	Rotation per minute
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
SAPD	Specific Amplified Polymorphic DNA
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SG	Schweinegülle

## Abkürzungsverzeichnis

---

SL	Stammlösung
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMRW	Tauchmotorrührwerk
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht oder sind zur Publikation eingereicht:

**Bohn, J.,** Dröge, S., & König, H. (2014a). The importance of lactic acid for the formation of methanogenic substrates in biogas plants. Poster. *Gemeinsame Jahrestagung der DGHM der VAAM*, 05.10.2014- 08.10.2014, Dresden

**Bohn, J.,** Dröge, S., & König, H. (2014b). Lactic acid formation in biogas plants. Poster. *Biogas Science 2014 - International Scientific Conference on Anaerobic Digestion*, 26.10.2014 – 30.10.2014, Wien

**Bohn, J.,** Yüksel-Dadak, A., Dröge, S., & König, H. (2016). Isolation of lactic acid forming bacteria from biogas plants. *Journal of Biotechnology*. Submitted.



## 1. Einleitung

### 1.1 Erneuerbare Energien und Biogas

Im Jahre 2000 ist erstmals das Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) zur Sicherstellung einer klima- und umweltverträglicheren Energieversorgung in Kraft getreten. Ziel des Gesetzes ist die Steigerung der erneuerbaren Energien an der Stromversorgung bis zum Jahr 2050 auf mindestens 80 %. Zeitgleich wird einerseits eine zunehmende Unabhängigkeit von fossilen Brennstoffen verfolgt und andererseits die Technologieentwicklung im Bereich der erneuerbaren Energien gefördert (BMWi, 2016a). Das Gesetz wurde seit seiner Einführung mehrmals reformiert. Aktuell hat das Bundeskabinett einen neuen Gesetzesentwurf für die EEG-Novelle 2016 veröffentlicht. Nach einigen Debatten konnte nun eine Einigung zur weiteren Förderung von Biogasanlagen durchgesetzt werden. Eine tiefgreifende Veränderung wird die bislang staatlich festgelegte Vergütung der Stromversorgung aus erneuerbaren Energien betreffen. Ab 2017 soll eine wettbewerbliche Vergütung des erneuerbaren Stroms durch Ausschreibungen erfolgen. Dies betrifft Biogasanlagen mit einer installierten Leistung von mehr als 150 kW (BMWi, 2016b).

Im Jahr 2014 gab es insgesamt 8.726 Biogasanlagen in Deutschland (FvB, 2015). Das mikrobiell produzierte Biogas besteht im Wesentlichen aus Methan und Kohlenstoffdioxid. In den meisten Fällen wird das produzierte Biogas nach Verstromung ins Stromnetz eingespeist, wobei die bei der Verbrennung entstehende Abwärme ebenfalls energetisch genutzt werden kann. Eine weitere Nutzungsform ist die Einspeisung des Biomethans ins Erdgasnetz nach vorangegangener Aufreinigung (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

Die erneuerbaren Energien setzen sich aus Windenergie, Photovoltaik, Wasserenergie, Geothermie und Energie aus Biomasse zusammen. In den aktuellen statistischen Erhebungen des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technik (BMWi) werden Biogas, Biomethan, Deponiegas, Klärgas, biogene Festbrennstoffe und der biogene Anteil des Abfalls zu den energieliefernden Biomassen gezählt (Abb. 1. 1). Der Anteil der erneuerbaren Energien am Bruttostromverbrauch in Deutschland konnte seit dem Jahre 2000 von ca. 6 % bis zum Jahr 2014 auf mehr als 27 % gesteigert werden (BMWi, 2015c). Ziel ist die Steigerung der erneuerbaren Energien am Stromverbrauch bis zum Jahr 2025 auf 40 bis 45 % (BMWi, 2015d).

Bei Betrachtung der Stromerzeugung und des Wärmeverbrauchs aus erneuerbaren Energien in Deutschland für das Jahr 2015, besitzt Biogas und Biomethan den größten Anteil an der Stromerzeugung aus Biomasse mit 15,4 %. Beim Wärmeverbrauch wurden 10,3 %

aus Biogas und Biomethan bezogen (Abb. 1. 1). Bis zum Jahr 2020 sollen 14 % der Wärme aus erneuerbaren Energien gewonnen werden (BMWi, 2015d).

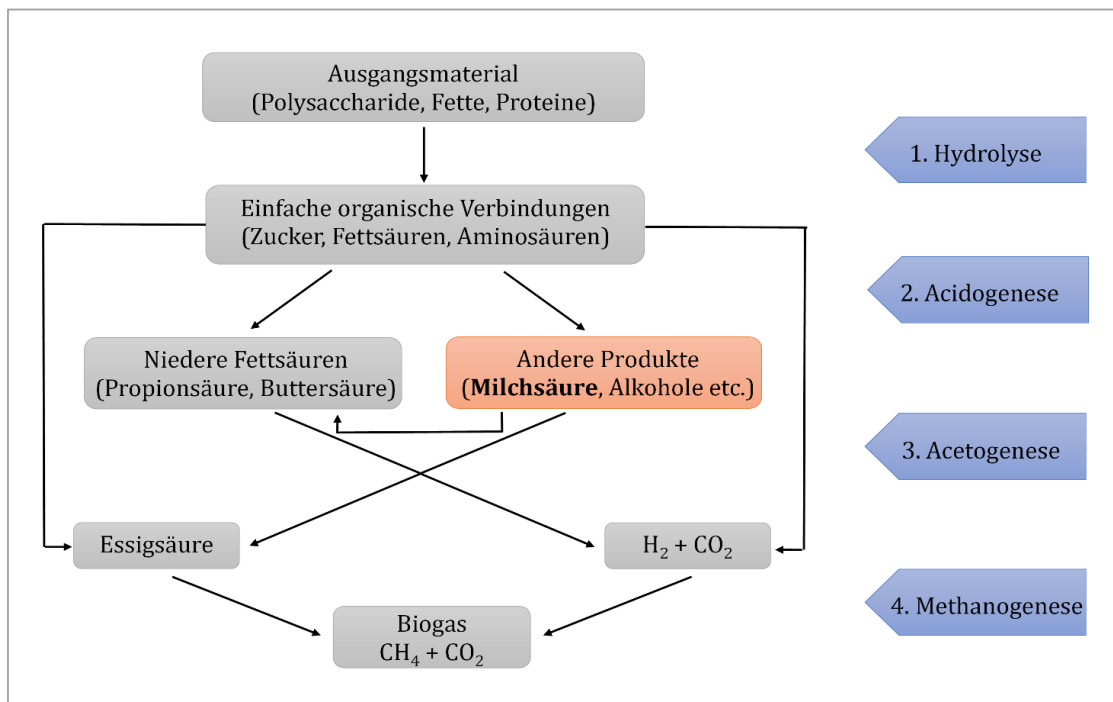


**Abb. 1. 1: Anteil verschiedener Energieträger an der Energiegewinnung aus erneuerbaren Energien im Jahr 2015.** (a) Stromerzeugung. \* inkl. Biomethan, \*\* inkl. Klärschlamm. (b) Wärmeverbrauch. \* inkl. Biodieselvebrauch in der Landwirtschaft, \*\* inkl. Klärschlamm, \*\*\* GHD = Gewerbe, Handel, Dienstleistungen, \*\*\*\* Biogas inkl. Biomethan. Verändert nach BMWi (2016e).

Die Gewinnung von erneuerbarer Energie aus Biogasanlagen ist somit ein wichtiger Bestandteil der Energiewende. Die mikrobielle Bildung von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

## 1.2 Mikrobielle Prozesse in Biogasanlagen

Der anaerobe Abbau in Biogasanlagen erfolgt durch die Aktivität von Mikroorganismen. Dabei wird der Abbau von Biomasse, wobei es sich hauptsächlich um Pflanzenmaterial, Gülle oder Mist von Rindern, Schweinen etc. handelt, in vier Phasen unterteilt (Abb. 1. 2). Die Prozesse dieser vier Phasen laufen zwar zeitgleich ab, jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (Schieder et al., 2010). Eine Studie von Krause et al. (2008) deutete darauf hin, dass der überwiegende Anteil an Organismen in Biogasanlagen unbekannt ist. Es gibt Hinweise, dass die Methanproduktion vorwiegend über den hydrogenotrophen Stoffwechselweg mit Kohlenstoffdioxid als Elektronenakzeptor und Wasserstoff als Elektronendonator verläuft (Krause et al., 2008).



**Abb. 1. 2: Schema des anaeroben Abbaus von nachwachsenden Rohstoffen durch Mikroorganismen in Biogasanlagen.** Die Umsetzung des Ausgangsmaterials in Biogas erfolgt in vier aufeinanderfolgenden Abbaustufen Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese.

### 1.2.1 Hydrolyse

In der ersten Abbaustufe, der Hydrolyse, werden komplexe unlösliche Substrate in einfachere organische Verbindungen gespalten. An diesem Prozess sind zahlreiche Mikroorganismen beteiligt, die sich meist zunächst auf der Oberfläche der abzubauenen Partikeln ansiedeln und anschließend durch den Einsatz von hydrolytischen Enzymen die polymeren Verbindungen zerlegen (Vavilin et al., 1996). Hydrolytische Enzyme sind z. B. Cellulasen, Cellobiasen, Xylanasen, Xylosidasen, Amylasen, Lipasen und Proteasen (Shallom & Shoham, 2003; Taherzadeh & Karimi, 2008; Weiland, 2010). Die produzierten Mono- und Oligomere können anschließend von den hydrolytischen Bakterien selbst oder von anderen Bakterien genutzt werden (Merlin Christy et al., 2014). Folgende Bakteriengattungen werden mit der Fermentation von organischem Material assoziiert: Z. B. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Selenomonas* oder *Streptococcus* (Weiland et al., 2010; Merlin Christy et al., 2014). Krause et al. (2008) konnten zeigen, dass an der Hydrolyse von Polysacchariden und Oligosacchariden hauptsächlich die Ordnungen Clostridiales, Bacteroidales und Bacillales beteiligt sind. Auch Li et al. (2013) wiesen einerseits eine Verbindung zwischen Clostridiales und dem Abbau von Proteinen und Cellulose nach und konnten andererseits einen Zusammenhang zwischen der Degradation von Lipiden und Kohlenhydraten durch Bacilli, Gammaproteobakterien und Bacteroidetes belegen. Eine Studie von Noike et al. (1985) zeigte, dass bei der Verwendung von cellulosehaltigem Material als Hauptsubstrat die Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der anaeroben Abbaukette ist.

### 1.2.2 Acidogenese

In der Acidogenese werden die einfachen Zucker, Aminosäuren oder Fettsäuren, die in der Hydrolysestufe entstehen, zu niederen Fettsäuren (z. B. Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure oder Valeriansäure), anderen organischen Säuren (z. B. Milchsäure, Ameisensäure oder Bernsteinsäure), Alkohole (z. B. Ethanol) oder Ketone (Acetoin oder Diacetyl) umgesetzt (Schieder et al., 2010). Die Hydrolyse und die Acidogenese sind meist nicht eindeutig voneinander zu trennen, da viele hydrolytische Bakterien aus den depolymerisierten Verbindungen Säuren als Stoffwechselprodukte bilden und demnach gleichzeitig auch zu den acidogenen Bakterien zählen (Bauer et al., 2009). Beim Abbau von Aminosäuren kann es zur Bildung von Ammoniak und Schwefelwasserstoff kommen, welche in höheren Konzentrationen, toxisch auf die beteiligten Mikroorganismen wirken und somit den Abbauprozess negativ beeinflussen. Im Biogas sollten die Konzentrationen von jeweils

2 % an Schwefelwasserstoff und Ammoniak nicht überschritten werden (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Bei zahlreichen mikrobiellen Stoffwechselprozessen werden die Gase Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet. Dadurch entstehen auch im Rahmen der Acidogenese bereits die methanogenen Substrate Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff für die letzte Stufe des anaeroben Abbaus. Acidogene Bakterien gehören z. B. den Gattungen *Bacillus*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* oder *Streptococcus* an (Bauer et al., 2009; Wirth et al., 2012; Merlin Christy et al., 2014). Die Acidogenese ist der schnellste Schritt der anaeroben Abbaukette (Vavilin et al., 1996). Aus diesem Grund kann es, besonders bei hoher Raumbelastung, zur Anhäufung von Säuren kommen. Insbesondere niedere Fettsäuren können dann zu einer Störung der mikrobiellen Aktivität und damit der Methanbildung führen. Sie dienen daher auch als Indikatoren bei der Versäuerung des Fermenterinhalt (Kaiser et al., 2008; Wang et al., 2009).

### 1.2.3 Acetogenese

In der dritten Abbaustufe, der Acetogenese, werden die methanogenen Substrate Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff aus niederen Säuren und Alkoholen gebildet. Die beteiligten syntrophen Bakterien sind strikt anaerob und meist durch ein langsames Wachstum gekennzeichnet. Die Reaktionen des Fettsäureabbaus sind endergon. Allerdings ermöglicht die exergone Nutzung des Wasserstoffs und der Essigsäure durch die räumlich eng assoziierten methanogenen Archaeen eine Entfernung dieser Produkte aus dem Gleichgewicht, sodass insgesamt ein geringer Energiegewinn erzielt werden kann. Zusätzlich kann bei steigender Wasserstoffkonzentration eine Endprodukthemmung auftreten und die Stoffwechselaktivität der syntrophen Bakterien zum Erliegen kommen. Da die Übertragung der Elektronen (z. B. in Form von Wasserstoff) zwischen zwei sehr unterschiedlichen Mikroorganismen stattfindet, wird der Vorgang auch als „Inter-Spezies-Elektronentransfer“ bezeichnet. Syntrophe Bakterien sind z. B. Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Propionibacter*, *Pelotomaculum*, *Pelobacter*, *Sporotomaculum*, *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophospora*, *Syntrophus* oder *Thermoanaerobium* (Scheifinger et al., 1975; Cord-Ruwisch et al., 1988; Bauer et al., 2009). Wasserstoff kann von sulfatreduzierenden, homoacetogenen und methanogenen Bakterien unter anaeroben Bedingungen verwertet werden. Pankhania et al. (1988) beschreiben für das sulfatreduzierende Bakterium *Desulfovibrio vulgaris* den Abbau von Milchsäure unter Bildung von Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff in Abwesenheit von

Sulfat. Für *Syntrophobacter pfennigii* konnte ein Propionsäure- und Milchsäureabbau mit Sulfat als Elektronenakzeptor nachgewiesen werden (Wallrabenstein et al., 1995). Homoacetogene Bakterien, wie z. B. *Clostridium ultunense* oder *Morella thermoacetica*, können über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff Essigsäure bilden (Schnürer et al., 1996, Wirth et al., 2012).

### 1.2.4 Methanogenese

In der letzten Abbaustufe, der Methanogenese, wird schließlich das Biogas gebildet. Dieses besteht im Wesentlichen aus Methan und Kohlenstoffdioxid. Die Biogasbildung erfolgt durch methanogene Archaeen und ist bei pH-Werten zwischen 6,8 und 7,5 am größten. Die physiologische Unterteilung der methanogenen Archaeen erfolgt in Abhängigkeit ihres zugrundeliegenden Stoffwechsels. Die sogenannten Hydrogenotrophen reduzieren Kohlenstoffdioxid mit Wasserstoff unter Bildung von Methan und Wasser. Hierzu zählen Arten der Gattung *Methanoculleus* oder *Methanobacterium*. Die acetoklastische Archaeen, z. B. Vertreter der Gattung *Methanosaeta*, bauen Essigsäure zu Methan und Kohlenstoffdioxid ab (Bauer et al., 2009; Stantscheff et al., 2014). Die Methanogenese kann bei Verwendung von leicht abbaubaren Inputstoffen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden (Noike et al., 1985).

An den verschiedenen Stufen der anaeroben Abbaukette in Biogasanlagen sind diverse Mikroorganismen beteiligt, deren Stoffwechselleistungen in ihrer Gesamtheit zur Bildung von Biogas führen.

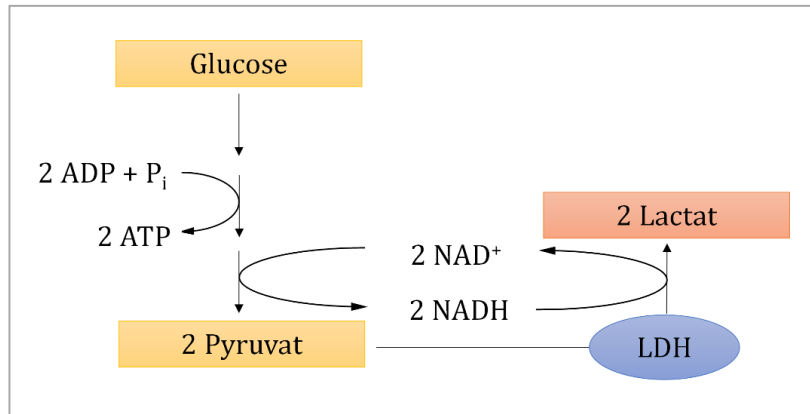
### 1.3 Milchsäurebildung durch Bakterien

Unter dem Begriff Milchsäurebakterien im engeren Sinne werden Bakterien zusammengefasst, die verschiedene Kohlenhydrate zu Milchsäure als Hauptprodukt fermentieren. Milchsäurebakterien (Lactobacillales, Bifidobakterien) sind fast ubiquitär in kohlenhydratreichen Biotopen verbreitet und können durch die Bildung hoher Milchsäurekonzentrationen den pH-Wert in ihrer unmittelbaren Umgebung rasch herabsetzen. Durch ihre hohe Säuretoleranz (bis pH 3-4) können sie sich gegenüber anderen Bakterien, mit denen sie um die Kohlenhydrate konkurrieren, durchsetzen. Für die Anzucht von Milchsäurebakterien muss bedacht werden, dass diese im Vergleich zu anderen freilebenden Mikroorganismen nicht in reinem Mineralsalzmedium mit Glucose oder anderen Kohlenhydraten als Energiequelle wachsen. Grund hierfür ist der hohe Supplementbedarf, der vermutlich das Resultat einer Anpassung über die Zeit an die nährstoff- und vitaminreichen

Standorte (z. B. Milchprodukte, Früchte, Abwasser, Mensch und Tier, Pflanzenmaterial) ist. Für die Anreicherung werden daher komplexe Nährmedien verwendet. Fast alle Milchsäurebakterien sind obligate Gärer, aerotolerant, grampositiv, Katalase negativ und besitzen stäbchen- oder kokkenförmige Zellen. Die meisten Milchsäurebakterien gehören zur Ordnung der Lactobacillales. Diese beinhaltet neben stäbchenförmigen *Lactobacillus*-Arten auch kokkenförmige Vertreter, wie z. B. die Gattungen *Pediococcus*, *Streptococcus* oder *Enterococcus*. Milchsäurebakterien werden anhand ihrer Stoffwechselwege in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: Obligat homofermentative Milchsäurebakterien, wie z. B. *Lb. mali* oder *Lb. crispatus*, fermentieren in der Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg) Hexosen fast ausschließlich zu Milchsäure (> 90 %). Pentosen können nicht abgebaut werden. Fakultativ heterofermentative Milchsäurebakterien bauen Hexosen über die Glykolyse und Pentosen über den Phosphoketolaseweg ab. Sowohl das Schlüsselenzym der Glykolyse, die Aldolase, als auch das Schlüsselenzym des Phosphoketolaseweges, die Phosphoketolase, können von Vertretern dieser Gruppe, z. B. *Lb. zae* oder *Lb. pentosus*, gebildet werden. Die obligat heterofermentativen Milchsäurebakterien, z. B. *Lb. diolivorans* oder *Lb. frumenti*, bauen Hexosen und Pentosen über den Phosphoketolaseweg ab, wobei Milchsäure, Essigsäure, Ethanol und Kohlenstoffdioxid entstehen können (Felis & Dellaglio, 2007; König & Fröhlich, 2009; Vos et al., 2009).

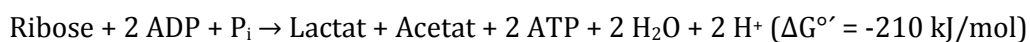
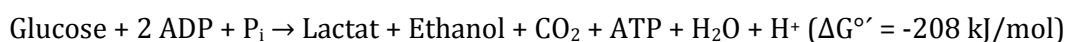
Bei der homofermentativen Vergärung wird Glucose über die Glykolyse zu Pyruvat oxidiert. Dabei entsteht NADH beim Reaktionsschritt des Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase. Dieses wird anschließend durch die Reduktion von Pyruvat zu Lactat reoxidiert, sodass es wieder für weitere Stoffwechselreaktionen zur Verfügung steht. Aus Hexosen werden bei der homofermentativen Vergärung zwei Mol Lactat und zwei Mol ATP gewonnen (Abb. 1. 3).

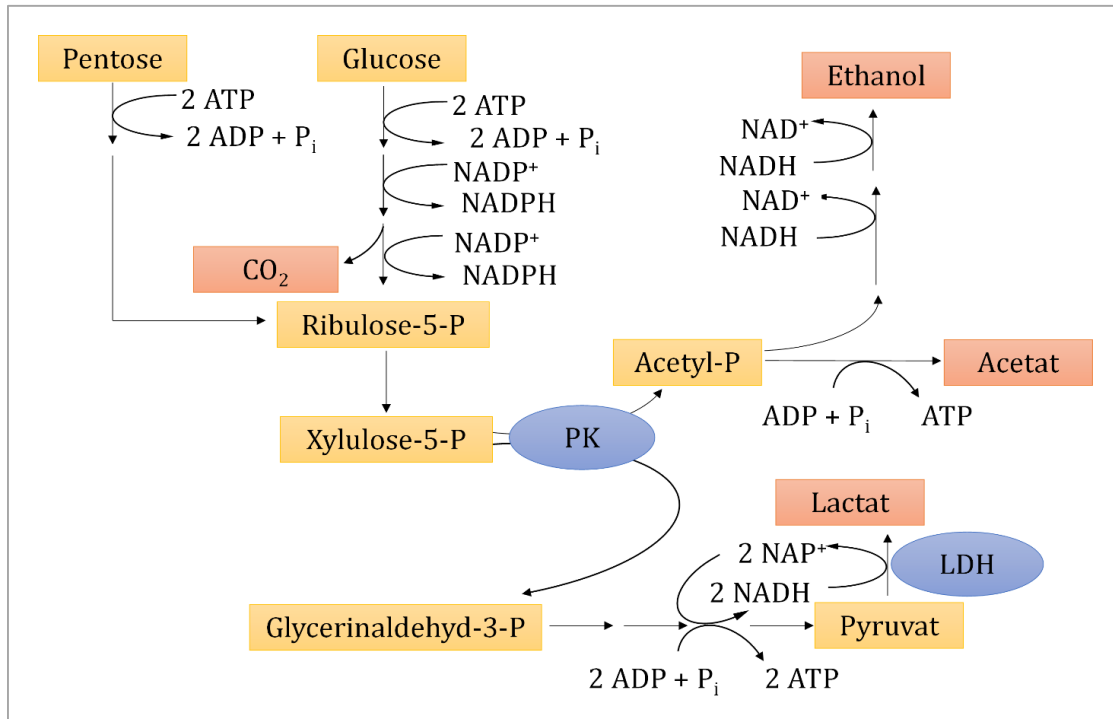




**Abb. 1. 3: Homofermentative Milchsäurebildung.** Durch die Oxidation von Glucose entstehen zwei Moleküle Pyruvat, die zu zwei Mol Lactat reduziert werden. Die Ausgangs- und Zwischenstoffe sind gelb unterlegt, die Produkte rot und das Schlüsselenzym blau. LDH = Lactatdehydrogenase.

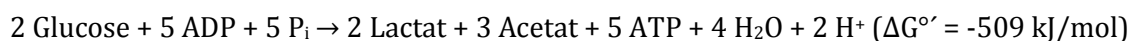
Bei der heterofermentativen Milchsäuregärung werden die Kohlenhydrate nicht über die Glykolyse abgebaut, da die Schlüsselenzyme Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase und Triosephosphat-Isomerase fehlen. Die Vergärung von Pentosen erfolgt über Xylulose-5-Phosphat, das mit dem Schlüsselenzym Phosphoketolase und Phosphat zu Acetylphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat gespalten wird. Während das Acetylphosphat durch die Acetatkinase unter ATP-Bildung zu Acetat umgesetzt wird, erfolgt die Oxidation des Glycerinaldehyd-3-Phosphats zu Pyruvat in der Glykolyse. Pyruvat wird anschließend analog zum Stoffwechselweg der homofermentativen Milchsäuregärung zu Lactat reduziert. Dadurch entstehen in der Gärungsbilanz pro Pentose jeweils ein Molekül Lactat und Acetat und zwei Mol ATP. Im Vergleich dazu werden Hexosen zunächst zu Ribulose-5-phosphat und Kohlenstoffdioxid unter Bildung von zwei NADPH oxidiert, bevor Ribulose-5-phosphat weiter zu Xylulose-5-Phosphat isomerisiert wird. Im Vergleich zum Pentoseabbau wird das Acetylphosphat in der Regel zu Ethanol reduziert, damit die zwei gebildeten Reduktionsäquivalente NADPH reoxidiert werden (Abb. 1. 4). Bei einem Mangel an Pantothen säure kann jedoch auch bei diesem Stoffwechselweg eine Bildung von Acetat erfolgen (Richter et al., 2001). Somit wird auf diesem Wege pro Hexose jeweils ein Molekül Lactat, Ethanol, Kohlenstoffdioxid und ein ATP gebildet (Fuchs, 2007).





**Abb. 1. 4: Heterofermentative Milchsäurebildung.** Pentosen und Hexosen werden zu Pyruvat oder Acetylphosphat oxidiert, bevor diese weiter reduziert werden. Pro Hexose wird jeweils ein Molekül Lactat, Ethanol, Kohlenstoffdioxid und ein ATP gebildet. Pro Pentose wird jeweils ein Molekül Lactat, Acetat und zwei ATP gewonnen. Die Ausgangs- und Zwischenstoffe sind gelb unterlegt, die Produkte rot und die Schlüsselenzyme blau. PK = Phosphoketolase; LDH = Lactatdehydrogenase.

Bifidobakterien gehören auch zu den Milchsäurebakterien, nehmen jedoch eine Sonderstellung ein. Zum einen unterscheiden sie sich phylogenetisch von den anderen Milchsäurebakterien, da sie durch ihren hohen GC-Gehalt der DNA zum anderen Ast der grampositiven Bakterien, den Actinobakterien, gezählt werden. Zum anderen gibt es einige Unterschiede im Stoffwechsel, da Bifidobakterien strikt anaerob sind und weder das Enzym Aldolase noch eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase besitzen. Infolgedessen besitzen sie einen eigenen Gärungstyp mit Lactat und Acetat als Endprodukte.



Abgesehen von den Milchsäurebakterien gibt es zahlreiche andere Bakterien, die Milchsäure als Nebenprodukt bilden können. Diese werden jedoch nicht zu den Milchsäurebakterien im engeren Sinne gezählt. Viele fakultativ anaeroben Enterobacteriaceae und *Bacillus*-Arten können Milchsäure im Rahmen der gemischten Säurebildung bilden. Hierbei können verschiedene Gärprodukte gebildet werden, deren Zusammensetzung von der

Bakterienart, der Substrate und den umgebenden Bedingungen abhängig ist (Fuchs, 2007). Teilweise werden sogar *Bacillus*-Arten, wie z. B. *B. subtilis* oder *B. coagulans*, für die industrielle Produktion von Milchsäure eingesetzt (Payot et al., 1999; Gao et al., 2012). Weiterhin sind Vertreter der Gattung *Clostridium*, z. B. *C. cellulolyticum* oder *C. thermocellum*, dazu befähigt, Milchsäure als Nebenprodukt zu bilden (Petitdemange et al., 1984; Levin et al., 2006). Auch für das strikt anaerobe Bakterium *Bacteroides fragilis* wurde Milchsäurebildung beschrieben (Mayhew et al., 1975). Weitere Gattungen, die milchsäurebildende Arten beinhalten, sind unter anderem *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* oder *Escherichia* (Smith et al., 1986). Milchsäure wird auch in diesen Stoffwechselabläufen, wie bei der Milchsäuregärung, durch Reduktion von Pyruvat durch Lactatdehydrogenase gebildet. Die Stereospezifität der Lactatdehydrogenase bestimmt die Bildung von L- oder D-Milchsäure. Manche Organismen besitzen zusätzlich das Enzym Lactatracemase, welche die Umwandlung eines Stereoisomers in die jeweils andere Form katalysiert. Im Hinblick auf Biogasanlagen ist die Milchsäurebildung bereits beim Silierungsprozess der nachwachsenden Rohstoffe entscheidend.

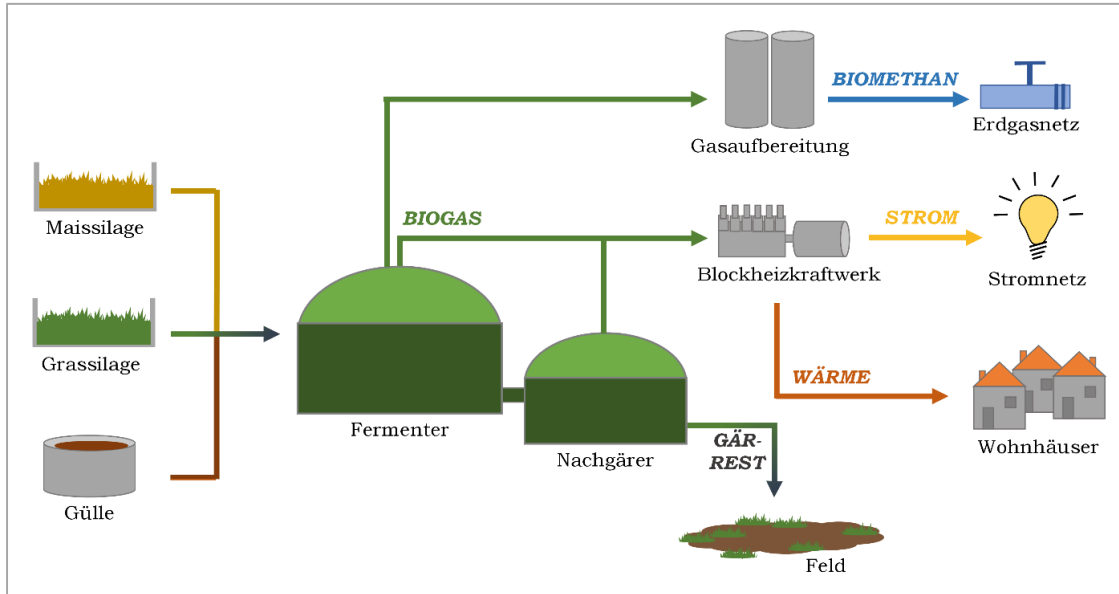
### **1.4 Silierungsprozess durch Milchsäurebakterien**

Der Silierungsprozess dient der Haltbarmachung von frischem Pflanzenmaterial, wie z. B. Mais, Gras, Zuckerrüben oder Getreide. Wasserlösliche Kohlenhydrate des Pflanzenmaterials werden dabei von Milchsäurebakterien in organische Säuren, hauptsächlich Milchsäure, unter anaeroben Bedingungen umgesetzt. Infolgedessen kommt es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes in dem zu silierenden Material und unerwünschte Mikroorganismen, welche die Silage verderben könnten, werden gehemmt. Zunächst wird das frische Pflanzenmaterial gehäckselt und in ein Silo gefüllt. Anschließend erfolgt eine Verdichtung des Materials, um sauerstoffgefüllte Zwischenräume zu minimieren. Der Silierungsprozess kann in vier verschiedene Phasen unterteilt werden. Die erste Phase, auch aerobe Phase genannt, dauert in der Regel nur wenige Stunden. Das Pflanzenmaterial weist einen pH-Wert von 6,0 bis 6,5 auf und zwischen den Pflanzenpartikeln befindet sich noch Restsauerstoff. Dieser wird durch die Atmung der Pflanzenzellen sowie durch die Aktivität von aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen, wie z. B. Hefen, Pilzen und Enterobakterien, entfernt. Die zweite Phase, die Fermentationsphase, tritt nach einigen Tagen bis Wochen ein, wenn der Sauerstoff aufgebraucht ist und die Silage anaerob wird. Milchsäurebakterien vermehren sich zunehmend und werden zur dominanten Population. Durch die Bildung von Milchsäure und anderen Säuren wird der pH-Wert auf

3,8 bis 5,0 verringert. Zu diesem Zeitpunkt geht die Silage in die dritte Phase, der stabilen Phase, über. Bei Ausschluss von Sauerstoff finden keine wesentlichen Stoffwechselaktivitäten mehr statt. Die Zellen der meisten Mikroorganismen haben sich verringert, befinden sich in einem inaktiven Zustand oder überleben als Sporen. Die letzte und vierte Phase beginnt, wenn die Silage ausgeladen wird und erneut Sauerstoff ausgesetzt ist. Es besteht die Gefahr, dass aerobe Mikroorganismen reaktiviert werden und die Silage schädigen. Dabei werden zunächst organische Säuren von Hefen und Essigsäurebakterien abgebaut und eine Erhöhung des pH-Wertes bewirkt. Auch andere Mikroorganismen, wie z. B. Bazillen, Enterobakterien oder Pilze können an der Schädigung der Silage beteiligt sein und eine typische Nacherwärmung in der Silage verursachen (Weinberg & Muck, 1996; Oude Elferink et al., 2000). Die Silage nachwachsender Rohstoffe stellt den Haupt-Inputstoff für Biogasanlagen dar. Im Folgenden wird der Vorgang von der Substratfütterung der Biogasanlagen bis hin zur Nutzung des Biogases näher betrachtet.

### **1.5 Fließschema einer Biogasanlage**

Für eine effektive Biogasbildung ist die mikrobielle Biozönose entscheidend. Das Wachstum und die Aktivität der Bakterien wird im Wesentlichen durch den Sauerstoffausschluss, die Gärtemperatur, den pH-Wert, Nährstoffangebot, Durchmischungsintensität und Gehalt an Hemmstoffen bedingt (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Die genutzten Substrate, der Aufbau und Betrieb der Biogasanlage sind demnach ausschlaggebend für die Biogaserzeugung (Abb. 1. 5).



**Abb. 1. 5: Fließschema einer Biogasanlage.** Maissilage, Grassilage und Gülle sind meist die Haupt-Inputstoffe. Die Fermentation der Gärsubstrate findet im Fermenter und Nachgärer statt. Der Gärrest wird als Düngemittel im Pflanzenanbau eingesetzt. Biogas kann nach Aufreinigung ins Erdgasnetz oder Stromnetz eingespeist werden oder die bei der Verbrennung entstehende Wärme kann zur Beheizung von Gebäuden verwendet werden.

### 1.5.1 Substrate

In Biogasanlagen wird überwiegend eine Kombination aus nachwachsenden Rohstoffen und Wirtschaftsdünger gemeinsam vergoren. Die Biogaserträge können aufgrund von natürlichen Schwankungen hinsichtlich Trockenmasse und Inhaltsstoffen der verwendeten Substrate z. T. erhebliche Unterschiede aufweisen. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass eine möglichst geringe Variation in der Substratbeschaffenheit vorliegt, um die Mikroorganismen nicht ständig neuen Milieubedingungen auszusetzen.

Nachwachsende Rohstoffe werden meist in Form von Mais- oder Grassilage eingesetzt. Ferner wird z. B. auch Ganzpflanzensilage, Rübensilage oder Getreideschrot genutzt. Grassilage besitzt durchschnittlich einen höheren Anteil an Proteinen, Cellulose und Lignin als Maissilage. Im Vergleich dazu ist der Hemicelluloseanteil in der Maissilage meist höher (Lebhuhn et al., 2014). Durch den hohen Gehalt an Rohprotein in der Grassilage besteht die Gefahr einer zu starken Erhöhung des Ammoniak/Ammoniumgehaltes im Gärsubstrat. Da Ammoniak und Ammonium in wässriger Lösung im Gleichgewicht stehen, kann Ammoniak in die Zellen der Mikroorganismen diffundieren und die ATP-Synthese beeinträchtigen (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007; Bauer et al., 2009).

Aus dem Gebiet flüssiger Wirtschaftsdünger wird hauptsächlich Gülle als Stickstoffquelle verwendet. Es werden vor allem Rindergülle und Schweinegülle als Inputstoffe eingesetzt. Bei Gülle handelt es sich um ein dünnflüssiges, energiearmes Substrat, da es hauptsächlich aus Wasser und Feststoffen besteht, die aus dem Futter stammen, vom Tier nicht verwertet werden können und daher ausgeschieden werden (Linke & Vollmer, 2002). Die Methan- ausbeute kann dabei je nach Tierart und Fütterung große Schwankungen aufweisen. Der spezifische Methanertrag gibt an, wieviel Normliter ( $l_N$ ) Methan je Kilogramm organischer Trockensubstanz (oTS) gewonnen wird (Mukengele & Oechsner, 2007). Dabei nimmt der spezifische Methanertrag von Rindergülle (345  $l_N$ /kg oTS) über Schweinegülle (447  $l_N$ /kg oTS) und Grassilage (627  $l_N$ /kg oTS) bis hin zu Maissilage (642  $l_N$ /kg oTS) zu. Da Mais- (ca. 31 % oTS) und Grassilage (ca. 25 % oTS) im Vergleich zu Rinder- (ca. 7 % oTS) und Schweinegülle (ca. 3 % oTS) jedoch einen höheren Anteil an organischer Trockensubstanz aufweisen, kann aus Mais- oder Grassilage mindestens das Fünffache an Methan pro Tonne Frischmasse gewonnen werden (Schwab & Reinhold, 2006).

Die Zusammensetzung der Substrate einer Biogasanlage bestimmt maßgeblich die ablaufenden Stoffwechselprozesse der Mikroorganismen und somit die gebildeten Reaktionsprodukte. Proteinreiche Substrate, wie z. B. Klee gras, Grassilage oder Getreide, können vornehmlich durch proteolytische und glycolytische Enzyme abgebaut werden. Infolgedessen kann der Abbau von Aminosäuren zu erhöhten Konzentrationen an Ammoniak und Schwefelwasserstoff führen und eine toxische Wirkung auf Mikroorganismen haben. Substrate, wie z. B. Sonnenblumen oder Raps, sind reich an Fetten. Diese werden während der Hydrolyse durch Lipasen in energiereiche langkettige Fettsäuren und Glycerin zerlegt, wobei die Fettsäuren im Zuge der  $\beta$ -Oxidation in kurzkettigere Fettsäuren, wie z. B. Essigsäure, abgebaut werden. Kohlenhydratreiche Verbindungen sind vor allem in Form von Cellulose, Hemicellulose und Stärke in Biogasanlagen vorhanden. Diese werden z. B. durch Maissilage oder Rübensilage in den Fermenter eingebracht (Schieder et al., 2010).

Das Gerüst der Zellwand höherer Pflanzen besteht aus Cellulose. Der Anteil an Cellulose in Primärwänden liegt bei etwa 10 % und in Sekundärwänden bei ca. 90 % (Weiler & Nover, 2008). Es handelt sich um ein lineares  $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpftes Polymer aus 2000 bis über 15000 Glucoseeinheiten, die entlang der Molekülachse um  $180^\circ$  gegeneinander verdreht sind (Bresinsky et al., 2008). Exo- und Endocellulasen lösen die  $\beta$ -glykosidische Bindungen der Cellulose und bauen die Cellulosemoleküle zu Glucose, Cellobiose und Oligosaccharide ab, wobei die Cellobiose durch Cellobiasen in Glucose überführt werden kann (Jeoh et al.,

2006; Weiler & Nover, 2008). Hemicellulosen sind Hauptbestandteil der Grundsubstanz von primären Zellwänden. Es handelt sich meist um  $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpfte Glucanketten, die wiederum über eine  $\alpha(1\rightarrow6)$ -glycosidische Verknüpfung Xylosereste tragen. Die Hemicellulosen bestehen aus vielfältig verzweigten Polysacchariden, die aus Hexosen, wie D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose und D-Fucose, und Pentosen, wie D-Xylose und L-Arabinose, aufgebaut sind (Heldt & Piechulla, 2008). Die bedeutendste Hemicellulose ist Xylan. Die Speicherung von Kohlenhydraten erfolgt in den meisten Kulturpflanzen (z. B. Mais, Getreide, Zuckerrübe) in Form von Stärke. Dabei handelt es sich in erster Linie um  $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpfte Glucosemoleküle, die durch weitere Glucoseketten  $\alpha(1\rightarrow6)$ -glycosidisch verzweigt sein können (Heldt & Piechulla, 2008). Zur Unterstützung des Abbaus der polymeren Ausgangsverbindungen in Biogasanlagen existieren verschiedene Fermentertypen und Strategien bezüglich des Fermenterbetriebs.

### 1.5.2 Fermenter

In dieser Arbeit wurden überwiegend zweistufige landwirtschaftliche Biogasanlagen (BGA Gebel, BGA Glahn, BGA Lieser, BGA Neumann; vgl. Abschnitt 2.2.2) mit einem Fermenter und einem Nachgärer beprobt. Die BGA Neumann wies die Besonderheit eines vorgeschalteten Hydrolysefermenters auf, in dem nur die erste Phase des anaeroben Abbaus abläuft. Der niedrige pH-Wert von 3,5 bis 4,5 unterstützt in solchen Hydrolysefermentern die Aktivität der hydrolytischen Bakterien, ohne die Bakterien der anderen Abbaustufen negativ zu beeinflussen (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007). Die BGA Friedrich bestand aus zwei Hochfermentern aus Edelstahl mit einem Zentralrührwerk, das sich besonders bei der Vergärung von Substraten mit hohen TS-Gehalten eignet, da eine Sedimentablagerung und Bildung von Schwimmschichten verhindert wird. Der hohe TS-Gehalt der BGA Friedrich wurde durch den hohen Einsatz von Maissilage und dem Verzicht von Gülle erzeugt. Bei den Fermentern der übrigen Biogasanlagen handelte es sich um sogenannte stehende Fermenter, die aus Edelstahl oder Beton bestanden und einen runden Querschnitt mit einem Volumen von etwa 1000 bis 1400 m<sup>3</sup> Speicherraum aufwiesen. Um den Kontakt zwischen Substrat und Bakterien zu verbessern und gleichzeitig eine Schichtenbildung zu vermeiden, ist auch bei dieser Bauweise eine Durchmischung des Fermenters notwendig. Diese erfolgte durch Langachsrührwerke oder Tauchmotorrührwerke. Allerdings sollte eine zu starke Durchmischung vermieden werden, da sonst die symbiontisch lebenden acetogenen und methanogenen Bakterien voneinan-

der getrennt werden könnten und folglich der anaerobe Abbauprozess beeinträchtigt werden würde (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

In der Regel wurde bei den beprobten Biogasanlagen (BGA Gebel, BGA Glahn, BGA Lieser, BGA Neumann) die Gülle durch spezielle Rohrsysteme und Pumpen aus einer Vorgrube oder Güllefass in den Fermenter gepumpt. Die Maissilage und sonstige feste Substrate wurden über den Feststoffdosierer, welcher aus einem Vorlagebehälter mit Wägeeinrichtung und einer Förderschnecke bestand, dem Fermenter zugeführt. Die sogenannte Substratfütterung erfolgte üblicherweise einmal pro Stunde. Auch das Fördersystem betreffend besaß die BGA Friedrich eine Besonderheit. Statt eines Feststoffdosierers wurde mit Hilfe eines Schubbodensystems eine bestimmte Menge Maissilage aus einer Vorlage in eine Grube geschoben. Da bei dieser Biogasanlage keine Gülle eingesetzt wurde, erfolgte in dieser Grube zunächst die Vermischung der Maissilage mit flüssigem Gärsubstrat aus dem Fermenter, bevor das Gemisch in den Fermenter gepumpt werden konnte (pers. Mitteilung, Hr. Dr. Dröge).

Im Hinblick auf die Zufuhr und Verweilzeit der Substrate im Fermenter sind zwei Parameter ausschlaggebend. Die Raumbelastung und die hydraulische Verweilzeit. Die Raumbelastung gibt an, wieviel organische Trockensubstanz dem Fermenter je Nutzungsvolumen und Zeiteinheit zugeführt wird. Eine zu hohe Raumbelastung kann zur Versäuerung des Fermenterinhalt führen, da sich Säuren durch das rasche Wachstum hydrolytischer und acidogener Bakterien anhäufen. Infolgedessen erniedrigt sich der pH-Wert und die acetogenen und methanogenen Bakterien werden gehemmt (Bauer et al., 2009). Unter hydraulischer Verweilzeit versteht man die durchschnittliche theoretische Aufenthaltszeit des Substrats im Fermenter. Die Verweilzeit richtet sich nach der spezifischen Abbaugeschwindigkeit der verwendeten Substrate. Generell führt eine längere Verweilzeit zu höheren Abbauraten und einer höheren Gasproduktion (Kaiser et al., 2008). Im Fermenter wird der größte Anteil an Biogas durch Vergärung der frischen Substrate produziert. Um die Gasproduktionsrate kontinuierlich hochzuhalten, ist eine kontinuierliche Zufütterung mit Substrat notwendig. Hierdurch ergeben sich kürzere Verweilzeiten, sodass das Gärmaterial nicht vollständig vergoren in den Nachgärer überführt wird. Dort wird der Abbauprozess fortgesetzt, um eine vollständige Ausnutzung des Energiepotentials des Gärmaterials und damit zusätzliche Steigerung des Biogasertrags zu erreichen. Anschließend wird der Gärrest in ein entsprechendes Lager überführt und als Dünger für den Pflanzenanbau wiederverwendet (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

Biogasanlagen werden meist im mesophilen Bereich zwischen 38 °C und 42 °C betrieben, da der größte Anteil der am anaeroben Abbauprozess beteiligten Bakterien in diesem Bereich das Wachstumsoptimum besitzt (Kaiser et al., 2008). Einige wenige Biogasanlagen werden jedoch auch thermophil betrieben (50 – 57 °C). Generell erfolgt der Abbau von Gärsubstrat bei höheren Temperaturen schneller, wodurch die Verweilzeit im Fermenter entsprechend geringer ist. Allerdings ist die Vielfalt der Bakterien im thermophilen Bereich geringer und damit weniger stabil gegenüber Milieuveränderungen (Schieder et al., 2010).

### 1.5.3 Biogasnutzung

Das produzierte Biogas kann auf mehreren Wegen energetisch genutzt werden. Überwiegend wird das produzierte Gas durch ein Blockheizkraftwerk (BHKW) verstromt und ins Netz eingespeist. Zusätzlich wird durch das BHKW Wärme erzeugt, die zum geringen Anteil für die Aufrechterhaltung des Abbauprozesses und zum überwiegenden Anteil zur Wärmeversorgung von Wohnhäusern oder Ställen verwendet wird. Außerdem kann das Biogas ins Erdgasnetz eingeschleust werden. Davor ist allerdings eine entsprechende Aufbereitung notwendig, die eine Methananreicherung durch Kohlenstoffdioxidabtrennung und Entschwefelung beinhaltet (Bayer. Landesamt für Umwelt, 2007).

### 1.6 Milchsäure in Biogasanlagen und Forschungsstand

Milchsäure ist in Biogasanlagen ein Zwischenprodukt, das im Zuge der zweiten Abbaustufe, der Acidogenese, gebildet werden kann. Grundlegend kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung vornehmlich durch Milchsäurebakterien, wie z. B. Vertreter der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus* oder *Streptococcus*, erfolgt. Doch auch andere Bakterien, welche nicht zu den Milchsäurebakterien zählen, können Milchsäure als Stoffwechselnebenprodukt bilden. Hierzu zählen z. B. Vertreter der Gattung *Bacillus*, *Bacteroides* und *Clostridium*, welche bereits fast ausschließlich mit molekularen Methoden in zahlreichen Studien in Biogasanlagen nachgewiesen werden konnten (Krause et al., 2008; Schlüter et al., 2008; Bagge et al., 2010; Hanreich et al., 2013). Unter bestimmten Bedingungen ist Milchsäure ein wichtiger Vorläufer für weitere organische Säuren, wie z. B. Propionsäure oder Essigsäure. Bei einer Überschreitung bestimmter Konzentrationen (Propionsäure > 900 mg<sup>-l</sup>, Essigsäure > 3000 mg<sup>-l</sup>) konnte für diese Säuren eine Störung der mikrobiellen Aktivität und Methanbildung nachgewiesen werden (Kaiser et al., 2008;

Wang et al., 2009). In höheren Konzentrationen führt besonders Propionsäure zu einer Hemmung des gesamten Biogasprozesses und eignet sich daher als Indikator für eine Versäuerung des Fermenters (Nielsen et al., 2007). Eine hohe Akkumulation an Milchsäure in Biogasanlagen tritt nicht auf. Einerseits ist der Abbau von Milchsäure für die Organismen im Vergleich zu anderen Zwischenprodukten, wie z. B. Ethanol, Buttersäure oder Propionsäure, energetisch günstiger, andererseits sind zahlreiche Organismen einer biogasproduzierenden Gemeinschaft bekannt, welche Milchsäure verwerten können (Pipyn & Verstraete, 1981; Azbar et al., 2001). Cibis et al. (2016) konnten Bakterien der Gattungen *Clostridium*, *Defluviitoga*, *Dendrosporobacter*, *Desulfotomaculum* und *Tepidanaerobacter* aus Biogasanlagen isolieren, die in einem Mineralsalzmedium mit Milchsäure als einziger Kohlenstoffquelle Propionsäure und/oder Essigsäure bildeten. Dabei kann Milchsäure im Zuge des Methylmalonyl-CoA-Wegs oder des Acrylyl-CoA-Wegs in Propionsäure und Essigsäure umgesetzt werden (Seeliger et al., 2002).

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Hydrolyse und Methanogenese der anaeroben Abbaukette und den damit assoziierten Mikroorganismen (Cirne et al., 2007; Maus et al., 2013; Stantscheff et al., 2014; Zverlov et al., 2010). Auch Studien mit vertiefenden Untersuchungen der Acidogenese und Acetogenese sind bekannt (Ahlert et al., 2016; Cibis et al., 2016). Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es jedoch noch keine detaillierten Studien über milchsäurebildende Mikroorganismen in biogasproduzierenden Gemeinschaften. Lediglich Arten der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* wurden im Zusammenhang mit dem Silierungsprozess näher untersucht (Driehuis et al., 1999; Vervaeren et al., 2010; Eikmeyer et al., 2013).

### **1.7 Ziele der Arbeit**

Im Rahmen der Energiewende spielt die Gewinnung erneuerbarer Energien aus Biogasanlagen eine wichtige Rolle. Hierbei ist es notwendig, die mikrobiellen Vorgänge beim anaeroben Abbau im Detail zu kennen, um den Biogasprozess möglichst effizient gestalten zu können. Molekularbiologische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass zahlreiche Gensequenzen noch nicht zugeordnet werden konnten und es sich somit um noch unbekannte Mikroorganismen handelt (Krause et al., 2008). Der überwiegende Teil der Studien zum Nachweis von Mikroorganismen in Biogasanlagen basiert auf kulturunabhängigen Methoden, wie z. B. 454 Pyrosequenzierung oder SOLiD-Technologie (Wirth et al., 2012; Eikmeyer et al., 2013; Li et al., 2013). Dabei ist es jedoch nicht möglich, die Mikroorganismen näher zu untersuchen.

Aus diesem Grund bestand ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien aus verschiedenen mesophilen Biogasanlagen. Anschließend sollten stoffwechsel-physiologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, um die gewonnenen Isolate zu charakterisieren. Eine schnelle Identifizierung der Milchsäurebildner in Fermenterproben einer Biogasanlage sollte durch die Entwicklung eines qualitativen Nachweissystems erreicht werden. Neben der Bestimmung der Lebendkeimzahl milchsäurebildender Bakterien, sollte eine spezifische Quantifizierung der Isolate eine Einschätzung ihrer Rolle in der anaeroben Abbaukette ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Gase

Im Folgenden sind die Chemikalien und Gase aufgelistet, die in den Versuchen verwendet wurden:

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acetoin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar	Marcor, New Jersey, USA
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	Peqlab, Erlangen
p-Aminobenzoesäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Bernsteinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biotin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Buttersäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casein-Soja-Pepton-Medium	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Calciumpantothenat	Merck, Darmstadt
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure	Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Diacetyl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-Ammoniumhydrogencitrat	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst (99 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Folsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formiergas (95 % N <sub>2</sub> , 5 % H <sub>2</sub> [v/v])	Westfalen, Münster
D(-)-Fructose	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Haemin	Fluka Chemie, Buchs
Hefeextrakt	Marcor, New Jersey, USA
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kongorot	Fluka, Buchs
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Liponsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(+)-Lactat-Lithiumsalz	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
D(+)-Maltose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Malzextrakt	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Mangansulfat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumsulfid-Nonahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Nikotinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrilotriessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
Propionsäure	Roth, Karlsruhe
Pyridoxinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Resazurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Riboflavin	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Sojapepton	Roth, Karlsruhe
Stärke	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (100 % [v/v])	Westfalen, Münster
Stickstoff/Kohlenstoffdioxid Gasgemisch (80 % N <sub>2</sub> , 20 % CO <sub>2</sub> [v/v])	Westfalen, Münster
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tomatensaft	Eckes-Granini, Nieder-Olm
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Marcor, New Jersey, USA
Tween 80	Merck, Darmstadt
Vitamin B <sub>12</sub>	Roth, Karlsruhe
Vitamin K <sub>1</sub> (Phyllochinon)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylan (aus Buchenholz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinkchlorid	Roth, Karlsruhe

### 2.1.2 Biochemikalien, Enzyme und Kits

Die folgenden Biochemikalien und Enzyme fanden im Rahmen der Versuche Anwendung:

Biochemikalien und Enzyme	Hersteller
GeneRuler DNA Ladder Mix (0,5 µg/µl)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
dNTP-Mix: (40 mM)	Peqlab, Erlangen
Enhancer Solution P (5x)	Peqlab, Erlangen
Kanamycin (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM)	Peqlab, Erlangen
Oligonukleotide (100 µM)	Sigma-Aldrich, Steinheim Eurofins MWG Operon, Ebersberg
PCR-Puffer S (10x)	Peqlab, Erlangen
PCR-Puffer Y (10x)	Peqlab, Erlangen
PCR-Puffer <i>Pfu</i> mit MgCl <sub>2</sub> (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Wasser	Roth, Karlsruhe
Polymerasen:	
- <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	Peqlab, Erlangen
Restriktionsenzym und Puffer:	
- Lysozym (20 mg/ml)	Erbslöh, Geisenheim
- <i>EcoRI</i> (10 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- <i>EcoRI</i> Puffer mit BSA (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Im Folgenden sind die verwendeten Kits aufgelistet:

Kits	Hersteller
DNA-Isolierung:	
- DNeasy Blood and Tissue-Kit	Qiagen, Hilden
- GeneMatrix Stool DNA Purification Kit EURx	Roboklon, Berlin
Gel-Extraktions-Kit:	
- GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Klonierungskit:	
- TOPO TA Cloning Kit for Sequencing mit One Shot TOP10 Chemically Competent <i>Escherichia coli</i> cells	Invitrogen, Karlsruhe

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Stoffwechseluntersuchungen:	
- API 50 CH System	bioMérieux, Nürtingen
- API 20E System	bioMérieux, Nürtingen
Multiplex-Kit:	
- Qiagen Multiplex PCR Kit plus	Qiagen, Hilden
PCR-Aufreinigungskit:	
- GenElute™ PCR CleanUp Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup	Affymetrix, Santa Clara, USA
qPCR-Reaktionskit:	
- SsoAdvance™ Universal SYBR® green Supermix	Bio-Rad, Hercules, USA

### 2.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Folgende Geräte und Hilfsmittel wurden zur Durchführung der Versuche benötigt:

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Anaerobenzelt (Type B komplett)	Coy Laboratory Products, Michigan, USA
Autoklaven:	
- Tecnomara Typ FVS/1	Tecnomara, Fernwald
- Systec VE-40	Systec, Wetztenberg
- Certoclav Classic	CertoClav, Traun, Österreich
Brutschränke:	
- Köttermann (2736)	Köttermann, Uetze/Hänigsen
- Memmert (GTR 0214)	Memmert, Schwabach
Elektrophoresekammern:	
- Sub-Cell® Model 96	Bio-Rad, München
- Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
Exsikkator	Duran, Wertheim
Geldokumentationseinheit Biovision CN3000	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte mit Magnetrührer (RCT)	IKA®-Labortechnik, Staufen
HPLC:	
- Autoinjektor: SIL-10A	Shimadzu, Duisburg
- Controller: SCL-10AVP	Shimadzu, Duisburg
- HPLC-Säule: Aminex®HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm	Bio-Rad, München
- Pumpe: LC-10 ATVP	Shimadzu, Duisburg
- Refraktometer 156	Beckman, Krefeld
- Säulenofen: CTO-10A	Shimadzu, Duisburg

Gerät	Hersteller
- Vorsäule: Aminex®HPX-87H, 20 mm x 4,0 mm	Shimadzu, Duisburg
Mikroskope:	
- Phasenkontrastmikroskop: Laborlux11	Leitz, Wetzlar
- Phasenkontrastmikroskop: Zeiss Axiophot2	Zeiss, Oberkochen
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
Photometer BioPhotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Starlab, Hamburg
Reinstwasseranlage:	
- Milli-Q plus 185	Merck-Millipore, Darmstadt
- Millipore RiOS 30	Merck-Millipore, Darmstadt
Spannungsgerät: Power Source 300 V	VWR, Darmstadt
Thermocycler:	
- Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
- S1000™ Thermal Cycler (PCR)	Bio-Rad, München
- Thermocycler Realplex <sup>2</sup> egradient S Mastercycler (qPCR)	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator FLX-20M	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Vakuumpumpe Trivac D 4B	Leybold Vacuum, Köln
Laborschüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen:	
- Analytic A120S	Sartorius, Göttingen
- Laboratory L610	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
- Avanti J-E	Beckman Coulter, Krefeld
- Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
- Centrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg
- Cryofuge 5000	Heraeus, Hanau

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Für die Versuche wurden folgende Verbrauchsmaterialien benutzt:

Verbrauchsmaterial:	Hersteller
Deckgläser:	
- 18 x 18 mm	Menzel, Braunschweig
- 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalimpföse	VWR, Darmstadt
Einmalküvetten: 70 µl, UV-Küvette mikro	Brand, Wertheim
Einmalspatel	VWR, Darmstadt

<b>Verbrauchsmaterial:</b>	<b>Hersteller</b>
Einmalspritzen: Terumo syringe	Leuven, Belange
Falcons: Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	VWR, Darmstadt
Filter (0,2 µm Porengröße):	
- Membranfilter (Cellulose-Acetat)	Sartorius, Göttingen
- Sterile Spritzen-Filter: Chromatofil®Xtra RC-20/25 (Cellulose-Acetat)	Macherey-Nagel, Düren
- Vakuumfiltrationseinheiten (PES-Membran)	VWR, Darmstadt
Glasgefäße	Schott, Mainz
Glasgeräte zur anaeroben Kultivierung:	
- Injektionsflaschen mit Butylsepten und Alu-Bördelkappen	Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern
- Hungate-Kulturröhrchen mit Lochkappe und Butylsepten	Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern
- Transfusionsflaschen mit Naturgummi-Septen und Aluminiumschraubkappen mit Loch	Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern
HPLC-Vials, 1,5 ml (mit Schraubkappen und Dichtscheiben)	Macherey-Nagel, Düren
Kanülen: BD Microlance™ 3	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Petrischalen aus Polystyrol	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen :	
- TipOne: 10 µl, 200 µl und 1250 µl	Starlab, Hamburg
Reagenzgläser	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße:	
- PCR-Tubes (0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
- Safe-Lock Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
- Safe-Lock Tubes (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
- EasyStrip snap tubes, 200 µl, 8er Streifen, weiß (qPCR)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Wattestopfen, 35 mm x 16 mm	Coltèrie Whaledent, Langenau

### 2.1.5 Software

Folgende Software-Programme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS5 (Version 12.0 x 32)	Adobe Systems, München
BLAST	Altschul et al., 1990 <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome</a> (Stand: 21.04.2016)
EzTaxon	Kim et al., 2012
FinchTV Version 1.4.0	Geospiza Inc, Seattle, USA
Irfan View Version 4.38	Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich
MEGA6	Tamura et al., 2013
Microsoft Office 2013	Microsoft, Redmond, USA
Primer-BLAST	Ye et al. 2012
Random DNA Sequence Generator	<a href="http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm">http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm</a> (Stand: 21.04.2016)
ReversComplement	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a> (Stand: 21.04.2016)

### 2.2 Mikrobiologische Materialien und Methoden

#### 2.2.1 Mikroorganismen

Die Referenzstämme in Tab. 2. 1 wurden im Rahmen der Primerentwicklung verwendet. Die Primerspezifität wurde dadurch für das jeweilige Isolat und dessen Typstamm überprüft.

**Tab. 2. 1: Referenzstämme und verwendete Anzuchtmedien.**

Organismus	Sammlungsnummer	Medium <sup>1</sup>
<i>Bacillus coagulans</i>	DSM-1	381 (DSMZ)
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM-13	381 (DSMZ)
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	LMG-18084	14 (BCCM/LMG)
<i>Clostridium aminovalericum</i>	DSM-1283	58 (DSMZ)
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM-20054	11 (DSMZ)
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM-20057	11 (DSMZ)
<i>Lactobacillus kefir</i>	DSM-20587	11 (DSMZ)
<i>Lactobacillus mucosae</i>	DSM-13345	11 (DSMZ)
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	DSM-18390	11 (DSMZ)
<i>Lactobacillus rapi</i>	DSM-19907	11 (DSMZ)
<i>Lactobacillus rossiae</i>	DSM-15814	11 + 1% Maltose, 1% Hefeextrakt, pH 5.6 (DSMZ)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM-20284	11 (DSMZ)
<i>Pediococcus parvulus</i>	DSM-20332	11 (DSMZ)

<sup>1</sup> Zusammensetzung der Nährmedien vgl. Abschnitt 2.2.3.

#### 2.2.2 Beprobte Biogasanlagen

In diesem Projekt wurden fünf mesophile (40 °C) Biogasanlagen untersucht. Die Probenentnahme der Hauptfermenter erfolgte in der Regel zwei- bis dreimal im Zeitraum von drei Jahren. Die Sammlung der Proben fand für die Biogasanlagen Friedrich, Glahn und Neumann jeweils am 22.04.2015, 12.11.2014 und 3.07.2015 statt und für die Biogasanlagen Gebel und Lieser jeweils am 25.05.2013 und 13.07.2015. Zusätzlich wurden teilweise Proben von Hydrolyse- oder Nachfermenter (vgl. Abschnitt 1.5.2), Mais- und Grassilage entnommen. Die Isolierung der milchsäurebildenden Bakterien erfolgte aus frischem Probenmaterial. Für spätere Analysen wurde Probenmaterial bei -20 °C aufbewahrt. Informationen zu den Parametern der beprobten Biogasanlagen können Tab. 2. 2 entnommen werden.

**Tab. 2. 2: Übersicht über die Parameter der beprobten Biogasanlagen.**

Anlagenparameter	BGA Friedrich (67126 Hochdorf-Assenheim)	BGA Gebel (66649 Oberthal)	BGA Glahn (66482 Zweibrücken)	BGA Lieser (54518 Arenrath)	BGA Neumann (66917 Wallhalben)
Fermenter	Hochfermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	Zentralrührwerk	LRW <sup>1</sup> / TMRW <sup>1</sup>	LRW <sup>1</sup> / TMRW <sup>1</sup>	LRW <sup>1</sup> / TMRW <sup>1</sup>	TMRW <sup>1</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	2 x 1.000	1 x 1.260	1 x 1.250	1 x 1.400	1 x 1.200
Nachgärer	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel	-
Rührung	LRW	TMRW	TMRW	TMRW	-
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	1 x 1.000	1 x 1.260	1 x 1.250	1 x 1.400	-
Hydrolyse	-	-	-	-	Ring in Ring <sup>2</sup>
V <sub>brutto</sub> [m <sup>3</sup> ]	-	-	-	-	500
Feste Inputstoffe	MS <sup>3</sup>	MS <sup>3</sup> , GS <sup>3</sup> , FM <sup>3</sup>	MS <sup>3</sup>	MS <sup>3</sup> , GS <sup>3</sup> , HM <sup>3</sup> , GeS <sup>3</sup>	MS <sup>3</sup> , GS <sup>3</sup> , GPS <sup>3</sup> , GeS <sup>3</sup>
Flüssige Inputstoffe	SG <sup>3</sup>	RG <sup>3</sup>	SG <sup>3</sup>	RG <sup>3</sup>	RG <sup>3</sup>
Maisanteil	> 95 %	30 – 55 %	50 – 55 %	45 – 60 %	54 – 63 %
Leistung	550 P <sub>el</sub> [kW]	345 P <sub>el</sub> [kW]	500 P <sub>el</sub> [kW]	535 P <sub>el</sub> [kW]	400 P <sub>el</sub> [kW]
Temperatur	40 °C	40 °C	40 °C/52 °C <sup>4</sup>	40 °C	40 °C
pH-Wert	7,6 – 7,8	7,8	7,8	7,8 – 8,0	7,5 – 7,8
Methan-gehalt	ca. 53 %	53 – 54 %	51 – 52 %	Keine Angabe	51 – 52 %
Mittlere Verweilzeit <sup>5</sup>	61/92 Tage	48/96 Tage	36/72 Tage	35/70 Tage	42 Tage/entfällt

<sup>1</sup> LRW = Langachsrührwerk, TMRW = Tauchmotorrührwerk

<sup>2</sup> Hydrolysefermenter besteht aus einem inneren Ring und einem äußeren Ring mit jeweils rund 250 m<sup>3</sup> Fassungsvermögen.

<sup>3</sup> FM = Festmist, GeS = Getreideschrot, GPS = Ganzpflanzensilage, GS = Grassilage, HM = Hähnchenmist, MS = Maissilage

<sup>4</sup> Nachgärer im ersten und zweiten Jahr thermophil betrieben.

<sup>5</sup> Mittlere Verweilzeiten im Hauptfermenter/Nachgärer.

### 2.2.3 Nährmedien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Nährmedien verwendet, um möglichst viele verschiedene Bakterien isolieren zu können. Zur Herstellung von Nährböden wurden den Nährmedien 15 g/l Agar hinzugefügt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl- oder NaOH-Lösungen unterschiedlicher Molaritäten. Alle Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

Für die Herstellung der anaeroben Nährmedien wurde eH<sub>2</sub>O verwendet, das zuvor 3 Minuten aufgekocht, unter Stickstoff-Atmosphäre in eine Transfusionsflasche abgefüllt und mit

einer Schraubkappe mit Gummiseptum verschlossen wurde. Die abgewogenen Medienbestandteile wurden dann in einem Anaerobenzelt mit Formiergasatmosphäre in dem entgasten eH<sub>2</sub>O gelöst. Nach dem Aliquotieren der Nährmedien in Kulturgefäße wurden diese mit N<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80 % N<sub>2</sub>, 20 % CO<sub>2</sub>) und einem Überdruck von ca. 0,5 bar begast.

**Tab. 2. 3: Nährmedien für fakultativ anaerobe Bakterien.**

Nährmedium 381 (DSMZ 381 modifiziert, 2007c)		Nährmedium 1 (DSMZ 1 modifiziert, 2007a)	
Trypton	10,00 g/l	Pepton aus Fleisch	5,00 g/l
Hefeextrakt	5,00 g/l	Fleischextrakt	3,00 g/l
NaCl	10,00 g/l	Glucose	5,00 g/l
Glucose	5,00 g/l	eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml
eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml	pH-Wert	7,0
pH-Wert	7,0		

**Tab. 2. 4: Nährmedien für Milchsäurebakterien.**

MRS-Medium (DSMZ 11, 2007b)		Tomatensaft-Medium (Petri et al., 2013)	
Trypton	10,00 g/l	Pepton aus Fleisch	5,00 g/l
Fleischextrakt	10,00 g/l	Trypton	20,00 g/l
Hefeextrakt	5,00 g/l	Hefeextrakt	5,00 g/l
Glucose	20,00 g/l	Glucose	5,00 g/l
Tween 80	1,00 g/l	Fructose	5,00 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00 g/l	Citronensäure	3,00 g/l
Na-Acetat	5,00 g/l	Tween 80	1,00 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HCitrat	2,00 g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,20 g/l	Tomatensaft	250,00 ml
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05 g/l	eH <sub>2</sub> O	750,00 ml
eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml	pH-Wert	5,0 – 6,0
pH-Wert	6,4		

**Tab. 2. 5: Nährmedium für Streptokokken.**

Trypticase Soja Hefeextrakt Medium (DSMZ 92, 2012)	
Trypticase Soja Brühe	30,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
eH <sub>2</sub> O	1000,0 ml
pH-Wert	7,0 – 7,2

**Tab. 2. 6: Nährmedium für *B. thermoamylovorans*.**

Medium 14 (BCCM, 2016)	
Trypton	15,0 g/l
Sojapepton	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
eH <sub>2</sub> O	1000,0 ml
pH-Wert	7,3

**Tab. 2. 7: Nährmedium für Bifidobakterien.**

<i>Bifidobacterium</i> -Medium (DSMZ 58 modifiziert, 2008)		Spurenelementlösung	
Trypton	10,00 g/l	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
Hefeextrakt	5,00 g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
Fleischextrakt	5,00 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 g/l
Sojapepton	5,00 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g/l
Glucose	10,00 g/l	NaHCO <sub>3</sub>	10,00 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00 g/l	NaCl	2,00 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,20 g/l	eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,05 g/l		
Tween 80	1,00 ml		
NaCl	5,00 g/l		
Spurenelementlösung	40,00 ml		
eH <sub>2</sub> O	950,00 ml		
Resazurin-SL (1 mg/ml)	1,00 ml/l		
Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O	0,50 g/l		
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l		
pH-Wert	6,8		
Gasphase	N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (80/20)		

**Tab. 2. 8: Nährmedium für *Bacteroides* sp.**

PYG-Medium (DSMZ 104 modifiziert, 2009)		Spurenelementlösung	
Trypton	5,00 g/l	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
Pepton aus Fleisch	5,00 g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
Hefeextrakt	10,00 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 g/l
Fleischextrakt	5,00 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g/l
Glucose	5,00 g/l	NaHCO <sub>3</sub>	10,00 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00 g/l	NaCl	2,00 g/l
Tween 80	1,00 g/l	eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml
Haemin-Lösung	10,00 ml	Haemin-Lösung	
Vitamin K <sub>1</sub> -Lösung	0,20 ml	Haemin	50,00 mg
Spurenelementlösung	40,00 ml	NaOH (1 M)	1,00 ml
eH <sub>2</sub> O	950,00 ml	eH <sub>2</sub> O	100,00 ml
Resazurin-SL (1 mg/ml)	1,00 ml/l	→ zunächst Haemin in NaOH lösen, dann auf 100 ml mit eH <sub>2</sub> O auffüllen	
Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O	0,50 g/l	Vitamin K <sub>1</sub> -Lösung	
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l	Vitamin K <sub>1</sub>	0,10 ml
pH-Wert	7,2	95 % EtOH	20,00 ml
Gasphase	N <sub>2</sub>		

Das in Medium MD (Tab. 2. 9) enthaltene Reaktorfiltrat wurde aus Fermenter-Biomasse der BGA Neumann hergestellt. Im ersten Schritt erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4000 U/min. Der Überstand wurde daraufhin erneut zweimal bei 10.000 U/min zentrifugiert und dekantiert. Anschließend erfolgte eine Vakuumfiltration mit einer sterilen 0,2 µm-Filtrationseinheit (PES-Membran). Das Reaktorfiltrat wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

**Tab. 2. 9: Medium für Lactatbildner.**

Nährmedium MD (pers. Mitteilung Hr. Dr. Dröge)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,00 g/l
NaCl	0,50 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1,00 g/l
Spurenelementlösung DSMZ 318 (Tab. 2. 10)	5,00 ml
Vitaminlösung DSMZ 141 (Tab. 2. 10)	5,00 ml
Hefeextrakt	0,20 g/l
Stärke	2,00 g/l
Reaktorfiltrat	25,00 ml
Resazurin-SL (1mg/ml)	1,00 ml
Cystein x HCl	0,50 g/l
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,10 g/l
eH <sub>2</sub> O	970,00 ml
pH-Wert	7,3
Gasphase	N <sub>2</sub>

**Tab. 2. 10: Spurenelementlösung und Vitaminlösung für Medium MD für Lactatbildner.**

Spurenelementlösung (DSMZ 318, 2014b)		Vitaminlösung (DSMZ 141, 2014a)	
Nitrilotriacetat (NTA)	12,800 g/l	Biotin	2,00 mg/l
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,350 g/l	Folsäure	2,00 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,100 g/l	Pyridoxin-HCl	10,00 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,024 g/l	Thiamin-HCl x 2 H <sub>2</sub> O	5,00 mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,100 g/l	Riboflavin	5,00 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	0,100 g/l	Nicotinsäure	5,00 mg/l
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,025 g/l	D-Ca-Panthothenat	5,00 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,010 g/l	Vitamin B <sub>12</sub>	0,10 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,024 g/l	p-Aminobenzoesäure	5,00 mg/l
NaCl	1,000 g/l	Liponsäure	5,00 mg/l
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,120 g/l	eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,026 g/l		
eH <sub>2</sub> O	1000,000 ml		
pH-Wert	6,5		
→ zunächst NTA in 200 ml eH <sub>2</sub> O lösen und anschließend pH-Wert mit KOH einstellen			

**Tab. 2. 11: Medien zur Überprüfung der Polymerabbaufähigkeit.**

Celluloseagar-Medium (Stewart & Leatherwood, 1976)		Xylan-Medium	
NaNO <sub>3</sub>	1,00 g/l	Xylan	10,00 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 g/l	Hefeextrakt	3,00 g/l
KCl	0,50 g/l	Malzextrakt	3,00 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l	Pepton aus Fleisch	5,00 g/l
Hefeextrakt	0,50 g/l	Agar	15,00 g/l
Carboxymethylcellulose	5,00 g/l	eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml
Agar	15,00 g/l	pH-Wert	7,0
eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml		
pH-Wert	7,0		
Stärke-Medium		Gelatine-Medium	
Fleischextrakt	3,00 g/l	Fleischextrakt	5,00 g/l
Pepton	5,00 g/l	Pepton	5,00 g/l
Stärke (löslich)	2,00 g/l	Gelatine	30,00 g/l
Agar	13,00 g/l	eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml
eH <sub>2</sub> O	1000,00 ml	→ Gelatine aufkochen, abfüllen und dampfsterilisieren.	
pH-Wert	7,0		

### 2.2.4 Anreicherung von milchsäurebildenden Bakterien

Es wurden spezielle Medien zur Anlegung von Anreicherungskulturen ausgewählt, welche die Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien begünstigen sollten. Tab. 2. 12 gibt einen Überblick über die verwendeten Medien, deren Zielgruppe und ob eine Animpfung mit Fermenter und/oder Silageprobe erfolgt ist. Dabei wurden die Fermenterproben ohne

Vorbehandlung eingesetzt. Von den Silageproben hingegen wurden jeweils 15 g in 50 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gegeben und für 30 Minuten geschüttelt, bevor diese zur Animpfung eingesetzt wurde. Die Animpfung der Medien für die strikt anaeroben Bakteriengruppen erfolgte im Anaerobenzelt. Die beimpften Nährmedien wurden über einen Zeitraum von einer bis zwei Wochen bei  $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  als Standkultur bebrütet.

**Tab. 2. 12: Medienauswahl für die Anreicherung von milchsäurebildenden Bakterien aus BGA-Proben.** Für jede Bakterien-Zielgruppe wurde ein geeignetes Nährmedium ausgewählt. Die Anreicherung der Fermenter- und Silageproben erfolgte in denen mit + gekennzeichneten Medien.

Bakterien-Zielgruppe	Medium <sup>1</sup>	Fermenterproben <sup>2</sup>	Silageproben
Fakultativ anaerobe Bakterien	DSMZ 1	+	+
	LB-Medium	+	+
Aerotolerante Milchsäurebakterien	MRS-Medium	+	+
	Tomatensaftmedium	+	+
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> -Medium	+	–
<i>Streptococcus</i> sp.	MD-Medium	+	–
<i>Bacteroides</i> sp.	PYG-Medium	+	–

<sup>1</sup> Zusammensetzung der Nährmedien vgl. Abschnitt 2.2.3.

<sup>2</sup> Die Anreicherung erfolgte mit Proben von Hydrolyse-, Haupt- und Nachfermentern. Die Fermentertypen der Biogasanlagen können Tab. 2. 2 entnommen werden.

### 2.2.5 Methoden zur Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien

Zur Erhaltung von Reinkulturen wurden verschiedene Methoden angewandt. Für die Vereinzelung der Bakterienzellen auf einem Nährboden wurde der Vereinzelungsausstrich mit einer sterilen Impföse oder das Ausplattieren eines Probenvolumens von 0,1 µl mit einem sterilen Drigalski-Spatel angewandt. Hierfür wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der Anreicherungskulturen bis zur Stufe  $10^{-4}$  hergestellt. Die Vereinzelung der strikt anaeroben Bakteriengruppen erfolgte mit sterilen Einmalimpfösen oder Einmalspateln im Anaerobenzelt und die Kultivierung der Agarplatten in speziellen Anaerobentöpfen aus rostfreiem Stahl. Die Tiefagar-Verdünnungsmethode wurde eingesetzt, um strikt anaerobe Bakterien zu isolieren, die nicht auf der Agaroberfläche wuchsen.

Für die Tiefagar-Verdünnungsmethode wurden die anaeroben Medien (vgl. Abschnitt 2.2.3) mit jeweils 1,5 % (w/v) Agar in ein Reagenzglas mit Aluminiumkappe gegeben und in eine Transfusionsflasche überführt. Diese wurde mit einer Schraubkappe mit Gummiseptum gasdicht verschlossen und diente somit als „Anaerobentopf“. Nach dem Autoklavieren wurden die Nährmedien auf ca. 50 °C abgekühlt und mit 0,1 – 0,5 µl Proben-

suspension beimpft und durchmischt. Durch eine rasche Abkühlung der beimpften Medien im Eisbad wurden die Bakterien der erhöhten Temperatur nur wenige Sekunden ausgesetzt. Nach Verfestigung des Nährmediums wurden die Tiefagar-Röhrchen kopfüber in die Transfusionsflasche überführt und bebrütet.

Die beimpften anaeroben und aeroben Nährmedien wurden bei  $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  als Standkultur bebrütet. Beim Wachstum von Kolonien auf Agarplatten wurden diese gepickt und erneut auf einem Nährboden mittels Impföse ausgestrichen. Bei der Bildung von Kolonien im Tiefagar hingegen wurde der Agar zunächst aus dem Röhrchen in eine sterile Petrischale gebracht. Als Hilfsmittel wurde dabei eine sterile Kanüle verwendet. Im nächsten Schritt wurde die Bakterienkolonie mit einem zuvor autoklavierten Objektträger in einer sterilen Petrischale ausgeschnitten und in Flüssigmedium überführt. Die jeweiligen Vereinzelmethode wurden mindestens dreimal wiederholt, um Reinkulturen zu erhalten. Anschließend erfolgte eine Analyse der gewonnenen Isolate auf Milchsäurebildung durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (vgl. Abschnitt 2.3).

### **2.2.6 Bestimmung der Lebendkeimzahl**

Die Lebendkeimzahl der milchsäurebildenden Bakterien in den Fermenter- (in Abhängigkeit der Fermentertypen der jeweiligen Biogasanlage Hydrolyse-, Haupt- und Nachfermenter, vgl. Abschnitt 2.2.2) und Maissilageproben wurde mit dem „Most-probable-number“ (MPN)-Verfahren bestimmt (McCrary, 1915). Hierfür wurde das Tomatensaftmedium mit 0,67 g/l Kaliumsorbat und einem pH-Wert von 5,0 verwendet. Die Vorbehandlung der Silage erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Für die Untersuchung wurden 1 ml Fermenter- oder aufbereitete Silageprobe zu 9 ml Tomatensaftmedium gegeben. Von den zu analysierenden Proben wurden dekadische Verdünnungsreihen bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-10}$  angelegt. Je Probe wurden drei parallele Verdünnungsreihen hergestellt. Die Inkubation der Reagenzgläser erfolgte für zwei Wochen bei  $40 \pm 1\text{ °C}$ . Anschließend wurden die Verdünnungsstufen auf bakterielles Wachstum untersucht. Die MPN wurde nach McCrary (1918) berechnet. Die höchste Verdünnungsstufe, die bakterielles Wachstum zeigte, wurde untersucht, um sicherzustellen, dass es sich um milchsäurebildende Bakterien handelte.

### 2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zuckerabbau, Säure- und Alkoholbildung der Anreicherungs- und Reinkulturen wurden mit einer HPLC-Anlage bestimmt (vgl. Abschnitt 2.1.3). Ein HPLC-Standard mit ausgewählten Komponenten bekannter Konzentrationen ermöglichte die Identifikation und Quantifizierung der Substanzen. Durch einen Vergleich mit den Retentionszeiten des Standards wurde die Substanz identifiziert und durch den jeweiligen Response-Faktor, der sich aus dem Quotienten von Konzentration und Fläche des Standards ergab, quantifiziert. Die Zusammensetzung des HPLC-Standards ist in Tab. 2. 13 zu sehen.

**Tab. 2. 13: Zusammensetzung des HPLC-Standards.**

Substanz	Retentionszeit [min]	Konzentration [g/l] <sup>1</sup>	Fläche [arbitrary units]	Response-Faktor
Glucose	9,32	10,33	1450514	7,122E-6
Fructose	10,09	10,07	1547732	6,510E-6
Lactat	13,18	9,50	1017878	9,333E-6
Glycerin	13,93	8,63	1103725	7,820E-6
Acetat	15,41	6,41	486185	1,318E-5
Diacetyl	17,10	5,95	699638	8,500E-6
Propionat	18,02	5,25	477944	1,100E-5
Acetoin	18,20	4,12	445842	9,240E-6
Butyrat	21,75	3,83	339176	1,129E-5
Ethanol	22,63	5,52	10751	1,440E-5

<sup>1</sup> aufgetragenes Volumen: 5 µl

Als mobile Phase diente 0,013 N Schwefelsäure, die aus konzentrierter Schwefelsäure und entgastem MilliQ-Wasser hergestellt wurde. Durch den Autoinjektor wurde ein Probenvolumen von 5 µl entnommen und durch die mobile Phase zum Säulensystem gepumpt. Dieses bestand aus einer Vor- und einer Hauptsäule, die sich im Säulenofen bei 65 °C befanden. Die Messungen wurden bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min und einem Druck von ca. 60 bar durchgeführt. Zur Detektion diente ein RI-Detektor, die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte durch einen Integrator. Ein Analysen-Zyklus benötigte 33 Minuten. Die Modell- und Herstellerangaben der Komponenten der HPLC-Anlage sind Abschnitt 2.1.3 zu entnehmen.

Für die HPLC-Analyse wurde 1 ml Anreicherungs- oder Reinkultur entnommen und bei 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Filter (Porengröße: 0,2 µm) aufgereinigt und in ein HPLC-Vial, mit Schraubkappe und Dichtscheibe, überführt.

## **2.4 Mikroskopische und physiologische Untersuchungen**

### **2.4.1 Phasenkontrastmikroskopie**

Die Zellmorphologie der Isolate wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop Axiophot 2 (Zeiss, Oberkochen) bei 1000-facher Vergrößerung untersucht. Zur Fixierung der Bakterienzellen in einer Ebene diente ein dünner 1,5 % (w/v) Agarosefilm auf dem Objektträger. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit der Kamera AxioCam HRC (Zeiss, Oberkochen).

### **2.4.2 UV-Test zur Bestimmung der Milchsäure-Stereoisomerie**

Die Milchsäurebildung der Reinkulturen wurde bereits durch die HPLC nachgewiesen. Die Analyse der Stereoisomerie der gebildeten Milchsäure erfolgte hingegen durch den D- und L-Milchsäure UV Test (R-Biopharm, Darmstadt). Hierfür wurden die Flüssigmedien mit 1 % der jeweiligen Bakterienkultur beimpft und anaerob für sieben Tage bei  $40 \pm 1$  °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde die Gesamtkonzentration der Milchsäure durch die HPLC überprüft.

### **2.4.3 Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels mit API 50 CH**

Der Kohlenhydratstoffwechsel der Isolate wurde unter Verwendung des API 50 CH Tests (BioMérieux, Nürtingen) untersucht. Hierbei kann die Verwertbarkeit von 49 Kohlenhydraten zeitgleich getestet werden. Die wasserfreien Kohlenhydrate befinden sich in Mikrokammern. Ein gattungsspezifisches Medium mit Indikatorfarbstoff wird zunächst mit dem zu testeten Isolat beimpft und anschließend in die Mikrokammern pipettiert. Infolgedessen werden die Kohlenhydrate gelöst und bei Verwertbarkeit entstehen organische Säuren, die durch einen Farbumschlag angezeigt werden: Bei dem Lactobazillen- und Pediokokken-Medium (CHL Medium) von blau nach gelb und bei dem Bazillen-Medium (CHB Medium) von rot-orange nach gelb. Um anaerobe Bedingungen herzustellen, wurden die Mikrokammern mit Paraffinöl verschlossen.

### **2.4.4 Test auf Verwertbarkeit ausgewählter Polymere**

Die Isolate wurden auf die Abbaufähigkeit spezieller Polymere getestet. Diese umfassten Cellulose, Xylan, Stärke und Gelatine. Die verwendeten Medien sind Tab. 2. 11 zu entnehmen (vgl. Abschnitt 2.2.3). Die Cellulose-, Xylan- und Stärke-Agarplatten wurden strichförmig mit der zu testeten Bakterienkultur beimpft und in einem rostfreien

Edelstahl-Anaerobentopf inkubiert. Das Gelatine-Medium wurde in Reagenzgläser abgefüllt und mittels Agarstich beimpft. Die Inkubation der beimpften Polymermedien erfolgte für eine Woche bei  $40 \pm 1$  °C. Nach Überprüfung des Bakterienwachstums wurden die Cellulose- und Xylan-Platten mit 0,2 % (w/v) Kongorot-Lösung für 30 Minuten überschichtet, danach mit 1 M NaCl-Lösung gespült, nochmals überschichtet und für weitere 15 Minuten inkubiert. Auf die Stärke-Platten wurde Lugolsche Lösung gegeben und eine Auswertung dieser konnte bereits nach wenigen Minuten erfolgen. Cellulose-, Xylan- oder Stärke-Abbau wurde durch die Bildung eines klaren Hofes um den Impfstich angezeigt. Für die Auswertung der Gelatine-Röhrchen wurden diese über Nacht im Kühlschrank gelagert. Hielt die Verflüssigung der Gelatine dennoch an, war dies ein Nachweis für deren Abbau.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1 DNA-Isolierung aus Reinkulturen und Fermenterproben**

Die Isolierung genomischer DNA aus Reinkulturen erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden). In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden 200 – 500 µl der Bakterienkultur eingesetzt und bei 8.500 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben für grampositive Bakterien. Die isolierte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.

In dieser Arbeit wurde genomische DNA aus Fermenterproben verwendet, um die isolierten milchsäurebildenden Bakterien mittels Multiplex-PCR und quantitativer Real-time-PCR (qPCR) qualitativ und quantitativ nachweisen zu können. Für die Isolierung wurde das EURx GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit (Roboklon, Berlin) verwendet und die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurden 200 mg Fermenterprobe eingesetzt und die DNA in einem Volumen von 150 µl eluiert.

### **2.5.2 Amplifikation bakterieller 16S rDNA**

Die Amplifikation des 16S rRNA-Gens der Isolate ermöglichte eine phylogenetische Zuordnung durch einen Sequenzvergleich mit bereits hinterlegten bakteriellen Sequenzen in Datenbanken (vgl. Abschnitt 3.2). Das verwendete PCR-Programm und die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sind in Tab. 2. 14 zu sehen.

**Tab. 2. 14: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung der 16S rDNA.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5,0 min	Forward-Primer <sup>1</sup>	1 µl
2	Denaturierung	94 °C	1,0 min	Reverse-Primer <sup>2</sup>	1 µl
3	Annealing	56 °C	1,0 min	dNTP-Mix (40 mM)	1 µl
4	Elongation	72 °C	1,5 min	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
5	35 Zyklen (Nr. 2 - 4)			PCR-Puffer Y (10x)	5 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10,0 min	Enhancer Solution P (5x)	5 µl
				PCR-H <sub>2</sub> O	31 µl
				<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	2 µl
				Template-DNA	2 µl
				Gesamtvolumen	50 µl

<sup>1</sup> PurEubak5 (10 µm): 5'-AGAAAGGAGGTGATCC-3'

<sup>2</sup> PurEubak3 (10 µm): 5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-3'

### 2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größen. Es wurden 1,5 % und 2,0 % (w/v) Agarosegele aus Agarose und TBE-Puffer (TRIS 10,8 g/l, Borsäure 5,5 g/l, EDTA-Na<sub>2</sub> 0,82 g/l) verwendet. Zur Auftrennung der amplifizierten synthetischen DNA-Sequenz (Abschnitt 2.5.14) wurde einmalig ein 1 % (w/v) Agarosegel verwendet. In der Regel wurde eine DNA-Lösung von 5 µl eingesetzt, lediglich bei SAPD-PCR-Ansätzen wurden 7 µl und bei *Pfu*-DNA-PCR-Ansätzen 20 µl mit 6 x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Als DNA-Größenstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, St. Leon-Rot). Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei 100 – 120 V. Bei den SAPD-PCR-Ansätzen hingegen wurde eine Spannung von 60 V eingestellt, um eine schärfere Auftrennung der Banden zu erhalten.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 – 30 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) gefärbt und anschließend in einer Geldokumentationseinheit unter UV-Licht fotografiert (Biovision CN3000, Vilber Lourmat, Eberhardzell). Die Gelbilder wurden mit dem Programm Irfan View Version 4.38 (Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich) bearbeitet.

### 2.5.4 Gelextraktion

Für die Gelextraktion wurden die PCR-Produkte in Agarosegelen aufgetrennt und in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) gefärbt. Die Banden wurden dann unter schwacher UV-Belichtung mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) extrahiert. Zur Elution der DNA wurden 35 µl PCR-Wasser für SAPD-Banden und 30 µl für das PCR-Produkt der synthetischen DNA-Sequenz verwendet.

### 2.5.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte entweder mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Alrich, St. Louis) oder mit dem ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, USA). Bei dem Letztgenannten wurden zunächst 15 µl PCR-Produkt mit 3 µl ExoSAP-IT-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung des ExoSAP-IT für 25 Minuten bei 80 °C.

### 2.5.6 Sequenzierung und Analyse der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte durch StarSEQ (Mainz). Für die Analyse der PCR-Produkte wurden die erhaltenen Chromatogramme mit der Software FinchTV 1.4.0 (version 1.4.0, Geospiza Inc, Seattle, USA) beurteilt und ggf. undeutliche Basenpaare an Anfang und Ende entfernt. Die daraus resultierende Sequenz wurde anschließend mit bereits hinterlegten Sequenzen der Datenbank EzTaxon (Kim et al., 2012) oder BLAST (Altschul et al., 1990) verglichen.

### 2.5.7 SAPD-PCR

Die Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR (SAPD-PCR) ist eine DNA-Fingerprint-Methode, die eine Differenzierung von Organismen auf Art-Niveau ermöglicht (Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Durch die Bindung des verwendeten Primers an spezifische Stellen der DNA-Matrize, entsteht je nach Bakterienart ein charakteristisches Bandenmuster. Die verwendeten Primer A-, C-, G- und T-Not unterscheiden sich lediglich durch die letzte Base am 3'-Ende und leiten sich von der Erkennungssequenz des *NotI*-Restriktionsenzym (5'-GCGGCCGC-3') ab. Die Beinhaltung zweier Rampen im PCR-Programm, die einen schrittweisen Temperaturanstieg zwischen Annealing und Elonga-

tion des Primers gewährleisten, ermöglicht eine reproduzierbare Bindung des verwendeten Primers an die DNA (Pfannebecker, 2008).

In dieser Arbeit wurde die SAPD-PCR zur Gruppierung der erhaltenen milchsäurebildenden Isolate, sowie zur Generierung artspezifischer Primer verwendet. Während die Gruppierung der Isolate mit dem G-Not-Primer erfolgte, wurden für die Primerentwicklung zusätzlich die Primer A-, C-, und T-Not hinzugezogen. Tab. 2. 15 zeigt das verwendete PCR-Programm und die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

**Tab. 2. 15: Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die SAPD-PCR.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95,0	5 min	Primer <sup>1</sup> (50 µM)	1,0 µl
2	Denaturierung	94,0	1 min	dNTP-Mix (40 mM)	1,0 µl
3	Annealing	35,0	1 min	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0 µl
4	Rampe	35,0 (+ 0,5)	12 s	PCR-Puffer S (10x)	2,5 µl
5	15 Zyklen (Nr. 4)			PCR-H <sub>2</sub> O	12,5 µl
6	Annealing	42,5	1 min	Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1,0 µl
7	Rampe	42,5 (+0,5)	12 s	Template-DNA	5,0 µl
8	19 Zyklen (Nr. 7)			Gesamtvolumen	25,0 µl
9	Elongation	72,0	5 min		
10	35 Zyklen (Nr. 2 - 4)				
11	Finale Elongation	72,0	10 min		

<sup>1</sup> A-/C-/G- oder T-Not: 5'-AGCGGCCGCA/C/G/T-3'

### 2.5.8 Nested SAPD-PCR

Die nested SAPD-PCR (Fröhlich & Pfannebecker, 2007) wurde bei Isolaten angewandt, deren SAPD-Bandenmuster mehrere Banden der gleichen Größe zeigte. Dies erschwerte den Ausschnitt einer einzelnen Bande für die Entwicklung von isolatspezifischen Primern. Die verwendeten nested SAPD-Primer G-Not-G und G-Not-T besitzen eine zusätzliche Base am 3'-Ende und generieren somit weniger Banden bei der PCR-Reaktion im Vergleich zur SAPD-PCR. Dadurch wird die Auswahl einer spezifischen Bande und deren Ausschnitt aus dem Agarosegel erleichtert. Das PCR-Programm und der Reaktionsansatz der nested SAPD-PCR sind in Tab. 2. 16 zusammengefasst.

**Tab. 2. 16: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die nested SAPD-PCR.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	Primer <sup>1</sup> (50 µM)	1,0 µl
2	Denaturierung	94 C	1 min	dNTP-Mix (40 mM)	1,0 µl
3	Annealing	41 °C	1 min	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0 µl
4	Elongation	72 °C	5 min	PCR-Puffer S (10x)	2,5 µl
5	35 Zyklen (Nr. 2 - 4)			Enhancer Solution P (5x)	2,5 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	PCR-H <sub>2</sub> O	14,0 µl
				Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1,0 µl
				Template-DNA	1,0 µl
				Gesamtvolumen	25,0 µl

<sup>1</sup> G-Not-G oder G-Not-T (5'-AGCGGCCGCGG/T-3')

### 2.5.9 Klonierung

Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem TOPO® TA Cloning® Kit Sequencing invitrogen™ (Life Technologies GmbH, Darmstadt). In dieser Arbeit sollten spezifische SAPD-PCR-Banden der Isolate sequenziert werden, um diese für die Entwicklung von spezifischen Primern verwenden zu können. Dafür wurden die ausgewählten Banden ausgeschnitten und nach einer Gelextration (vgl. Abschnitt 2.5.4) in den pCR™ 4-TOPO® TA Vektor kloniert und anschließend in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*-Zellen transformiert. Im ersten Schritt wurde ein TOPO-Ligationsansatz hergestellt, welcher sich aus 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>), 1 µl pCR4-TOPO-Vektor und 4 µl extrahierter DNA aus einer Gelbande zusammensetzte. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen Vektor und Insert zu ermöglichen. Für die Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 2 µl des TOPO-Ligationsansatzes vorsichtig hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzschock für 30 Sekunden bei 42 °C, mit daran anschließender erneuter kurzer Lagerung auf Eis. Die Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium erfolgte bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurden 50 – 100 µl Zellsuspension auf kanamycinhaltigen LB-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Da der verwendete Vektor eine Kanamycinresistenz besitzt, konnten nur die Zellen wachsen, welche den Vektor erfolgreich aufgenommen hatten. Diese Kolonien wurden im nächsten Schritt für eine Colony-PCR verwendet.

### 2.5.10 Colony-PCR mit transformierten *Escherichia coli*-Zellen

Die Colony-PCR (Col-PCR) diente zur Amplifizierung eines klonierten DNA-Fragments mit den vektorkodierten Primern M13f und M13r. Hierfür wurde eine Kolonie transformierter *E. coli*-Zellen gepickt, in 30 µl PCR-H<sub>2</sub>O aufgenommen und als Template-DNA für den PCR-Ansatz verwendet. In Tab. 2. 17 sind der Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm wiedergegeben. Die zeitliche Ausdehnung der initialen Denaturierung auf 15 Minuten ermöglichte eine Lyse der Zellen, sodass die DNA für die anschließende Amplifizierung zugänglich war.

**Tab. 2. 17: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Col-PCR.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	Forward-Primer <sup>1</sup>	1 µl
2	Denaturierung	94 °C	1 min	Reverse-Primer <sup>2</sup>	1 µl
3	Annealing	58 °C	1 min	dNTP-Mix (40 mM)	1 µl
4	Elongation	72 °C	1:40 min	PCR-Puffer Y (10x)	5 µl
5	33 Zyklen (Nr. 2 – 4)			PCR-H <sub>2</sub> O	38 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	2 µl
				Template-DNA	2 µl
				Gesamtvolumen	50 µl

<sup>1</sup> M13f (10 µM): 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

<sup>2</sup> M13r (10 µM): 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

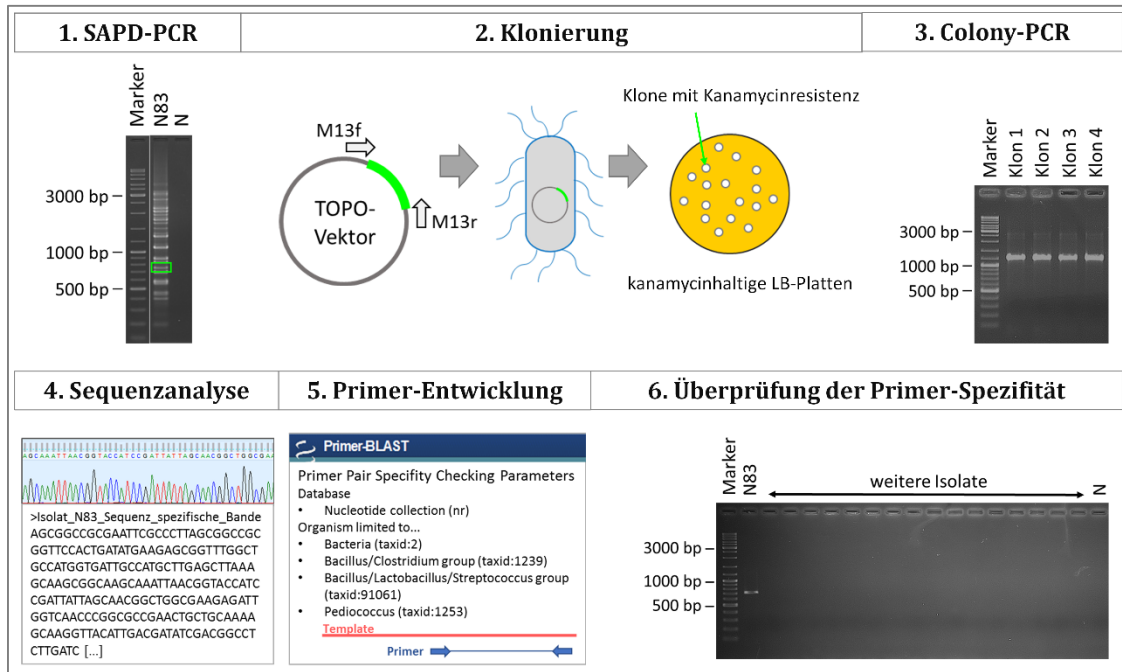
### 2.14.11 Primerentwicklung

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis der Isolate in Biogasanlagen wurden insgesamt 21 Primerpaare entwickelt. Ein Multiplex-System erfordert unterschiedlich große PCR-Produkte der Isolate. Da jedes Isolat anhand eines PCR-Produktes zugeordnet wird und in einem PCR-Ansatz mehrere Isolate nachgewiesen werden, sollten die Größenunterschiede mindestens 70 bp betragen. Die qPCR hingegen erfordert optimalerweise eine PCR-Produktlänge von 75 bis 150 bp, höchstens jedoch 450 bp. Daher wurden für manche Isolate zwei Primerpaare mit unterschiedlich großen PCR-Produkten entwickelt. Die Primerpaare wurden aus der Sequenz einer isolatspezifischen SAPD-Bande generiert. Lediglich das Primerpaar für das Isolat NF3 wurde von der 16S rDNA abgeleitet.

Für die Entwicklung von spezifischen Primern ist es notwendig, eine geeignete DNA-Sequenz zu finden, welche bei verwandten Gattungen nicht vorhanden ist. Darum wurden die SAPD-PCR-Produkte zunächst mit anderen bereits isolierten Milchsäurebildnern und

dem jeweiligen Typstamm verglichen, bevor eine Bande ausgewählt wurde. Nachdem die ausgewählte Bande ausgeschnitten und aus dem Agarosegel extrahiert wurde, erfolgte die Klonierung in den TOPO-Vektor und die anschließende Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen. Nach Selektion der positiven Klone auf kanamycinhaltigen LB-Platten wurden diese gepickt und das aufgenommene Insert in einer darauffolgenden Col-PCR mit den vektorcodierten Primer M13f und M13r amplifiziert. In einem nächsten Schritt konnte durch eine Gelelektrophorese die Amplifikatgröße überprüft werden und die Sequenzierung der Amplifikate erfolgen. Auf Basis dieser DNA-Sequenzen wurden dann die Primer unter Verwendung von Primer-BLAST designt. Für den Vergleich mit anderen DNA-Sequenzen wurden die Datenbanken „nucleotide collection (nr)“ und „nukleotide collection (nr) (Organisms limited to bacteria, *Bacillus/Clostridium* group, *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* group and *Pediococcus*)“ herangezogen. Zusätzlich wurde die Spezifität der generierten Primer in einer SCAR-PCR überprüft.

Die Vorgehensweise der Primerentwicklung ist in Abb. 2. 1 schematisch dargestellt.



**Abb. 2. 1: Schema zur Vorgehensweise bei der Entwicklung von art- oder isolatspezifischen Primern.** (1) SAPD-PCR zur Auswahl und Gelextraktion einer isolatspezifischen Bande (2) Klonierung in den TOPO-Vektor und Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen. Wachstum der inserttragenden Klone aufgrund einer Kanamycinresistenz auf kanamycinhaltigen LB-Platten (3) Colony-PCR mit den vektorkodierten Primern M13f und M13r und Überprüfung der PCR-Produktlänge. (4) Sequenzanalyse der spezifischen Bande (5) Entwicklung von SCAR-Primern mit dem Programm Primer-BLAST (6) SCAR-PCR zur Überprüfung der Primerspezifität gegen den Typstamm und eine Vielzahl anderer Isolate

### 2.5.12 SCAR-PCR zur Überprüfung der Primerspezifität

Die Sequence Characterized Amplified Region-PCR (SCAR-PCR) wurde zur Überprüfung der Spezifität der entwickelten SCAR-Primer verwendet. Die sogenannten SCAR-Primer wurden aus einer speziesspezifischen SAPD-Bande des jeweiligen milchsäurebildenden Isolates generiert und anschließend in einer SCAR-PCR überprüft. Dabei diente die DNA aller anderen milchsäurebildenden Isolate und Typstämmen als Template. Stichprobenartig wurden auch weitere, in der Biogasanlage vorkommende, Säurebildner sowie Methanogene in die Überprüfung mit einbezogen. Die SCAR-Primer wurden für den qualitativen Nachweis in der Multiplex-PCR und für die quantitative Bestimmung in der qPCR benötigt. Das PCR-Programm und der PCR-Ansatz sind in Tab. 2. 18 zu sehen.

**Tab. 2. 18: Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die SCAR-PCR.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	Forward-Primer <sup>1</sup> (10 µM)	0,5 µl
2	Denaturierung	94 °C	1 min	Reverse-Primer <sup>1</sup> (10 µM)	0,5 µl
3	Annealing	59 °C	1 min	dNTP-Mix (40 mM)	0,5 µl
4	Elongation	72 °C	40 s	Reaktionspuffer S (10x)	2,5 µl
5	35 Zyklen (Nr. 2 – 4)			PCR-H <sub>2</sub> O	18,0 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	2,0 µl
				Template-DNA	1,0 µl
				Gesamtvolumen	25,0 µl

<sup>1</sup> Eingesetzt wurden die entwickelten Primer in Tab. 3. 3 und Tab. 3. 4.

### 2.5.13 Multiplex-PCR zum qualitativen Nachweis ausgewählter Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Multiplex-PCR-System entwickelt werden, mit dem insgesamt 14 milchsäurebildende Bakterien nachgewiesen werden konnten. Als Grundlage wurden artspezifische SCAR-Primer, welche in vorangegangenen Arbeiten (Pfannebecker, 2008; Petri, 2013) und in dieser Arbeit generiert wurden (Tab. 3. 3). Es wurden insgesamt drei Primer-Mischungen mit 6, 4 bzw. 4 Primerpaaren hergestellt, wobei diese in getrennten Reaktionsansätzen verwendet wurden. Die finale Konzentration der Primer war 2 µM. Tab. 2. 19 zeigt die Primer-Mischungen und deren Zusammensetzung.

**Tab. 2. 19: Zusammensetzung der Primer-Mischungen der Multiplex-Systeme.**

Primer-Mischungen					
Multiplex-System 1		Multiplex-System 2		Multiplex-System 3	
SCAR-Primer <sup>1</sup>	Konz.	SCAR-Primer <sup>1</sup>	Konz.	SCAR-Primer <sup>1</sup>	Konz.
SCAR-LBR-F	2 µM	SCAR-CAM4-F	2 µM	SCAR-BPU-F	2 µM
SCAR-LBR-R	2 µM	SCAR-CAM4-R	2 µM	SCAR-BPU-R	2 µM
SCAR-LRA-F	2 µM	SCAR-LMU-F	2 µM	SCAR-BCO-F	2 µM
SCAR-LRA-R	2 µM	SCAR-LMU-R	2 µM	SCAR-BCO-R	2 µM
SCAR-PAC-F	2 µM	SCAR-LRO4-F	2 µM	SCAR-BTH-F	2 µM
SCAR-PAC-R	2 µM	SCAR-LRO4-R	2 µM	SCAR-BTH-R	2 µM
SCAR-LPA2-F	2 µM	F-gyrB SIC	2 µM	SCARq-BLI-F	2 µM
SCAR-LPA2-R	2 µM	R-gyrB SIC	2 µM	SCARq-BLI-R	2 µM
SCAR-LBU2-F	2 µM				
SCAR-LBU2-R	2 µM				
SCAR-PPA-F	2 µM				
SCAR-PPA-R	2 µM				

<sup>1</sup> Eigenschaften der Primer sind in Tab. 3. 3 aufgeführt.

Für die Multiplex-PCR wurde das Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Tab. 2. 20 zeigt die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes.

**Tab. 2. 20: Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Multiplex-PCR.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5,0 min	Multiplex PCR Mastermix (2x)	12,5 µl
2	Denaturierung	94 °C	0,5 min	Primer-Mischung (10x)	2,5 µl
3	Annealing	60 °C	1,5 min	10x CoralLoad PCR-Puffer	2,5 µl
4	Elongation	72 °C	2,0 min	Template-DNA <sup>1</sup>	1,0/5,0 µl
5	30 Zyklen (Nr. 2 – 4)			PCR-H <sub>2</sub> O	6,5/2,5 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10,0 min	Gesamtvolumen	25 µl

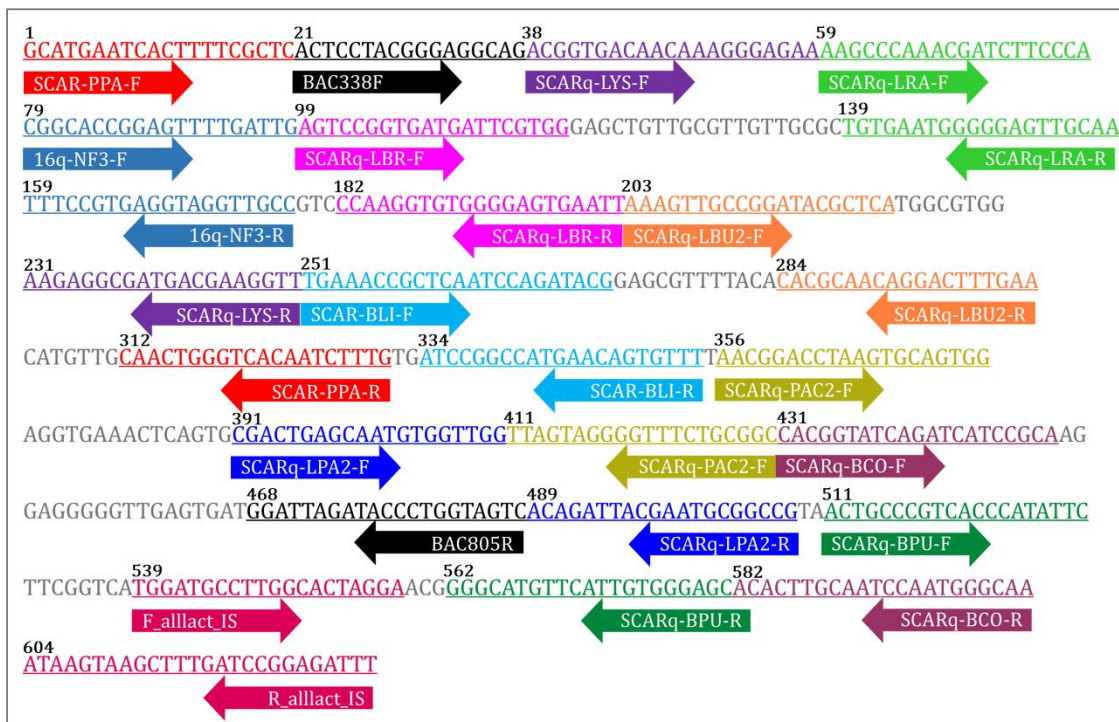
<sup>1</sup> bei Verwendung von DNA aus Reinkulturen wurde 1 µl, und bei Gesamt-DNA aus Fermenterproben 5 µl, eingesetzt.

Zur Kontrolle und erleichterten Zuordnung der Amplifikate wurde eine DNA-Mischung erstellt, die DNA aus den Reinkulturen der nachzuweisenden Bakterien beinhaltet und bei jeder Multiplex-PCR mitgeführt wurde.

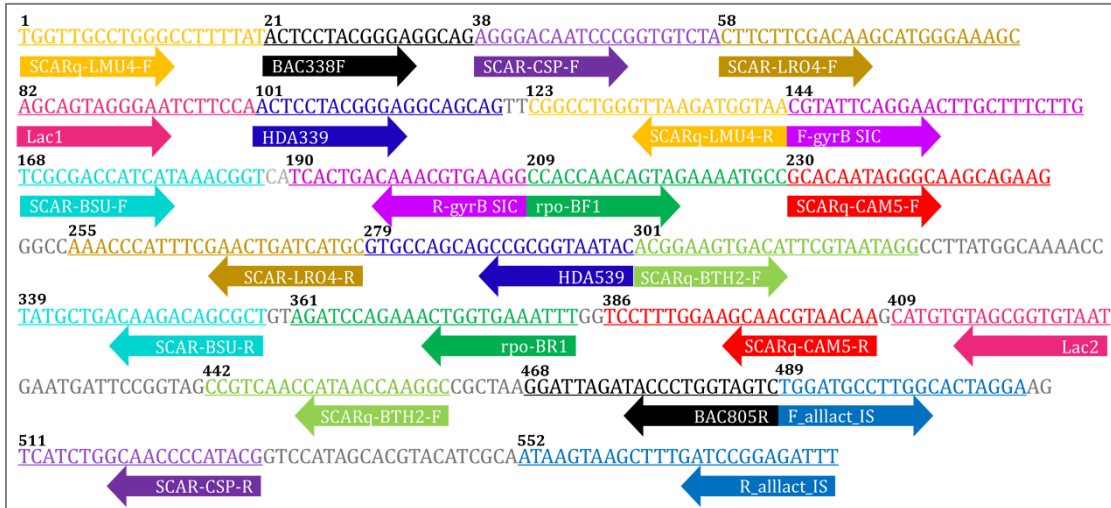
#### 2.5.14 Quantitativer Nachweis der Isolate in Fermenterproben mittels qPCR

Die quantitative Bestimmung der Isolate mit Hilfe der qPCR wurde nach der Methode von May et al. (2015) durchgeführt. Dabei wird ein spezifisches primertragendes Plasmid als Standard für die Quantifizierung eingesetzt.

Aufgrund der Vielzahl der Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Plasmide generiert: AD1 und JB1. Für die Entwicklung der Plasmide wurden sowohl Primer dieser Arbeit als auch Primer aus der Literatur verwendet (Tab. 3. 4). Je Plasmid musste zunächst eine synthetische DNA-Sequenz erstellt werden, welche die Basenabfolgen der verwendeten Primer trägt. Die DNA-Sequenz wurde in 5'-3'-Richtung erstellt. Die Reverse-Primer wurden revers-komplementär eingesetzt. Die Lage der Forward- und Reverse-Primer wurde so gewählt, dass die dazwischen liegenden Basen der Länge des PCR-Produktes entsprachen. Zwischen den Primersequenzen mussten dafür teilweise DNA-Sequenzen eingefügt werden, die unter Verwendung des „Random DNA Sequence Generator“ (<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm>; Stand: 21.04.2016) nach dem Zufallsprinzip generiert wurden. Die beiden primertragenden DNA-Sequenzen sind in Abb. 2. 2 und Abb. 2. 3 dargestellt und wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) als Inserts in das Plasmid pEX-A2 kloniert.



**Abb. 2. 2: Synthetische DNA-Sequenz des Plasmids AD1 für die Herstellung eines Standards für die Quantifizierung der Isolate.** Die DNA-Sequenz ist in Richtung 5'-3' angegeben und besitzt insgesamt 629 bp. Über der ersten Base einer Primer-Sequenz ist die fortlaufende Anzahl der Basenpaare in schwarz angegeben und kennzeichnet die Position der Primersequenz. Farblich dargestellt sind die Primer-Namen und deren Sequenzen. Grau markiert sind Basenpaare, die zum Auffüllen der Lücken eingefügt wurden. Die Eigenschaften der Primer sind in Tab. 3. 4 aufgeführt. Das Primer-Paar SCARq-LYS-F/R wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.



**Abb. 2. 3: Synthetische DNA-Sequenz des Plasmids JB1 für die Herstellung eines Standards für die Quantifizierung der Isolate.** Die DNA-Sequenz ist in Richtung 5'-3' angegeben und besitzt insgesamt 577 bp. Über der ersten Base einer Primer-Sequenz ist die fortlaufende Anzahl der Basenpaare in schwarz angegeben und kennzeichnet die Position der Primersequenz. Farblich dargestellt sind die Primer-Namen und deren Sequenzen. Grau markiert sind Basenpaare, die zum Auffüllen der Lücken eingefügt wurden. Die Eigenschaften der Primer sind in Tab. 3. 4 aufgeführt. Das Primerpaar SCAR-CSP-F/R wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Die Plasmide AD1 und JB1 wurden nach Erhalt jeweils in 30 µl PCR-Wasser aufgenommen. Im ersten Schritt erfolgte eine Restriktion der erstellten DNA-Sequenz aus dem Plasmid. Der Restriktionsverdau wurde mit dem Enzym *EcoRI* durchgeführt, dessen Restriktionsschnittstellen (5'-G<sup>A</sup>AATTC-3') die DNA-Sequenz flankierten. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 2,0 µl *EcoRI*-Puffer (10x), 1,5 µl *EcoRI*-Restriktionsenzym, 16 µl PCR-Wasser und 0,5 µl Plasmid-DNA-Lösung zusammen und wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend für 20 Minuten bei 65 °C.

Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die Amplifikation der DNA-Sequenz mit einer *Pfu*-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), da diese eine sehr geringe Fehlerrate besitzt. Die PCR wurde mit dem jeweils ersten und letzten Primer der entwickelten DNA-Sequenz durchgeführt. Das PCR-Programm und der PCR-Ansatz sind in Tab. 2. 21 dargestellt.

**Tab. 2. 21: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifizierung der synthetischen DNA-Sequenz.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	3,0 min	Forward-Primer <sup>1</sup> (10µm)	2,50 µl
2	Denaturierung	95 °C	0,5 min	Reverse-Primer <sup>2</sup> (10 µm)	2,50 µl
3	Annealing	58 °C	0,5 min	dNTP-Mix (10 mM)	1,25 µl
4	Elongation	72 °C	1,0 min	<i>Pfu</i> -Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (10x)	5,00 µl
5	30 Zyklen (Nr. 2 – 4)			PCR-H <sub>2</sub> O	34,25 µl
6	Finale Elongation	72 °C	10,0 min	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (25 U/µl)	1,00 µl
				Template-DNA <sup>3</sup>	3,00 µl
				Gesamtvolumen	50,00 µl

<sup>1</sup> Plasmid AD1: SCARq-PPA2-F; Plasmid JB1: SCARq-LMU4-F

<sup>2</sup> Plasmid AD1 und JB1: R\_allact\_IS

<sup>3</sup> Produkt aus dem Restriktionsverdau

Nach der PCR erfolgte eine Auftrennung des PCR-Produktes in einer Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion der ausgeschnittenen Bande (vgl. Abschnitt 2.5.3 und 2.5.4). Die Bestimmung der DNA-Konzentration des aufgereinigten PCR-Amplifikates wurde mit dem Gerät BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg) bei 260 nm durchgeführt. Eine Berechnung der Kopienzahl pro µl erfolgte mit der Formel nach Godornes et al. (2007):

$$\text{Kopien}/\mu\text{l} = \frac{(6,02 \times 10^{23} \text{Kopien}) \times (\text{Konzentration des Plasmids } \left[ \frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right])}{(\text{Anzahl der Basen}) \times (660 \frac{\text{Dalton}}{\text{Base}})}$$

Für die DNA-Sequenz von AD1 mit insgesamt 629 bp und einer DNA-Konzentration von 51 ng/µl errechnete sich eine Kopienzahl von  $7,38 \times 10^{10}$  pro µl. Die DNA-Sequenz von JB1 umfasste 577 bp und die DNA-Konzentration lag bei 73 ng/µl, sodass sich eine Kopienzahl von  $1,15 \times 10^{11}$  pro µl ergab. Für den Standard bei der Quantifizierung wurde eine dekadische Verdünnungsreihe von  $10^{11}$  bis  $10^3$  Kopien pro ml mit PCR-Wasser hergestellt.

Die qPCR wurde mit Sso Advanced™ Universal SYBR®Green Supermix (BioRad, München) im Mastercycler RealPlex<sup>2</sup> (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das qPCR-Programm und der Ansatz pro Reaktion ist Tab. 2. 22 zu entnehmen.

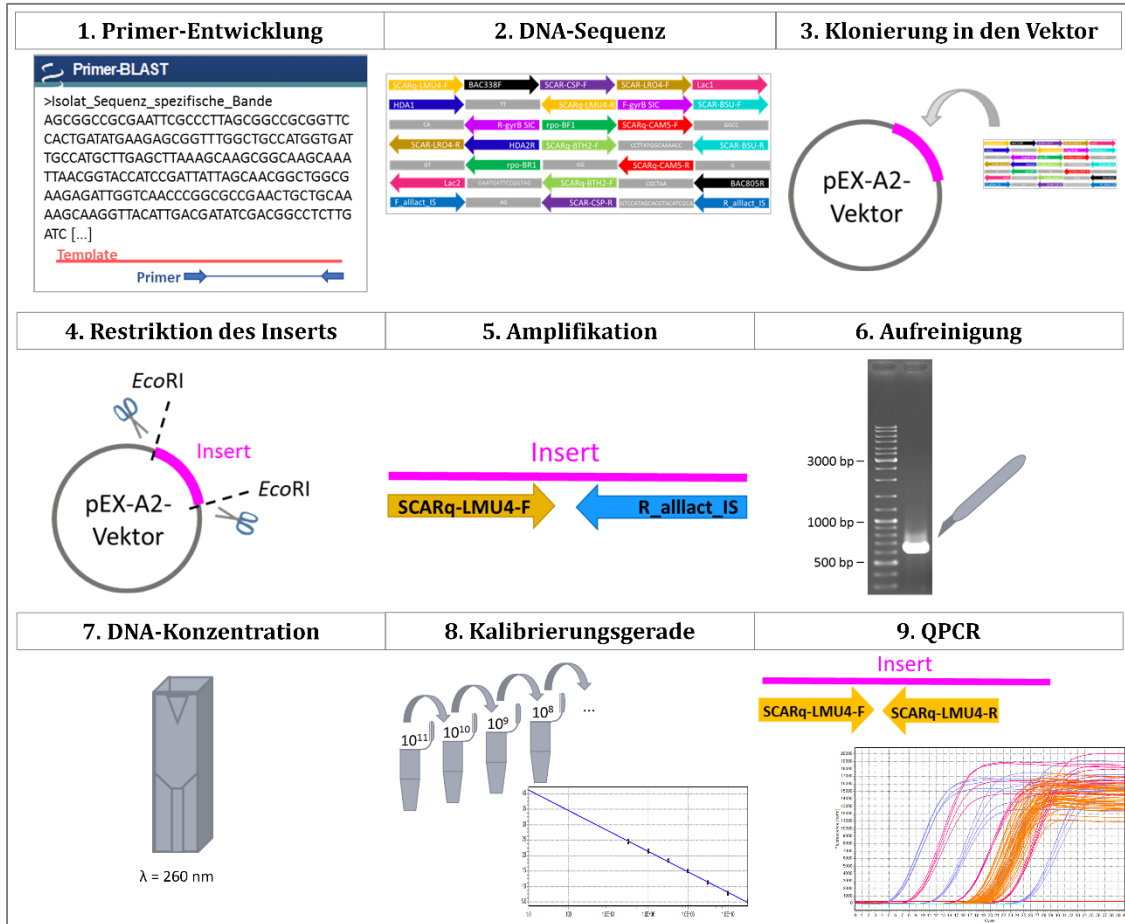
**Tab. 2. 22: PCR-Programm und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR.**

PCR-Programm				PCR-Ansatz	
Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Komponente	Volumen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (2x)	10,00 µl
2	Denaturierung	94 °C	15 s	Forward Primer (10 µM)	0,75 µl
3	Annealing	Individuell <sup>1</sup>	30 s	Reverse Primer (10 µM)	0,75 µl
4	Elongation	72 °C	20 s	Template-DNA <sup>1</sup>	1,50 µl
5	40 Zyklen (Nr. 2 – 4)			PCR-H <sub>2</sub> O	7,00 µl
6	Schmelzkurve	95 °C	20 s	Gesamtvolumen	20,00 µl
7		60 °C	15 s		
8	Temperaturanstieg	60 °C (+1 °C)	1 min		
9	35 Zyklen (Nr. 8)				
10		95 °C	15 s		

<sup>1</sup> die Annealing-Temperatur wurde an das jeweilige Primerpaar angepasst.

Als Standard wurden bei jedem PCR-Ansatz fünf Verdünnungsstufen der primertragenden DNA-Sequenz mitgeführt. Die „cycle-threshold“-Werte ( $C_T$ -Werte) der Standard-Verdünnungsstufen, der Negativprobe und der unbekanntes Fermenterproben wurden in vier getrennten Ansätzen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft Office, 2013). Anhand der  $C_T$ -Werte (y-Achse) und dem Logarithmus der Verdünnungsstufen (x-Achse) des Standards konnte eine Standardkurve erstellt werden, die einen Rückschluss auf die Ausgangsmengen der zu bestimmenden unbekanntes Proben zulässt.

Einen Überblick über den Ablauf der angewandten Methode, zum quantitativen Nachweis der Isolate in Fermenterproben der Biogasanlagen, ist in Abb. 2. 4 graphisch dargestellt.



**Abb. 2. 4:** Schema zur Vorgehensweise der qPCR nach May et al. (2015). (1) Entwicklung spezifischer Primer (2) Erstellung einer synthetischen DNA-Sequenz mit den Primersequenzen (3) Fragmentsynthese und Klonierung in den pEX-A2-Vektor durch Eurofins Genomics (Ebersberg) (4) Restriktion des Inserts mit dem Enzym *EcoRI* (5) Amplifikation der DNA-Sequenz mit dem ersten und letzten Primer der synthetischen DNA-Sequenz (6) Aufreinigung der Sequenz durch Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion (7) Bestimmung der DNA-Konzentration (8) Herstellen einer Verdünnungsreihe des Amplifikates als Standard für die qPCR (9) Bestimmung der Kopienanzahl eines Isolates durch qPCR in Fermenterproben.

### 3. Ergebnisse

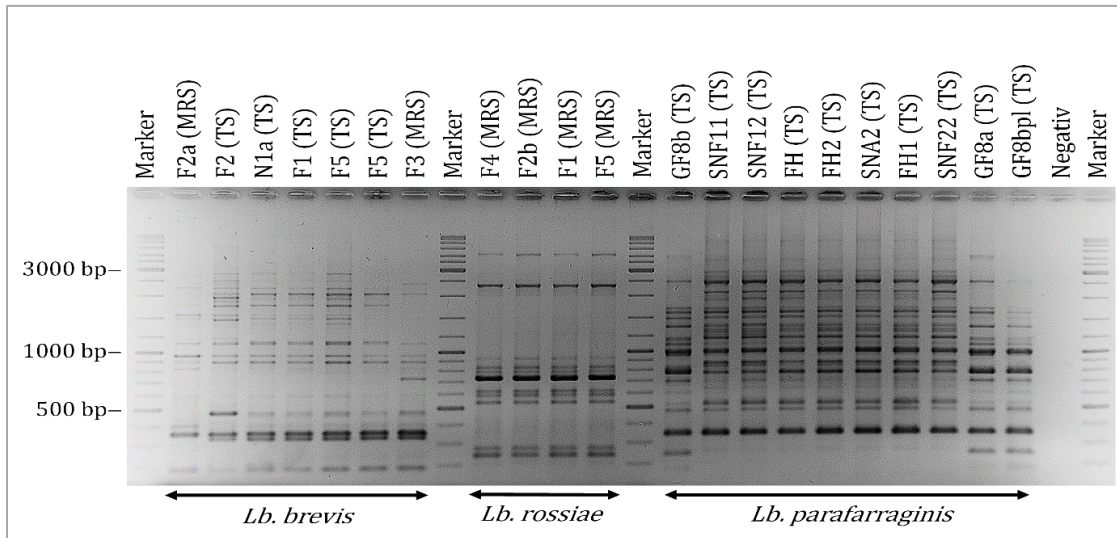
#### 3.1 Diversität milchsäurebildender Bakterien in Biogasanlagen

Die Isolierung der milchsäurebildenden Bakterien erfolgte aus Maissilage- und Fermenterproben, die in den Jahren 2012 bis 2015 bezogen wurden. Es wurden Medien verwendet, welche die Isolierung bestimmter Gattungen begünstigen sollten (vgl. Abschnitt 2.2.3). Die Isolate wurden durch eine Kombination verschiedener Isolierungsstrategien unter aeroben und anaeroben Bedingungen gewonnen. Neben dem Ausplattieren und der Tiefagar-Verdünnungsmethode, wurde hauptsächlich der Vereinzelungsausstrich angewandt.

Es konnten insgesamt 327 Reinkulturen isoliert werden. Die anschließende Untersuchung auf Milchsäurebildung mittels HPLC zeigte, dass 199 milchsäurebildende Bakterien aus Maissilage- und Fermenterproben isoliert wurden. Durch die SAPD-PCR konnten die Isolate aufgrund ihres charakteristischen Bandenmusters in Gruppen unterteilt werden. Die Einteilung der Isolate in die verschiedenen Gruppen kann Tab. 7. 9 und Tab. 7. 10 (vgl. Abschnitt 7.6) entnommen werden. Die Isolate konnten zu insgesamt 21 verschiedenen Gruppen zusammengefasst werden. Diese Gruppen sind in Tab. 3. 1 aufgelistet, wobei jeweils ein Isolat pro Gruppe ausgewählt und im Folgenden näher untersucht wurde.

Das ausgewählte Isolat wurde zunächst einer Analyse des 16 S rRNA-Gens unterzogen, um eine Identifizierung auf Artebene zu erreichen. Bei geringen Sequenzunterschieden war lediglich die Zuordnung zu einer Gruppe möglich, die mehrere Arten zusammenfasste.

Beispielhaft sind in Abb. 3. 1 die Gruppierung der Stämme von *Lb. brevis*, *Lb. rapi* und *Lb. parafarraginis* gezeigt.



**Abb. 3. 1: SAPD-PCR-Produkte der Isolate nach gelelektrophoretischer Auftrennung.** Gruppierung der verschiedenen Stämme und Artzuweisung von *Lb. brevis*, *Lb. rari* und *Lb. parafarraginis*. Die Stammbezeichnungen befinden sich über den einzelnen Bandenmustern. Negativ = Negativkontrolle.

Alle isolierten milchsäurebildenden Bakterien gehören zum Phylum Firmicutes und zu insgesamt drei Ordnungen: Bacillales, Lactobacillales und Clostridiales. Im Folgenden werden die Isolate, die angewandte Isolierungsstrategie und die durch HPLC detektierten Stoffwechselprodukte im jeweiligen Medium kurz zusammengefasst. Das zur Isolation verwendete Medium ist in Klammer hinter der Stammbezeichnung der Isolate angegeben.

Durch das Ausplattieren und Ausstreichen von Anreicherungskulturen wurden unter aeroben Bedingungen folgende Isolate gewonnen: NH1.9 (LB), F2d (LB), LiF4 (LB), GIN1.7 (LB), LiF4a (D1), F2a (MRS), SNF22 (MRS), GF8b (TS) und F4 (MRS). Für die Isolate NH1.9 (LB), F2d (LB), LiF4a (D1) und NF10 (MRS) wurde außer Milchsäure keine weiteren Substanz detektiert. GIN1.7 (LB), LiF4 (LB) und NF10 (MRS) hingegen zeigten zusätzlich eine Essigsäurebildung. Milchsäure, Essigsäure und Ethanol wurden bei den Isolaten F2a (MRS), SNF22 (MRS), GF8b (TS) und F4 (MRS) gebildet.

Bei der Anwendung der MPN-Methode wurden einige Isolate aus den Verdünnungsreihen gewonnen: GIS6e (TS) wurde aus einer Maissilageprobe der Verdünnungsstufe  $10^{-6}$  isoliert und zeigte bei der HPLC-Analyse neben der Bildung von Milchsäure, Bernsteinsäure und Essigsäure als Nebenprodukte. Für das aus einer Verdünnungsstufe von  $10^{-7}$  isolierte Bakterium NB1 (TS) wurden Milchsäure, Essigsäure und Ethanol nachgewiesen.

Das Isolat N91 (MD) wurde aus einer Verdünnungsstufe von  $10^{-8}$  des anaeroben MD-Mediums mit Stärke als Kohlenstoffquelle isoliert. Geht man davon aus, dass die gesamte Stärke in Glucose umgesetzt wurde, ergibt sich eine stöchiometrische Beziehung für die Bildung von Milchsäure aus Glucose von 1 mol Glucose und 1,34 mol Milchsäure. Die HPLC detektierte keine weiteren Nebenprodukte. Aus demselben Medium wurde aus einer Verdünnungsstufe von  $10^{-7}$  das Isolat N83 (MD) isoliert, bei welchem keine weiteren Nebenprodukte nachgewiesen werden konnten.

Bei der Isolierungsstrategie des Vereinzelausstriches aus Anreicherungskulturen unter anaeroben Bedingungen wurden folgende Isolate erhalten: Gl2a (M104), GeFf (M58), G4 (M58), LiF1 (M104) und NF3 (M58). Die Isolate Gl2a (M104), GeFf (M104) und LiF1 (M104) bildeten neben Milchsäure, Essigsäure und Ethanol. Milchsäure als alleiniges Stoffwechselprodukt konnte hingegen bei den Isolaten G4 (M58) und NF3 (M58) nachgewiesen werden.

Die Reinkulturen NH2b (M104) und NF2b (M104) konnten mit der Tiefagar-Methode zur Isolierung anaerob wachsender Bakterien gewonnen werden. Beide Isolate bildeten Milchsäure und Ethanol, wobei für das Isolat NF2b (M104) zusätzlich noch Essigsäure, Diacetyl und Buttersäure detektiert wurde.

Im Folgenden wird auf die Identifizierung der Isolate anhand der 16S rDNA näher eingegangen.

### **3.2 Phylogenetische Einordnung der milchsäurebildenden Isolate**

Die 16S rDNA-Sequenz der Isolate ermöglichte eine Identifizierung der Isolate. Bei zahlreichen Isolaten zeigte die 16S rDNA-Analyse, dass pro Isolat mehrere Arten eine Ähnlichkeit der Basenabfolge von über 97 % besitzen (vgl. Abschnitt 7.7). Daher konnten manche Isolate auf Basis der 16S rDNA lediglich einer Gruppe zugeordnet werden, die mehrere Arten inkludiert. Die Ergebnisse der nächsten Verwandten der Isolate sind Tab. 3. 1 und der weiteren in diesem Abschnitt erwähnten Verwandten mit ebenfalls hoher Ähnlichkeit sind im Anhang in Tab. 7. 11 aufgeführt. Das zur Isolation verwendete Medium ist in Klammer hinter der Stammbezeichnung der Isolate angegeben.

**Tab. 3. 1: Identifizierung der Isolate anhand der 16S rDNA-Sequenz.**

Stamm <sup>1</sup>	Gebildete Produkte <sup>2</sup>	Genbank Accession-Nr.	Fragmentlänge [bp] <sup>3</sup>	Ähnlichkeit [%] <sup>4</sup>	Nächster Verwandter oder nächstverwandte Gruppe	Familie	Ordnung	Phylum
NH1.9 (LB)	M	KX010088	1245	100,00	<i>Bacillus aerophilus</i> -Gruppe	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
F2d (LB)	M	KX010085	1076	99,91	<i>Bacillus cereus</i> -Gruppe			
N83 (MD)	M	KX010086	1444	100,00	<i>Bacillus coagulans</i> IAM-12463 <sup>(T)</sup>			
LiF4 (LB)	M, E	KX010087	1436	99,51	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC-14580 <sup>(T)</sup>			
GIN1.7 (LB)	M, E	KX010089	1293	99,92	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC-7061 <sup>(T)</sup>			
LiF4a (D1)	M	KX010090	1451	99,93	<i>Bacillus subtilis</i> -Gruppe			
GI2a (M104)	M, E, Et	KX010091	1391	98,99	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> CNCMI-1378 <sup>(T)</sup>			
F2a (MRS)	M, E, Et	KX010095	1458	99,86	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC-14869 <sup>(T)</sup>	Lactobacillaceae	Lactobacillales	
NB1 (TS)	M, E, Et,	KX010096	1436	100,00	<i>Lactobacillus buchneri</i> JCM-1115 <sup>(T)</sup>			
GI6e (MRS)	M, E, Be	KX010097	1350	98,66	<i>Lactobacillus farraginis</i> JCM-14108 <sup>(T)</sup>			
SNF22 (MRS)	M, E, Et	KX010098	1454	99,86	<i>Lactobacillus kefir</i> LMG-9480 <sup>(T)</sup>			
NH2b (M104)	M, Et	KX010099	1409	99,86	<i>Lactobacillus mucosae</i> S-32 <sup>(T)</sup>			
GF8b (TS)	M, E, Et	KX010100	1441	100,00	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> NRIC0677 <sup>(T)</sup>			
GeFf (M58)	M, E, Et	KX010101	1465	100,00	<i>Lactobacillus rami</i> YIT-11204 <sup>(T)</sup>			
F4 (MRS)	M, E, Et	KX010102	1460	99,93	<i>Lactobacillus rossiae</i> DSM-15814 <sup>(T)</sup>			
G4 (M58)	M	KX010104	1260	99,68	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM-20284 <sup>(T)</sup>			
NF10 (MRS)	M	KX010105	1382	100,00	<i>Pediococcus parvulus</i> JCM-5889 <sup>(T)</sup>			
N91 (MD)	M	KX010106	1439	99,93	<i>Streptococcus equinus</i> -Gruppe	Streptococcaceae		
LiF1 (M104)	M, E, Et	KX010093	1450	99,37	<i>Clostridium aminovalericum</i> DSM-1283 <sup>(T)</sup>	Lachnospiraceae	Clostridiales	
NF2b (M104)	M, E, Et, D, B	KX010094	1398	98,93	<i>Clostridium botulinum</i> -Gruppe	Clostridiaceae		
NF3 (M58)	M	KX010103	1409	93,25	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> ATCC23263 <sup>(T)</sup>	Eubacteriaceae		

<sup>1</sup> In Klammern ist jeweils das zur Isolation verwendete Medium angegeben.

<sup>2</sup> B = Buttersäure, Be = Bernsteinsäure, D = Diacetyl, E = Essigsäure, Et = Ethanol, M = Milchsäure

<sup>3</sup> Anzahl der in der Datenbank EzTaxon eingegebenen Nukleotide der 16S rDNA.

<sup>4</sup> Ähnlichkeit des Isolates zum nächsten Verwandten oder nächstverwandten Mitglied einer Gruppe (vgl. Abschnitt 7.7).

### 3.2.1 Isolate der Ordnung Bacillales

Insgesamt konnten sieben verschiedene Bandenmuster der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden (vgl. Abschnitt 7.6). Durch die 16S rDNA-Sequenzanalyse konnte das Isolat NH1.9 (LB) der Gruppe *B. aerophilus* zugeordnet, da eine Ähnlichkeit von 100 % zu den Arten *B. aerophilus* und *B. stratosphericus* vorlag, die beide zur *B. aerophilus*-Gruppe gehörten. Dieses Isolat zeigte zu der zweit nächstverwandten Art *B. pumilus* einen Unterschied von 7 Basen. Auch das Isolat F2d (LB) wurde einer Gruppe zugeordnet: *B. cereus*. Diese Gruppe beinhaltet neben *B. cereus* die Arten *B. anthracis*, *B. thuringiensis* und *B. toyonensis*. Die Basenpaarunterschiede lagen lediglich bei ein bis zwei Basen. Der Nächstverwandte des Isolates N83 (MD) war mit 99,51 % Ähnlichkeit *B. coagulans* mit einem Abstand von 34 Basen zur zweitplatzierten Art *B. acidiproducens*. Auch bei dem Isolat GI2a (M104) ergab die 16S rDNA-Analyse eine Ähnlichkeit von 98,99 % zu *B. thermoamylovorans* mit einem Unterschied von 57 Basen zur zweitplatzierten Art. *B. licheniformis* war der Nächstverwandte zu Isolat LiF4 (LB), wobei sich *B. aerius* und *B. sonorensis* lediglich in einer und drei Basen unterschieden. Das Isolat GIN1.7 (LB) zeigte die größte Ähnlichkeit zu *B. pumilus*, welches mit jeweils fünf Basen von den Arten *B. aerophilus* und *B. stratosphericus* abgetrennt wurde. Eine Gruppenzuordnung erfolgte bei dem Isolat LiF4a (D1), das große Ähnlichkeit zu insgesamt zehn Arten aufwies, die allesamt zur Gruppe *B. subtilis* zählten.

### 3.2.2 Isolate der Ordnung Lactobacillales

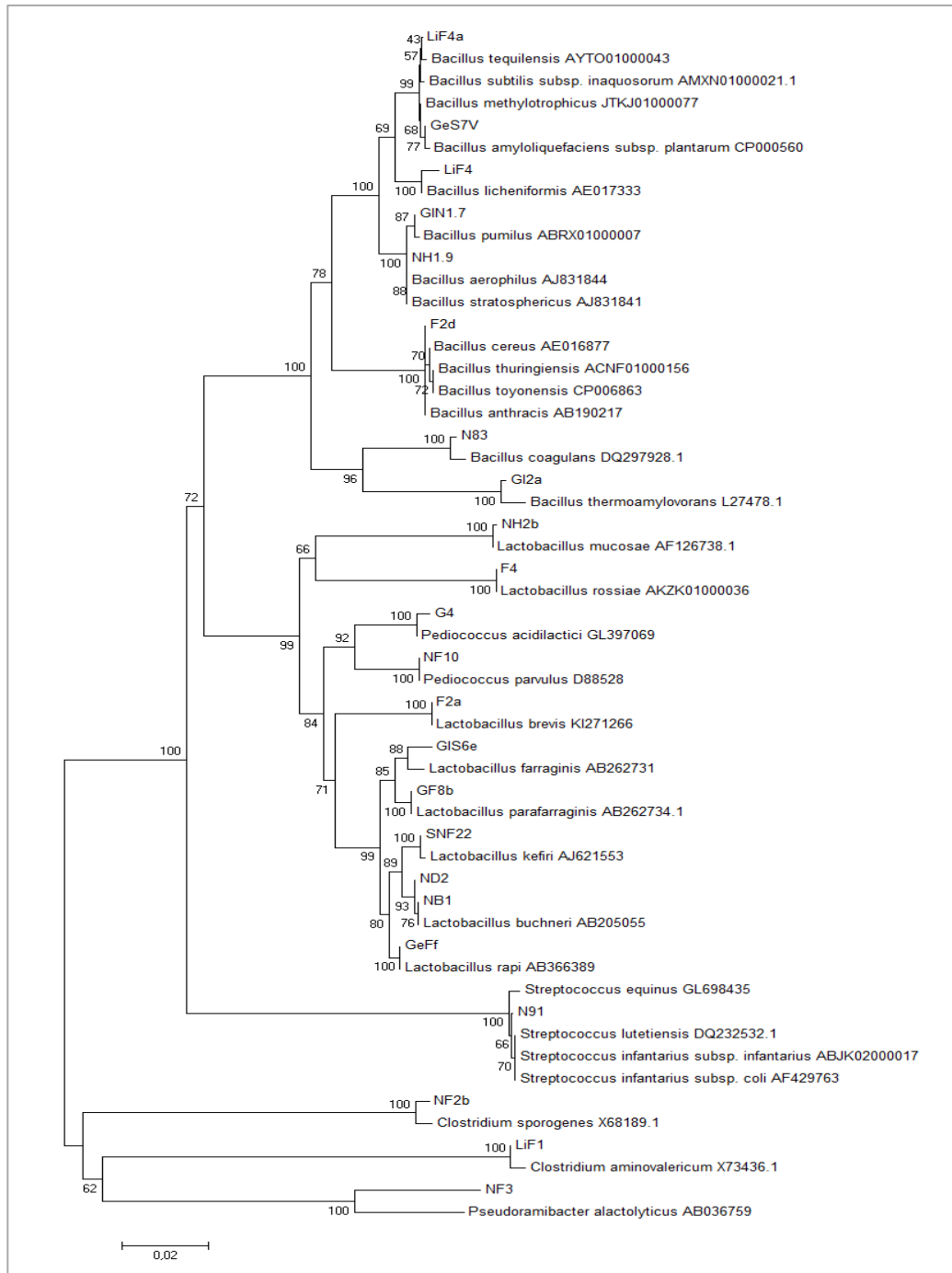
Anhand der Bandenmuster der gelelektrophoretisch aufgetrennten SAPD-PCR-Produkte, konnten elf verschiedene Arten der Ordnung Lactobacillales zugeordnet werden (vgl. Abschnitt 7.6). Die 16S rDNA-Sequenzanalyse ermöglichte lediglich eine Gruppenzuordnung des Isolates N91 (MD) zur *S. equinus*-Gruppe, da die Vertreter dieser Gruppe: *S. equinus*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius* subsp. *infantarius* und *S. infantarius* subsp. *coli* sich in nur ein bis vier Basen unterschieden. Die jeweils nächsten Verwandten der Isolate *Lb. brevis* F2a (MRS), *Lb. mucosae* NH2b (M104), *Lb. parafarraginis* GF8b (TS), *Lb. rapi* GeFf (M58), *Lb. rossiae* F4 (MRS) wiesen einen Basenunterschied von größer 20 Basen, *Lb. kefir* SNF22 (MRS) und *P. parvulus* NF10 (MRS) von größer 10 Basen, zur zweit nächsten Art auf (Tab. 7. 11). Das Isolat NB1 (TS) konnte zu 100 % *Lb. buchneri* zugeordnet werden, gefolgt von *Lb. sunkii* mit acht unterschiedlichen Basen. Eine relativ geringe Ähnlichkeit von 98,66 % ergab die 16S rDNA-Analyse für das Isolat GIS6e (MRS) mit *Lb. farraginis*, welches aus einer Silageprobe isoliert wurde. Das Isolat G4 (M58) zeigte

eine hohe Ähnlichkeit zu *P. acidilactici* und *P. lolii*. Die Zuordnung gelang über einen Temperaturtest, der die beiden Arten eindeutig voneinander trennte und *P. acidilactici* als nächsten Verwandten bestätigte.

### 3.2.3 Isolate der Ordnung Clostridiales

Das Isolat LiF1 konnte mit einer Ähnlichkeit von 99,37 % der Art *C. aminovalericum* zugeordnet werden. Die zweite nächstverwandte Art grenzte sich mit 63 unterschiedlichen Basen von *C. aminovalericum* ab. Eine Zugehörigkeit zur *C. botulinum*-Gruppe ergab die Analyse des Isolates NF2b (M104). Hierzu zählten die Arten *C. sporogenes*, *C. botulinum* und *Eubacterium combesii*, die sich mit 12, 13 und 15 Basen von der Sequenz des Isolates unterschieden. Das Isolat NF3 (MD) zeigte mit 93,25 % die geringste Ähnlichkeit mit der nächstverwandten Art *Pseudoramibacter alactolyticus*, wobei sich die nächste Art *Eubacterium barkeri* durch weitere fünf Basen abgrenzte.

Auf Grundlage der 16S rDNA-Sequenzen konnte mit dem Programm MEGA6 (Tamura et al., 2013) ein Neighbor Joining Stammbaum (Saitou & Nei, 1987) erstellt werden. Es wurden sowohl 16S rDNA-Sequenzen der Isolate als auch der Referenzstämme berücksichtigt. Die letztgenannten 16S rDNA-Sequenzen wurden von den Datenbanken BLAST und EzTaxon bezogen. Die Bootstrap-Werte über den Verzweigungen der Äste wurden nach der Maximum Likelihood-Methode berechnet (Felsenstein, 1985; Tamura et al., 2004). Insgesamt wurden 1076 bp je Isolat für die Stammbaumberechnung verwendet.



**Abb. 3. 2: Neighbor Joining-Stammbaum auf der Basis der 16S-rDNA der Isolate und verwandter Typstämme.** Für die Berechnung des Stammbaums wurde der Neighbor Joining-Algorithmus verwendet (Saitou & Nei, 1987). Die prozentualen Bootstrap-Werte über den Verzweigungen der Äste wurden aus 1000 Wiederholungen errechnet (Felsenstein, 1985). Die Maximum Composite Likelihood-Methode wurde für die Berechnung evolutionärer Distanzen verwendet (Tamura et al., 2004). Der Maßstab entspricht einer phylogenetischen Distanz von 2 %. Die Accession-Nummern der Datenbank BLAST der verwendeten Typstämmen sind hinter dem jeweiligen Artnamen angegeben. Die Accession-Nummern der Isolate sind Tab. 3. 1 zu entnehmen.

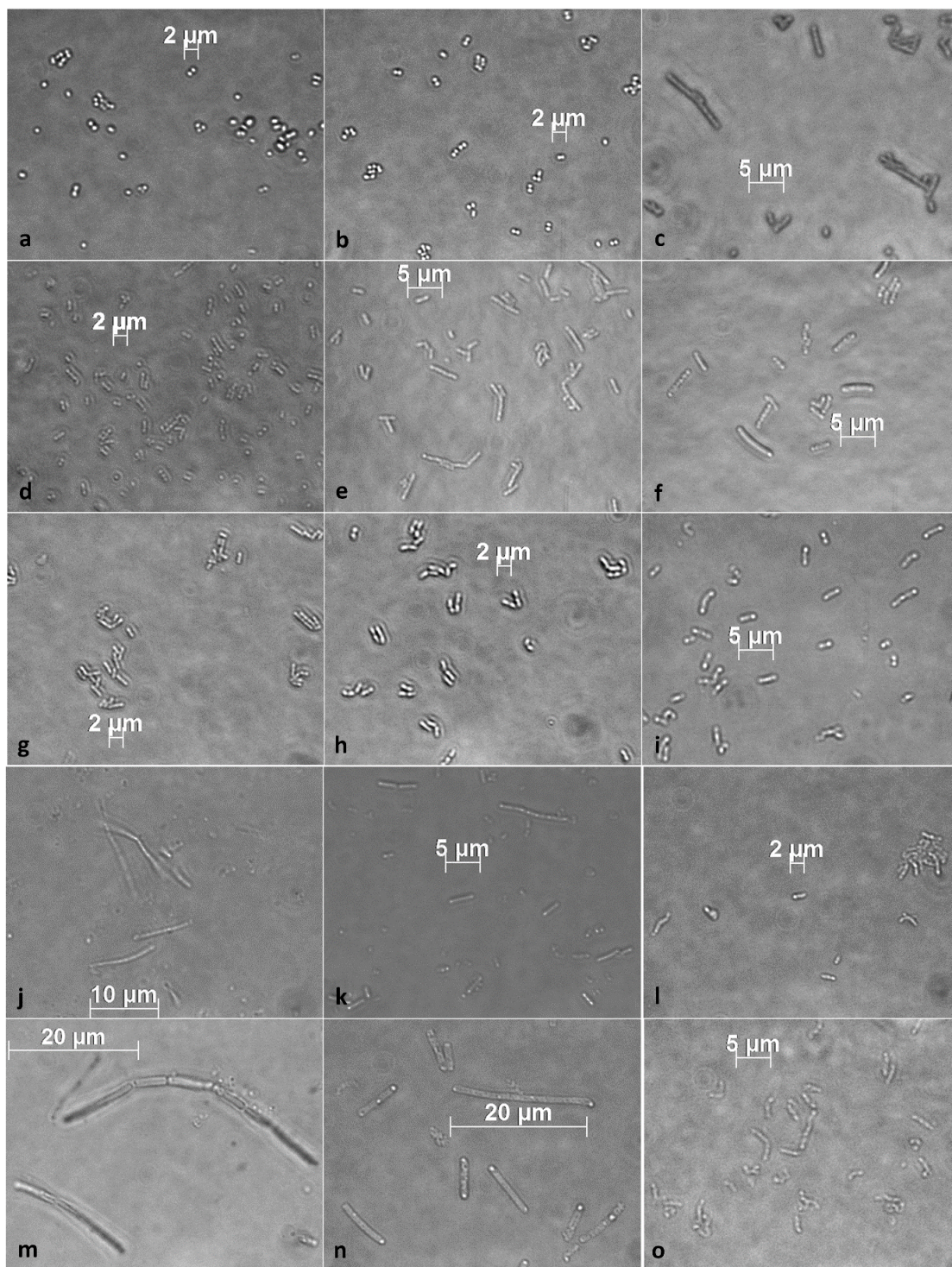
Der Neighbor Joining-Stammbaum in Abb. 3. 2 zeigt eine deutliche Clusterbildung der Ordnungen: Bacillales, Lactobacillales und Clostridiales. Unter den Lactobacillales bildeten Vertreter der Streptococcaceae ein zusätzliches Cluster. Nach der Identifizierung und phylogenetischen Einordnung der Isolate, stand deren Morphologie und Stoffwechseleigenschaften im Fokus dieser Arbeit.

### 3.3 Morphologische und physiologische Charakterisierung ausgewählter Isolate

Die Charakterisierung der Isolate beinhaltete phasenmikroskopische Aufnahmen, Tests auf Kohlenstoffverwertbarkeit und die Untersuchung der Stereoisomerie der gebildeten Milchsäure.

#### 3.3.1 Morphologie der Isolate

Morphologische Untersuchungen wurden für *Pediococcus*-, *Bacillus*-, *Lactobacillus*-, und *Clostridium*-Isolate durchgeführt (Abb. 3. 3). Die *Pediococcus*-Isolate traten als einzelne Kokken ( $< 1 \mu\text{m}$ ) oder in Paaren auf (Abb. 3. 3 a, b). Lactobazillen bildeten stäbchenförmige Zellen, wobei die Länge zwischen den Arten variierte. *Lb. brevis* F2a bildete teilweise relativ große und breite Stäbchen ( $> 5 \mu\text{m}$ , Abb. 3. 3 c). Im Gegensatz dazu waren die stäbchenförmigen Zellen von *Lb. buchneri* NB1 sehr klein und dünn (Abb. 3. 3 d). Die Stäbchen waren einzeln ( $< 0,5 \mu\text{m}$ , *Lb. rossiae* F4, Abb. 3. 3 h) oder als Zellzusammenschluss in Ketten (ca.  $6 \mu\text{m}$ , *Lb. kefiri* SNF22, Abb. 3. 3 e) vorzufinden. Eine stäbchenförmige Zellform wiesen ebenso die *Bacillus*-Isolate auf. Die Stäbchen von *B. pumilus* G1N1.7 und *B. thermoamylovorans* G12a maßen eine Länge von ca.  $2 - 4 \mu\text{m}$  (Abb. 3. 3 k, l). Deutlich größere Stäbchen zeigten sich bei Betrachtung der Isolate *B. licheniformis* LiF4 und *B. cereus*-Gr. F2d, die teilweise leicht gebogen und häufig in Zellketten mit einer Länge  $> 20 \mu\text{m}$  auftraten (Abb. 3. 3 j, m). Auch die Zellen der anaeroben *Clostridium*-Isolate besaßen eine stäbchenförmige Gestalt. *C. botulinum*-Gr. NF2b zeigte deutlich längere Zellen (bis zu  $20 \mu\text{m}$ ), während die Stäbchen von Isolat *C. aminovalericum* LiF1 leicht gebogen waren (Abb. 3. 3 n, o).



**Abb. 3. 3: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Morphologie ausgewählter milchsäurebildender Isolate.** (a) *P. acidilactici* G4 (b) *P. parvulus* NF10 (c) *Lb. brevis* F2a (d) *Lb. buchneri* NB1 (e) *Lb. kefir* SNF22 (f) *Lb. parafarraginis* GF8b (g) *Lb. rapi* GeFf (h) *Lb. rossiae* F4 (i) *Lb. mucosae* NH2b (j) *B. licheniformis* LiF4 (k) *B. pumilus* GIN1.3a (l) *B. thermoamylovorans* Gl2a (m) *B. anthracis*-Gruppe F2d (n) *C. botulinum*-Gruppe NF2b (o) *C. aminovalericum* LiF1.

### 3.3.2 Abbaufähigkeit von Polymeren und diverser Kohlenhydratverbindungen

Die Verwertbarkeit von bestimmten Kohlenhydratverbindungen wurde bei insgesamt 14 Isolaten der Gattungen *Bacillus*, *Lactobacillus* und *Pediococcus* untersucht. Hierfür wurde der API 50 CH Test verwendet, welcher die gleichzeitige Überprüfung 49 verschiedener Kohlenhydrate erlaubt (vgl. Abschnitt 2.4.3). Die Abbautests der Polymere wurden separat mit festen, spezifischen Nährmedien durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.4.4). Die Ergebnisse sind in Tab. 3. 2 dargestellt. Alle getesteten Isolate zeigten eine umfassende Abbaufähigkeit der überprüften Kohlenhydratverbindungen, insbesondere für Oligo- und Monosaccharide. Einige der im API 50 CH Test enthaltenen Kohlenstoffe sind für eine Biogasanlage von besonderem Interesse. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

Das Disaccharid Cellobiose konnte von den *Bacillus*-Isolaten *B. aerophilus*-Gr. NH1.9, *B. cereus*-Gr. F2d, *B. licheniformis* LiF4, *B. pumilus* Gln1.7, den *Lactobacillus*-Isolaten *Lb. brevis* F2a, *Lb. parafarraginis* GF8b und *Pediococcus*-Isolaten *P. acidilactici* G4 und *P. parvulus* NF10 verwertet werden. D-Glucose konnte von allen getesteten Isolaten mit Ausnahme des Isolates *Lb. rapi* GeFf in Säure umgewandelt werden. Die Säurebildung mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle konnte für alle Testorganismen bis auf *B. cereus*-Gr. F2d, *Lb. rossiae* F4, *P. acidilactici* G4 und *P. parvulus* NF10 gezeigt werden. Auch D-Galactose konnte von den meisten Organismen mit Ausnahme von *B. aerophilus*-Gr. NH1.9, *B. cereus*-Gr. F2d, *Lb. rapi* GeFf und *Lb. rossiae* F4 verwertet werden. Eine Umwandlung von D-Mannose in Säure wurde bei über der Hälfte der getesteten Isolate, wozu *B. aerophilus*-Gr. NH1.9, *B. licheniformis* LiF4, *B. pumilus* Gln1.7, *Lb. brevis* F2a, *Lb. parafarraginis* GF8b, *Lb. rossiae* F4, *P. acidilactici* G4 und *P. parvulus* NF10 zählten, nachgewiesen. Die Umsetzung von D-Xylose wurde ebenfalls bei den meisten Testorganismen beobachtet. Lediglich *B. cereus*-Gr. F2d, *Lb. kefir* SNF22, *Lb. rossiae* F4 und *P. parvulus* NF10 waren hierzu nicht in der Lage. Das *P. parvulus*-Isolat NF10 konnte keine Pentosen verwerten. Beim Vergleich der Testorganismen zeigte das *B. licheniformis*-Isolat LiF4 insgesamt die umfassendste Abbaufähigkeit. Das Isolat *Lb. rapi* GeFf hingegen konnte die geringste Anzahl an getesteten Kohlenstoffquellen in Säure umwandeln. Unter den Milchsäurebakterien wies das *Lb. parafarraginis*-Isolat GF8b das größte Spektrum an der Verwertbarkeit von Kohlenstoffverbindungen auf. Insbesondere für Disaccharide.

Polymere konnten offensichtlich nur die *Bacillus*-Isolate verwerten. Dabei zeigten alle *Bacillus*-Isolate einen Lysehof mit Carboxymethylcellulose. Xylan wurde bis auf das Isolat *B. cereus*-Gr. F2d ebenfalls von allen *Bacillus*-Arten abgebaut. Stärke konnte nur von

*B. coagulans* N83 und *B. licheniformis* LiF4 genutzt werden. Das Isolat *S. equinus*-Gr. N91 konnte aus einem Medium isoliert werden, welches Stärke als einzige Kohlenstoffquelle besitzt. Eine Verflüssigung der Gelatine konnte bei den Isolaten *B. cereus*-Gr. F2d, *B. coagulans* N83 und *B. licheniformis* LiF4 beobachtet werden.

Tab. 3. 2: Übersicht der Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen durch einige ausgewählte Isolate.

Kohlenstoffquelle		Stammbezeichnungen														
		NH 1.9	F2d	N83	LiF4	GIN 1.7	F2a	NB1	SNF 22	NH 2b	GF 8b	GeFf	F4	G4	NF 10	N91
Polymer	Cellulose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Gelatine	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Glykogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Stärke	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Xylan	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
Trisaccharid	D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	D-Raffinose	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	NÜ
Disaccharid	D-Cellobiose	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	NÜ
	Gentiobiose	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	NÜ
	D-Lactose (bovin)	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	NÜ
	D-Maltose	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	NÜ
	D-Melibiose	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	NÜ
	D-Saccharose	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	NÜ
	D-Trehalose	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	NÜ
	D-Turanose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	NÜ
Hexose	D-Fructose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NÜ
	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NÜ
	D-Galactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	NÜ
	D-Mannose	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	NÜ
	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	D-Tagatose	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	NÜ
Pentose	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	L-Arabinose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	NÜ

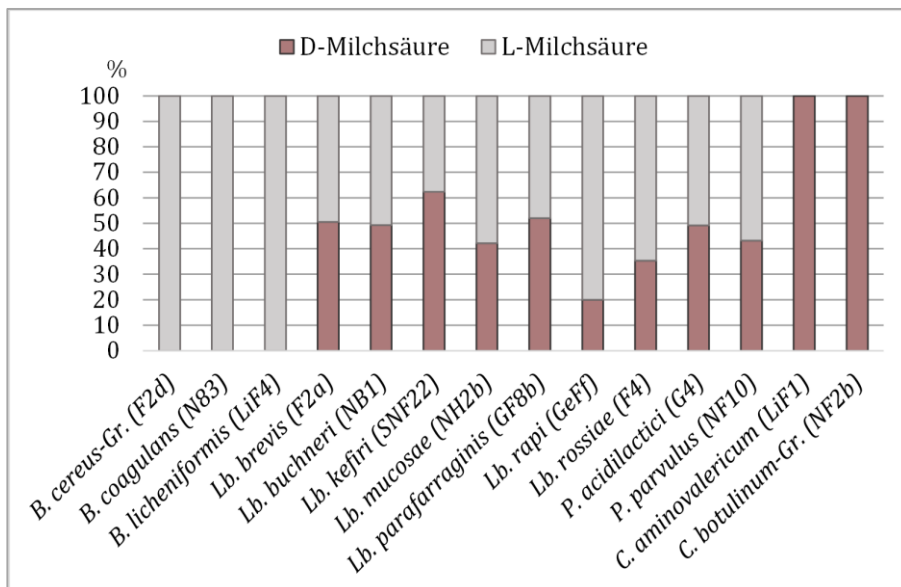
Fortsetzung Tab. 3. 2.

Kohlenstoffquelle		Stammbezeichnungen														
		NH 1.9	F2d	N83	LiF4	GLN 1.7	F2a	NB1	SNF 22	NH 2b	GF 8b	GeFf	F4	G4	NF 10	N91
Pentose	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NÜ
	D-Xylose	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	NÜ
	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
Aminozucker	N-Acetylglucosamin	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	NÜ	
Glycosid	Amygdalin	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	NÜ
	Arbutin	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NÜ
	Esculin Eisencitrat	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	NÜ
	Methyl-β-D-Xylopyranosid	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	NÜ
	Methyl-α-D-Mannopyranosid	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	NÜ
	Methyl-α-D-Glycopyranosid	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	NÜ
	Salicin	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	NÜ
Zuckeralkohol	D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	D-Arabitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	NÜ
	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Glycerin	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NÜ
	Inositol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	D-Mannitol	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	NÜ
	D-Sorbitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
	Xylit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÜ
Säure	Kaliumgluconat	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	NÜ
	Kalium-2-Ketogluconat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	NÜ
	Kalium-5-Ketogluconat	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	NÜ
Stereoisomerie der Milchsäure		NÜ	L	L	L	NÜ	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	NÜ

+ = Abbau, - = kein Abbau, NÜ= nicht überprüft

### 3.3.3. Stereoisomerie der gebildeten Milchsäure

Die Untersuchungen bezüglich der Stereoisomerie der gebildeten Milchsäure wurden durchgeführt, um die komplexen Stoffwechselwege in einem nächsten Schritt besser verstehen zu können. Die prozentualen Anteile der D- und L-Stereoisomere der gebildeten Milchsäure sind in Abb. 3. 4 graphisch dargestellt. Die Messwerte der Graphik können Tab. 7. 3 (vgl. Abschnitt 7.2) entnommen werden. Während die untersuchten *Bacillus*-Isolate ausschließlich L-Milchsäure bildeten, präferierten die anaeroben *Clostridium*-Isolate die Bildung von D-Milchsäure. Die Isolate der Gattungen *Lactobacillus* und *Pediococcus* favorisierten eine Mischung der beiden Stereoisomere zu unterschiedlichen Anteilen. Während die Isolate *Lb. brevis* F2a, *Lb. buchneri* NB1, *Lb. parafarraginis* GF8b und *P. acidilactici* G4 die Bildung von D- und L- Milchsäure in nahezu gleichen Mengen bildeten, überwog die Bildung von L-Milchsäure bei den Isolaten *Lb. mucosae* NH2b, *Lb. rossiae* F4, *P. parvulus* NF10 leicht und bei *Lb. rapi* GeFf deutlich. Im Gegensatz dazu zeigte *Lb. kefir* SNF22 als einziges Isolat eine stärkere D-Milchsäurebildung.

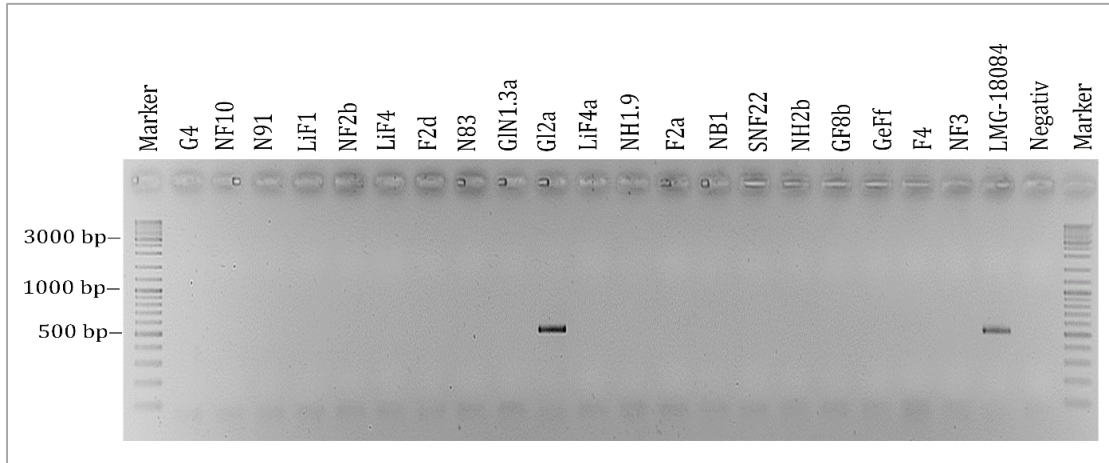


**Abb. 3. 4: Säulendiagramm mit prozentualer Anteilen an gebildeter D- und L- Milchsäure einiger ausgewählter Isolate.** Die *Bacillus*-Isolate bildeten ausschließlich D-Milchsäure und die *Clostridium*-Isolate L-Milchsäure. Die *Lactobacillus*-Isolate bevorzugten eine Mischung beider Stereoisomere.

### 3.4 Überprüfung der Spezifität der entwickelten Primer

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis der Isolate in Biogasanlagen wurden insgesamt 21 Primerpaare entwickelt. Die isolatspezifischen Sequenzen der verwendeten Genomabschnitte sind in Abschnitt 7.1 aufgeführt. Im Programm Primer-BLAST wurde gleichzeitig deren Spezifität unter Verwendung spezifischer Datenbanken bestätigt. Zusätzlich wurden alle Primer mit der DNA der bereits isolierten milchsäurebildenden Bakterien, des entsprechenden Isolats und des jeweiligen Typstamms, falls dieser vorhanden war, getestet. Dies ist in Abb. 3. 5 beispielhaft für das Primerpaar SCAR-BTH-F/R dargestellt. Stichprobenartig wurden auch weitere, in der Biogasanlage vorkommende, Säurebildner sowie Methanogene in die Überprüfung miteinbezogen (vgl. Abschnitt 7.2, Tab. 7. 1 und Tab. 7. 2). Primer, die unspezifische PCR-Produkte oder kein PCR-Produkt bildeten, wurden ersetzt.

Einen Überblick über die entwickelten Primerpaare für die Multiplex PCR gibt Tab. 3. 3 und für die qPCR Tab. 3. 4. Alle entwickelten Primerpaare, bis auf SCAR-LRO4-F/R, zeigten spezifische PCR-Produkte mit der DNA des entsprechenden Isolates und des Typstamms. Die Primerpaare für die Isolate *Lb. brevis* F2a, *B. aerophilus*-Gr. NH1.9, *B. licheniformis* LiF4a, *Ps. alactolyticus*-verwandt NF3 und *S. equinus*-Gr. N91 konnten nicht auf Amplifikat-Bildung mit der DNA des entsprechenden Typstamms überprüft werden, da diese nicht vorhanden waren. Für das Isolat *Ps. alactolyticus*-verwandt NF3 war es möglich, aufgrund einer relativ hohen Abweichung der Basenabfolge, ein isolatspezifisches Primerpaar auf Basis der 16S rDNA zu entwickeln. Für die Isolate *Lb. brevis* F2a (SCAR-LBR-F/R), *Lb. buchneri* NB1 (SCAR-LBU2-F/R), *P. parvulus* NF10 (SCAR-PPA-F/R), *B. cereus*-Gr. F2d (rpoBF1/rpoBR1) und *S. equinus*-Gr. N91 (F/R-gyrB SIC), sowie für die Bakterien (BAC338F/BAC805R) und Lactobazillen (F/R\_alllact\_IS) im Allgemeinen wurden Primer aus der Literatur verwendet (Tab. 3. 4). Das zuletzt genannte Primerpaar bildete nicht nur mit Lactobazillen, sondern auch mit Vertretern der Gattung *Pediococcus* ein PCR-Produkt. Dies wurde sowohl durch Überprüfung mit den *Pediococcus*-Isolaten als auch durch die Datenbank BLAST bestätigt. Auch für das Primerpaar F/R-gyrB SIC, das nach Lopes et al. (2014) spezifisch für *S. infantarius* subsp. *coli* sein soll, wurde bei Abgleich mit der Datenbank BLAST ein PCR-Produkt für alle vier Arten der *S. equinus*-Gruppe vorausgesagt. Das Primerpaar rpoBF1/rpoBR1 bindet an *B. cereus* und *B. anthracis* (Qi et al., 2001). Dies konnte durch Primer-BLAST bestätigt werden. Für die Isolate GIN1.7, SNF22, GIS6e und NF2b war es nicht möglich, spezifische Primer zu entwickeln. In Abb. 3. 5 ist beispielhaft die Überprüfung der Spezifität der Primer SCAR-BTH-F/R und SCAR-BTH-F/R zu sehen.



**Abb. 3. 5: Spezifitätsüberprüfung des Primerpaares SCAR-BTH-F/R.** SCAR-PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Stammbezeichnungen befinden sich über den einzelnen Spalten. Getestet wurden neben dem Isolat GI2a und dessen Typstamm *B. thermoamylovorans* LMG-18084 weitere isolierte milchsäurebildende Bakterien. Negativ = Negativkontrolle.

**Tab. 3. 3: Spezifische Primer für die Multiplex-PCR-Systeme zur Detektion ausgewählter Isolate.**

Zielorganismus <sup>1</sup>	Primer	Primer Sequenz (5'-3')	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]	Amplifikat [bp]	PCR-Amplifikat mit Typstamm <sup>2</sup>	Referenz
<u>Multiplex System 1</u>							
F2a ( <i>Lb. brevis</i> )	SCAR-LBR-F	GGAAGATCAAGAATATCGGTG	21	60,0	1361	+	Petri et al., 2013
	SCAR-LBR-R	GCGTCTCTAATTCCTGAGC	20	59,2			
GeFf ( <i>Lb. rafi</i> )	SCAR-LRA-F	ACCATTATCGGTGACACCAGG	21	59,8	1145	+	Diese Arbeit
	SCAR-LRA-R	TCAACGTTTGGCCCATAGCC	20	59,4			
G4 ( <i>P. acidilactici</i> )	SCAR-PAC-F	ATGATGGACAGACTCCCTG	19	60,4	776	+	Pfannebecker, 2008
	SCAR-PAC-R	CGAGCTGCGTAGATATGTC	19	60,4			
GF8b ( <i>Lb. parafarraginis</i> )	SCAR-LPA2-F	GAACCCGTTTCAAGTCGTCAG	21	59,8	545	+	Diese Arbeit
	SCAR-LPA2-R	GCGTTAATCGCCAACCACATT	21	57,9			
NB1 ( <i>Lb. buchneri</i> )	SCAR-LBU2-F	GCGGATGGTATCAAGTTCACG	21	59,4	418	+	Petri et al., 2013
	SCAR-LBU2-R	GTGCTGAGGATTGAACACGC	20	59,4			
NF10 ( <i>P. parvulus</i> )	SCAR-PPA-F	GCATGAATCACTTTTCGCTC	20	58,3	331	+	Pfannebecker, 2008
	SCAR-PPA-R	CAAAGATTGTGACCCAGTTG	20	58,3			
<u>Multiplex System 2</u>							
LiF1 ( <i>C. aminovalericum</i> )	SCAR-CAM4-F	ACGATGTAAGTGTAGATACGCA	22	56,5	727	+	Diese Arbeit
	SCAR-CAM4-R	AAGAGGCGGTTTGTACTCCG	20	59,4			
NH2b ( <i>Lb. mucosae</i> )	SCAR-LMU-F	CCGTTTGTGCTTCGCCTAAT	21	57,9	620	+	Diese Arbeit
	SCAR-LMU-R	GCGACGTTGGACATATCCGT	20	59,4			
F4 ( <i>Lb. rossiae</i> )	SCAR-LRO4-F	CTTCTTCGACAAGCATGGGAAAGC	24	62,7	221	N	Diese Arbeit
	SCAR-LRO4-R	GCATGATCAGTTCGAAAATGGGTTT	24	59,3			
N91 ( <i>S. equinus</i> Gruppe)	F-gyrB SIC	CGTATTCAGGAACCTTGCTTTCTTG	24	59,3	65	NÜ	Lopes et al., 2014
	R-gyrB SIC	CCTTCACGTTTGTGTCAGTGA	19	54,5			

## Fortsetzung Tab. 3. 3.

Zielorganismus <sup>1</sup>	Primer	Primer Sequenz (5'-3')	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]	Amplifikat [bp]	PCR-Amplifikat mit Typstamm <sup>2</sup>	Referenz
<u>Multiplex System 3</u>							
NH1.9 ( <i>B. aerophilus</i> Gruppe)	SCAR-BPU-F	GGGTGTTTACCTCACTCGCT	20	59,4	1217	NÜ	Diese Arbeit
	SCAR-BPU-R	CCTTCCCTTTCAACATGAAGTCAA	25	59,7			
N83 ( <i>B. coagulans</i> )	SCAR-BCO-F	GGGCTGCAGATCACATTCC	19	58,8	716	+	Diese Arbeit
	SCAR-BCO-R	AAGTTCAAGCACACGGTTACT	21	55,9			
Gl2a ( <i>B. thermoamylovorans</i> )	SCAR-BTH-F	TTTCTCCACCTCTTGTACTGGT	22	58,4	499	+	Diese Arbeit
	SCAR-BTH-R	AGGAGGTAACCTGTGATGGGTC	22	60,3			
LiF4 ( <i>B. licheniformis</i> )	SCARq-BLI-F	TGAAACCGCTCAATCCAGATACG	23	60,6	104	+	Diese Arbeit
	SCARq-BLI-R	AAACACTGTTTCATGGCCGGAT	21	57,9			

+ = positiv, N = negativ, NÜ = nicht überprüft.

<sup>1</sup> in Klammern: nächster Verwandter oder Gruppe auf Basis der 16S rDNA Sequenz.

<sup>2</sup> Typstämme: *Lb. brevis* DSM-20054, *Lb. rapi* DSM-19907, *P. acidilactici* DSM-20284, *Lb. parafarraginis* DSM-18390, *Lb. buchneri* DSM-20057, *P. parvulus* DSM-20332, *C. aminovalericum* DSM-1283, *Lb. mucosae* DSM-13345, *Lb. rossiae* DSM-20284, *B. coagulans* DSM-1, *B. thermoamylovorans* LMG-18084, *B. licheniformis* DSM-13.

**Tab. 3. 4: Spezifische Primer für die qPCR zur quantitativen Detektion ausgewählter Isolate.**

Zielorganismus <sup>1</sup>	Primer	Primer Sequenz (5'-3')	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]	Amplifikat [bp]	PCR-Amplifikat mit Typstamm <sup>2</sup>	Referenz
Bacteria	BAC338F	ACTCCTACGGGAGGCAG	17	60,4	468	NÜ	Yu et al., 2005
	BAC805R	GACTACCAGGGTATCTAATCC	21	60,7			
	HDA339	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	20	63,5	200	NÜ	Walter et al., 2000
	HDA539	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	22	65,8			
F2d ( <i>B. cereus</i> Gr.)	rpoBF1	CCACCAACAGTAGAAAATGCC	21	57,9	175	NÜ	Qi et al., 2001
N83 ( <i>B. coagulans</i> )	rpoBR1	AAATTTCCACCGTTTCTGGATCT	23	55,3			Diese Arbeit
	SCARq-BCO-F	CACGGTATCAGATCATCCGCA	21	58,4	174	+	
LiF4 ( <i>B. licheniformis</i> )	SCARq-BCO-R	TTGCCCATTTGGATTGCAAGTGT	22	58,8			Diese Arbeit
	SCARq-BLI-F	TGAAACCGCTCAATCCAGATACG	23	60,6	104	+	
NH1.9 ( <i>B. aerophilus</i> Gr.)	SCARq-BLI-R	AAACACTGTTTCATGGCCGGAT	21	57,9			Diese Arbeit
	SCARq-BPU-F	ACTGCCCGTCACCCATATTC	20	59,4	72	NÜ	
LiF4a ( <i>Bacillus subtilis</i> )	SCARq-BPU-R	CTCCCACAATGAACATGCC	20	59,4			Diese Arbeit
	SCAR-BSU-F	TCGCGACCATCATAAACGGT	20	56,5	191	NÜ	
Gl2a ( <i>B. thermoamylovorans</i> )	SCAR-BSU-R	AGCGTGTCTTGTTCAGCATA	20	57,3			Diese Arbeit
	SCARq-BTH2-F	ACGGAAGTGACATTCGTAATAGG	23	58,9	161	+	
LiF1 ( <i>C. aminovalericum</i> )	SCARq-BTH2-R	GCCTTGGTTATGGTTGACGG	20	59,4			Diese Arbeit
	SCARq-CAM5-F	GCACAATAGGGCAAGCAGAAG	21	59,8	178	+	
NF3 ( <i>Ps. alactolyticus</i> )	SCARq-CAM5-R	TTGTTACGTTGCTTCCAAAGGA	22	56,5			Diese Arbeit
	16q-NF3-F	CGGCACCGGAGTTTGTGATTG	20	59,4	100	NÜ	
	16q-NF3-R	GGCAACCTACCTCAGGAAA	20	59,4			
<i>Lactobacillus/Pediococcus</i> (gattungsspezifisch)	F_alllact_IS	TGGATGCCTTGGCACTAGGA	20	58,0	89	NÜ	Haarman & Knol, 2006
	R_alllact_IS	AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT	26	58,0			
	Lac1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	19	54,5	345	NÜ	Walter et al., 2001
	Lac2	ATTYCACCGCTACACATG	18	52,5			
F2a ( <i>Lb. brevis</i> )	SCARq-LBR-F	AGTCCGGTGATGATTCGTGG	20	59,4	104	+	Diese Arbeit
	SCARq-LBR-R	AATTCACCTCCCACACCTTGG	21	59,4			
NB1 ( <i>Lb. buchneri</i> )	SCARq-LBU2-F	AAAGTTGCCGGATACGCTCA	20	59,4	102	+	Diese Arbeit
	SCARq-LBU2-R	TTCAAAGTCCTGTTGCGTGTG	21	59,4			

## Fortsetzung Tab. 3. 4.

Zielorganismus <sup>1</sup>	Primer	Primer Sequenz (5'-3')	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]	Amplifikat [bp]	PCR- Amplifikat mit Typstamm <sup>2</sup>	Referenz
NH2b ( <i>Lb. mucosae</i> )	SCARq-LMU4-F	TGGTTGCCTGGGCCTTTTAT	20	57,3	143	+	Diese Arbeit
	SCARq-LMU4-R	TTACCATCTTAACCCAGGCCG	21	59,8			
GF8b ( <i>Lb. parafarraginis</i> )	SCARq-LPA2-F	CGACTGAGCAATGTGGTTGG	20	57,3	118	+	Diese Arbeit
	SCARq-LPA2-R	CGGCCGATTCGTAATCTGT	20	57,3			
GeFf ( <i>Lb. rapi</i> )	SCARq-LRA-F	AAGCCCAAACGATCTTCCCA	20	57,3	100	+	Diese Arbeit
	SCARq-LRA-R	TTGCAACTCCCCATTACACA	20	57,3			
F4 ( <i>Lb. rossiae</i> )	SCAR-LRO4-F	CTTCTTCGACAAGCATGGGAAAGC	24	62,7	221	N	Diese Arbeit
	SCAR-LRO4-R	GCATGATCAGTTCGAAATGGGTTT	24	59,3			
G4 ( <i>P. acidilactici</i> )	SCARq-PAC2-F	AACGGACCTAAGTGCAGTGG	20	59,4	75	+	Diese Arbeit
	SCARq-PAC2-R	GCCGCAGAAACCCCTACTAA	20	59,4			
NF10 ( <i>P. parvulus</i> )	SCAR-PPA-F	GCATGAATCACTTTTCGCTC	20	58,3	331	+	Pfannebecker, 2008
	SCAR-PPA-R	CAAAGATTGTGACCCAGTTG	20	58,3			
N91 ( <i>S. equinus</i> Gr.)	F-gyrB SIC	CGTATTCAGGAACCTTGCTTTCTTG	24	59,3	65	NÜ	Lopes et al., 2014
	R-gyrB SIC	CCTTCACGTTTGTGAGTGA	19	54,5			

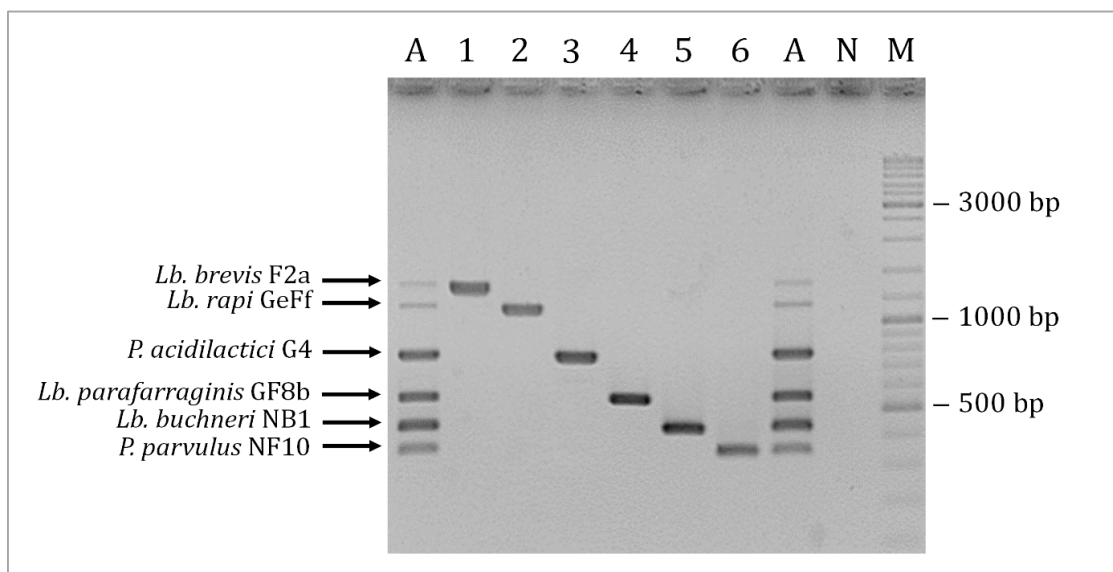
+ = positiv, N = negativ, NÜ = nicht überprüft.

<sup>1</sup> in Klammern: nächster Verwandter oder Gruppe auf Basis der 16S rDNA Sequenz.

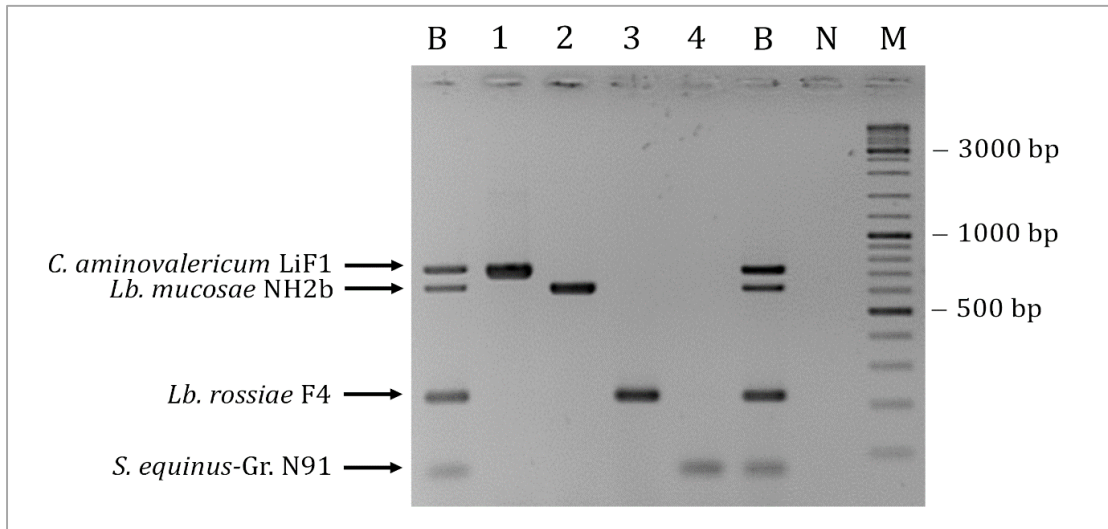
<sup>2</sup> Typstämme: *Lb. brevis* DSM-20054, *Lb. rapi* DSM-19907, *P. acidilactici* DSM-20284, *Lb. parafarraginis* DSM-18390, *Lb. buchneri* DSM-20057, *P. parvulus* DSM-20332, *C. aminovalericum* DSM-1283, *Lb. mucosae* DSM-13345, *Lb. rossiae* DSM-20284, *B. coagulans* DSM-1, *B. thermoamylovorans* LMG-18084, *B. licheniformis* DSM-13.

### 3.5 Qualitativer Nachweis ausgewählter Isolate in Fermenterproben

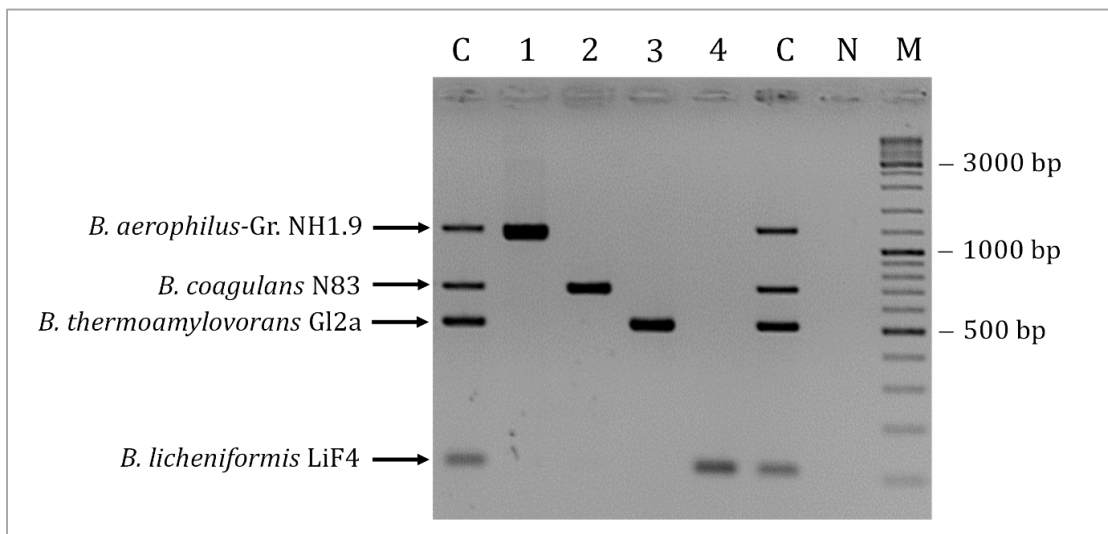
In dieser Arbeit wurden für 14 milchsäurebildende Isolate ein qualitatives Nachweis-system entwickelt. Insgesamt wurden diese in drei Multiplex-Systeme aufgeteilt. Die Primerpaare, deren Eigenschaften und Zielorganismen der Multiplex-Systeme, können Tab. 3. 3 entnommen werden. Mit dem Multiplex-System 1 konnten sechs verschiedene *Lactobacillus*- und *Pediococcus*-Isolate detektiert werden: F2a (*Lb. brevis*), GeFf (*Lb. rapi*), G4 (*P. acidilactici*), GF8b (*Lb. parafarraginis*), NB1 (*Lb. buchneri*), NF10 (*P. parvulus*). Multiplex-System 2 zeigte die Anwesenheit von LiF1 (*C. aminovalericum*), NH2b (*Lb. mucosae*), F4 (*Lb. rossiae*) und N91 (*S. equinus*-Guppe) an. Das Multiplex-System 3 ermöglichte den zeitgleichen Nachweis folgender *Bacillus*-Isolate: NH1.9 (*B. aerophilus*-Gruppe), N83 (*B. coagulans*), Gl2a (*B. thermoamylovorans*), LiF4 (*B. licheniformis*). In Abb. 3. 6, Abb. 3. 7 und Abb. 3. 8 sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten Multiplex-PCR-Produkte der drei Multiplex-Systeme dargestellt.



**Abb. 3. 6: Spezifitätstest der Primer-Mischung A für Multiplex-System 1.** PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Spalte A: DNA-Mischung mit DNA aller im Multiplex 1 enthaltenen Isolate, Spalte 1-6 = DNA der Reinkulturen *Lb. brevis* F2a, *Lb. rapi* GeFf, *P. acidilactici* G4, *Lb. parafarraginis* GF8b, *Lb. buchneri* NB1, *P. parvulus* NF10. N = Negativkontrolle. M = Marker. Die Zusammensetzung der Primer-Mischung A ist Tab. 2. 19 zu entnehmen.

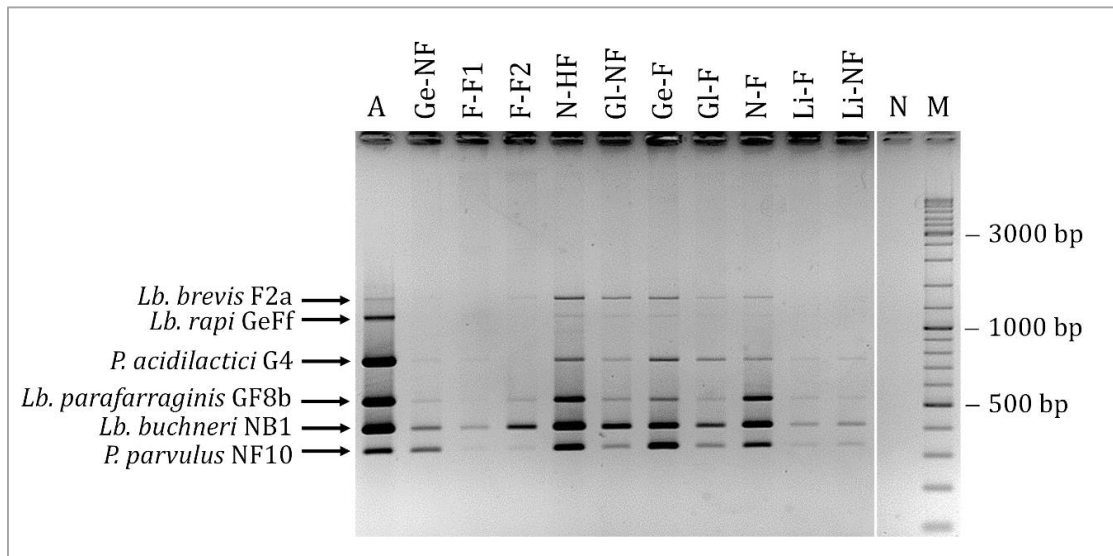


**Abb. 3. 7: Spezifitätstest der Primer-Mischung B für Multiplex-System 2.** PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Spalte B: DNA-Mischung mit DNA aller im Multiplex 2 enthaltenen Isolaten, Spalte 1-4 = DNA der Reinkulturen *C. aminovalericum* LiF1, *Lb. mucosae* NH2b, *Lb. rossiae* F4, *S. equinus*-Gr. N91. N = Negativkontrolle. M = Marker. Die Zusammensetzung der Primer-Mischung B ist Tab. 2. 19 zu entnehmen.



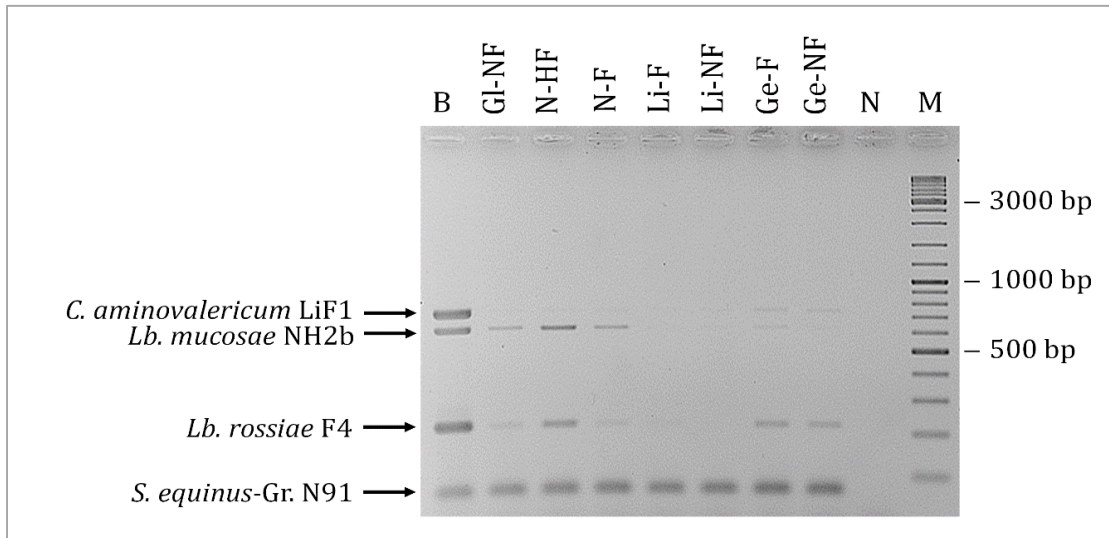
**Abb. 3. 8: Spezifitätstest der Primer-Mischung C für Multiplex-System 3.** PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Spalte C: DNA-Mischung mit DNA aller im Multiplex 3 enthaltenen Isolaten, Spalte 1-4 = DNA der Reinkulturen *B. aerophilus*-Gr. NH1.9, *B. coagulans* N83, *B. thermoamylovorans* Gl2a, *B. licheniformis* LiF4. N = Negativkontrolle. M = Marker. Die Zusammensetzung der Primer-Mischung A ist Tab. 2. 19 zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Praxistauglichkeit wurden die Multiplex-Systeme mit sieben oder zehn Fermenterproben von unterschiedlichen Biogasanlagen getestet.



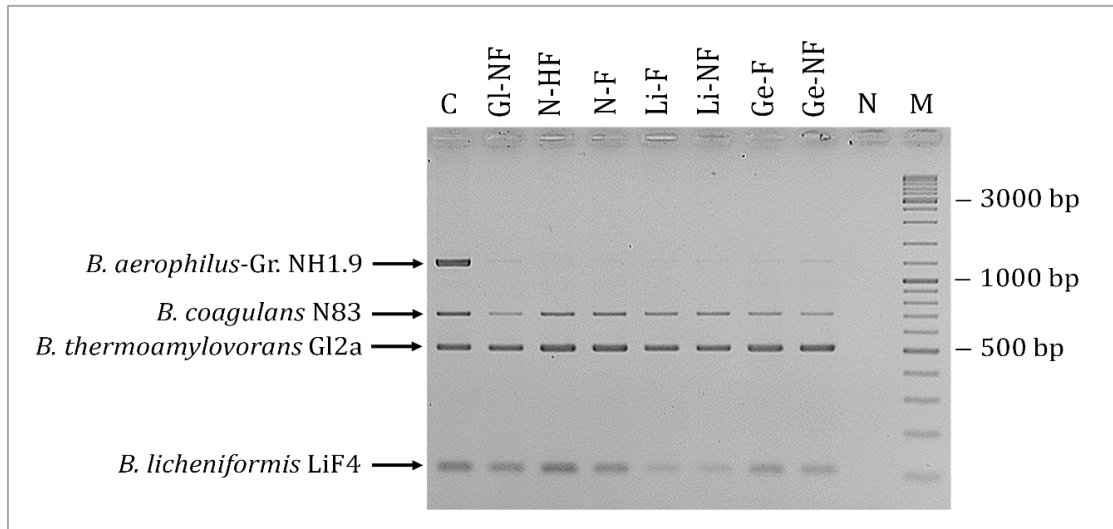
**Abb. 3. 9: Detektion ausgewählter Isolate in Fermenterproben mit Multiplex-System 1.** PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Spalte A: DNA-Mischung mit DNA aller im Multiplex-System 1 enthaltenen Isolate. Die Abkürzungen über den Spalten stehen für die verschiedenen Fermenterproben aus den Jahren 2013 (F-F2 aus 2012). Die Abkürzungen über den Spalten stehen für die verschiedenen Fermenterproben aus den Jahren 2013. Dabei stehen folgende Abkürzungen für die Biogasanlagen: F = BGA Friedrich, Gl = BGA Glahn, Ge = BGA Gebel, N = BGA Neumann, Li = BGA Lieser. Die daran anschließenden Abkürzungen stehen für den jeweiligen Fermenter: F = Hauptfermenter, HF = Hydrolysefermenter, NF = Nachgärer (vgl. Abschnitt 1.5.2). N = Negativkontrolle. M = Marker.

Die PCR-Produkte des Reaktionsansatzes mit der DNA-Mischung aller im Multiplex-System 1 enthaltenen Organismen zeigte ein schwaches PCR-Produkt-Signal für *Lb. brevis*. Die übrigen PCR-Produkte wiesen eine deutliche Bande auf, wobei die Produktbildung für *P. acidilactici*, *Lb. parafarraginis* und *Lb. buchneri* mit mittleren Produktlängen besonders stark ausfiel. Bei Betrachtung der Fermenterproben fällt auf, dass *Lb. buchneri* in jeder Probe eindeutig detektiert werden konnte. Auch für *P. parvulus* konnte ein Signal in allen Proben nachgewiesen werden, obwohl dieses besonders bei der Probe F-F1 sehr schwach ausfiel. Das Vorhandensein von *Lb. parafarraginis*, *P. acidilactici* und *Lb. brevis* konnte in mindestens 70 % der Proben nachgewiesen werden. *Lb. rapi* konnte nur in einigen Proben detektiert werden, wobei die erhaltenen Banden zudem sehr schwach waren.



**Abb. 3. 10: Detektion ausgewählter Isolate in Fermenterproben mit Multiplex-System 2.** PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Spalte A: DNA-Mischung mit DNA aller im Multiplex-System 2 enthaltenen Isolate. Die Abkürzungen über den Spalten stehen für die verschiedenen Fermenterproben aus den Jahren 2013. Dabei stehen folgende Abkürzungen für die Biogasanlagen: F = BGA Friedrich, Gl = BGA Glahn, Ge = BGA Gebel, N = BGA Neumann, Li = BGA Lieser. Die daran anschließenden Abkürzungen stehen für den jeweiligen Fermenter: F = Hauptfermenter, HF = Hydrolysefermenter, NF = Nachgärer (vgl. Abschnitt 1.5.2). N = Negativkontrolle. M = Marker.

Die erhaltenen Banden der DNA-Mischung B zeigten eine recht einheitliche Intensität. Lediglich die Bande für die *S. equinus-Gr.* zeigte eine geringere Schärfe, da die PCR-Produktgröße mit 65 bp sehr gering war. Deutliche Banden in allen Fermenterproben wurden für die *S. equinus-Gr.* erzielt. Das Vorhandensein von *Lb. rossiae* konnte in ca. 70 % der Proben nachgewiesen werden. In etwa der Hälfte der untersuchten Fermenterproben wurden spezifische Banden für *Lb. mucosae* sichtbar. Für den Nachweis von *C. aminovalericum* wurden nur in einzelnen Proben schwache Banden erhalten.



**Abb. 3. 11: Detektion ausgewählter Isolate in Fermenterproben mit Multiplex-System 3.** PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Spalte A: DNA-Mischung mit DNA aller im Multiplex-System 3 enthaltenen Isolate. Die Abkürzungen über den Spalten stehen für die verschiedenen Fermenterproben aus den Jahren 2013. Dabei stehen folgende Abkürzungen für die Biogasanlagen: F = BGA Friedrich, Gl = BGA Glahn, Ge = BGA Gebel, N = BGA Neumann, Li = BGA Lieser. Die daran anschließenden Abkürzungen stehen für den jeweiligen Fermenter: F = Hauptfermenter, HF = Hydrolysefermenter, NF = Nachgärer (vgl. Abschnitt 1.5.2). N = Negativkontrolle. M = Marker.

Die DNA-Mischung C zeigte intensive Banden für alle vier enthaltenen Spezies. Aufgrund der geringen Basenlänge des PCR-Produktes für *B. licheniformis* ist diese Bande im Vergleich zu den anderen leicht unscharf. In allen untersuchten Fermenterproben konnten *B. coagulans*, *B. licheniformis* und *B. thermoamylovorans* eindeutig detektiert werden. Für die *B. aerophilus*-Gruppe hingegen wurde nur in wenigen Proben eine sehr schwache Bande gebildet.

### 3.6 Quantifizierung der milchsäurebildenden Bakterien in Fermenterproben

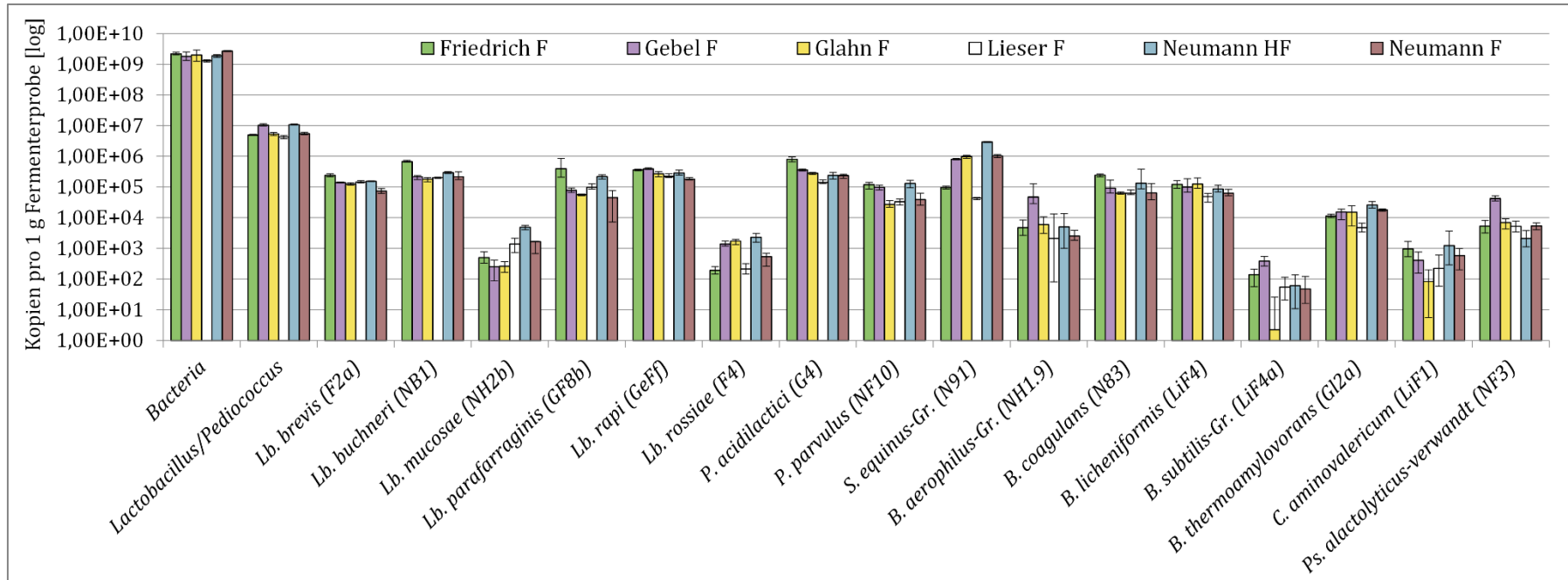
In dieser Arbeit wurde ein PCR-System mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff für eine Quantifizierung der Isolate verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I lagert sich in die kleine Furche der DNA ein. Die Fluoreszenzintensität wird in jedem Reaktionszyklus gemessen und verhält sich direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt. Da bei jeder qPCR Verdünnungsstufen der in Abschnitt 2.5.14 entwickelten synthetischen DNA-Sequenz mitgeführt wurden, konnte in Verbindung mit den spezifischen Primern ein Rückschluss auf die DNA-Menge des zu untersuchenden Bakteriums in

der jeweiligen Fermenterprobe erzielt werden. Da in jeder qPCR-Reaktion fünf dekadisch verdünnte Standardstufen zwischen  $10^3$  und  $10^{11}$  mitgeführt wurden, konnte aus deren  $C_T$ -Werten eine Kalibrierungsgerade bestimmt werden. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  lag zwischen 0,98 und 0,99. Die Effizienzen wiesen Werte zwischen 0,84 und 1,09 auf. Dabei entspricht eine Effizienz von 1,00 einer Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus und ist damit ein Maß für die Güte eines Amplifikationszyklus. Die Steigungen der Kalibrierungsgeraden erreichten Werte von 3,133 bis 3,781 und die y-Achsenabschnitte von 39,25 bis 49,67. Die Werte zu den einzelnen qPCR-Messungen kann Tab. 7. 5 entnommen werden. Die Ergebnisse der qPCR werden in Kopien angegeben und beziehen sich auf 1 g Fermenterprobe.

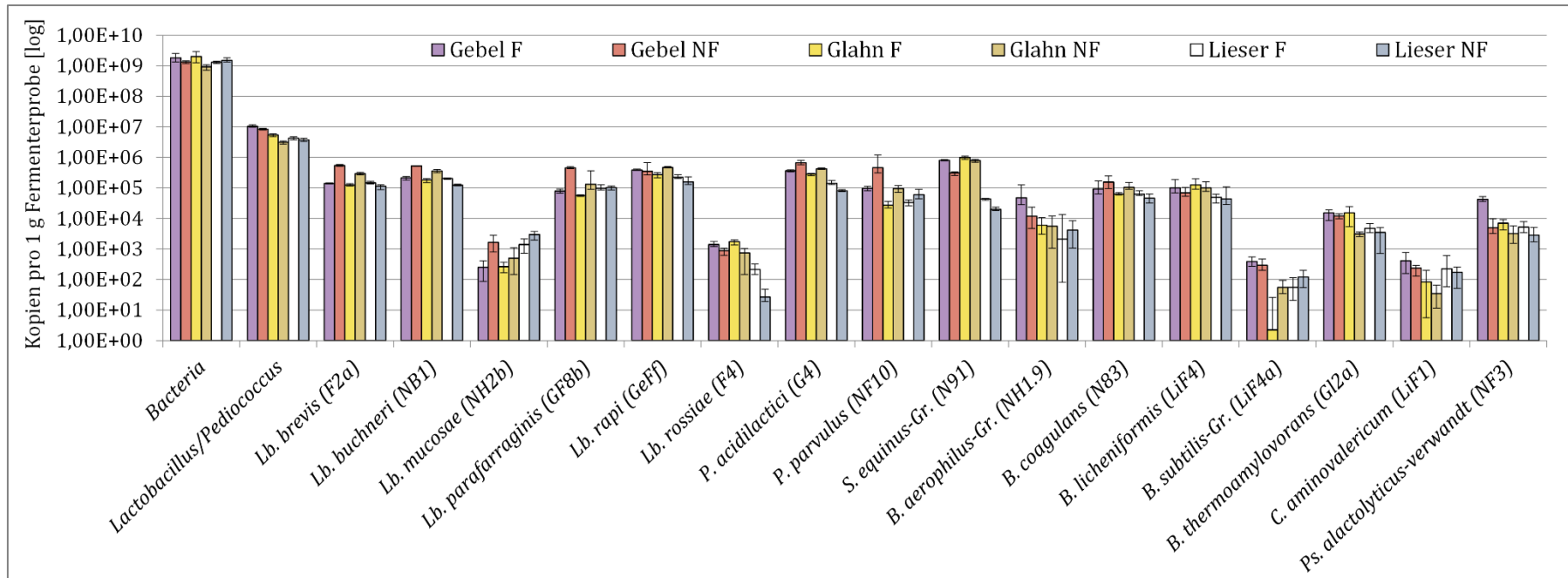
Eine graphische Darstellung für die Proben der Hauptfermenter der BGA Friedrich, Gebel, Glahn, Lieser und Neumann sowie des Hydrolysefermenters der BGA Neumann des Jahres 2013 ist in Abb. 3. 12 zu sehen. Abb. 3. 13 zeigt zusätzlich den Vergleich zwischen Fermenter- und Nachfermenterproben. Die Messwerte der Quantifizierung für das Jahr 2013 befinden sich in Tab. 3. 5.

Für das Jahr 2013 ergaben sich ca.  $10^9$  Kopien mit dem Primerpaar Bac338/Bac805 (Yu et al., 2005) für die Gesamtbakterienanzahl. Das Primerpaar F\_allact\_IS/R\_allact\_IS (Haarman & Knol, 2006) zeigte, dass davon wiederum  $10^6$  bis  $10^7$  Kopien der Gattung *Lactobacillus* (inklusive *Pediococcus*) angehörten. Dieser Wert wurde auch bei Addition der Kopienzahlen aller untersuchten *Lactobacillus*- und *Pediococcus*-Isolate nicht erreicht. Relativ geringe Zahlen wurden für die Arten *B. subtilis* ( $< 10^3$  Kopien), *Lb. rossiae* ( $10^1 - 10^3$  Kopien) und *C. aminovalericum* ( $10^2 - 10^3$  Kopien) bestimmt. Für *Lb. mucosae*, *B. aerophilus*-Gruppe, *B. thermoamylovorans* und *Ps. alactolyticus*-verwandtes Isolat wurden Kopien in der Größenordnung zwischen  $10^3 - 10^4$  erhalten. Arten, die vornehmlich Kopien zwischen  $10^4 - 10^5$  zeigten, waren *P. parvulus*, *B. coagulans* und *B. licheniformis*. Hohe Werte von  $10^5 - 10^6$  Kopien wurden von den Isolaten *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. parafarraginis*, *Lb. rafi*, *P. acidilactici* und *S. equinus*-Gruppe erreicht. Abb. 3. 13 zeigt den Vergleich zwischen Fermenter und Nachfermenter der untersuchten Biogasanlagen. Dabei konnte kein erheblicher Unterschied zwischen den beiden Fermentertypen festgestellt werden. Meist waren die Werte zwischen den Fermentertypen einer Biogasanlage nahezu identisch. Teilweise gab es Unterschiede von einer halben Zehnerpotenz. In einigen wenigen Fällen war der Unterschied etwas größer, überstieg jedoch nicht den Wert von einer Zehnerpotenz.

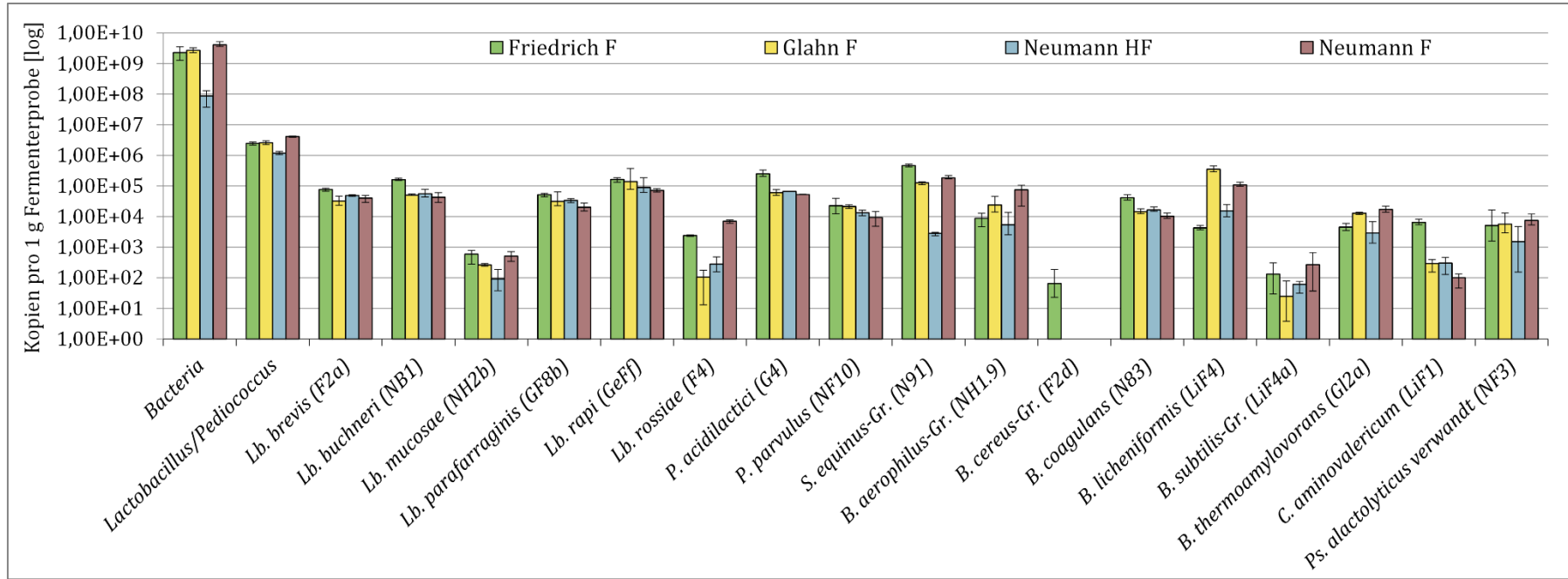
In Abb. 3. 14 ist eine graphische Darstellung der quantitativen Untersuchung der Hauptfermenter der BGA Friedrich, Glahn und Neumann sowie des Hydrolysefermenters Neumann für das Jahr 2014 dargestellt. Die Messwerte befinden sich in Tab. 3. 6. Für dieses Probenjahr wurden ebenfalls Gesamtbakterien in der Größenordnung  $10^9$  Kopien und Lactobazillen/Pediokokken zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Kopien detektiert. Lediglich der Hydrolysefermenter der BGA Neumann zeigte mit ca.  $10^7 - 10^8$  Kopien an Gesamtbakterien geringere Kopienzahlen. Die Analyse der Kopienzahlen der einzelnen Isolate wiesen teilweise etwas geringere Werte im Vergleich zum Vorjahr auf. Der quantitative Nachweis für das Isolat LiF4a *B. subtilis*-Gruppe lag an der Detektionsgrenze mit  $10^1 - 10^2$  Kopien. *Lb. rossiae* und *C. aminovalericum* erreichten ähnlich niedrige Werte wie im Vorjahr mit  $10^2 - 10^3$  Kopien. Dasselbe galt für *B. aerophilus*-Gr., *B. thermoamylovorans* und *Ps. alactolyticus*-verwandtes Isolat mit  $10^3 - 10^4$  Kopien. Im Vergleich zu den Kopienzahlen vom Probenjahr 2013 wurden für folgende Spezies etwas niedrigere Werte bestimmt: *Lb. mucosae* mit  $10^2 - 10^3$  Kopien sowie *P. acidilactici*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri* und *Lb. parafarraginis* mit  $10^4 - 10^5$  Kopien. Annähernd gleichbleibend waren die relativ hohen Werte für *P. parvulus* (ca.  $10^4$  Kopien), *B. coagulans* ( $10^4 - 10^5$  Kopien), *B. licheniformis* ( $10^4 - 10^5$  Kopien), *Lb. rafi* ( $10^5 - 10^6$  Kopien) und *S. equinus*-Gr. ( $10^5 - 10^6$  Kopien).



**Abb. 3. 12: Quantitative Bestimmung verschiedener Isolate in Fermenterproben des Jahres 2013.** Untersucht wurden Proben von den Hauptfermentern (F) und dem Hydrolysefermenter der BGA Neumann (HF). Dargestellt sind die Kopien pro g Fermenterprobe der Biogasanlagen Friedrich, Gebel, Glahn, Lieser und Neumann. Fehlerbalken geben den Minimal- und Maximalwert der drei oder vier PCR-Reaktionen an. Die Messwerte sind Tab. 3. 5 zu entnehmen. Eine Auflistung der Minimal- und Maximalwerte befindet sich im Anhang in Tab. 7. 6 und Tab. 7. 7.



**Abb. 3. 13: Quantitative Bestimmung verschiedener Isolate in Fermenterproben des Jahres 2013.** Dargestellt sind die Kopien pro g Fermenterprobe der Biogasanlagen Gebel, Glahn, und Lieser für die Hauptfermenter (F) und Nachfermenter (NF). Fehlerbalken geben den Minimal- und Maximalwert der drei oder vier PCR-Reaktionen an. Die Messwerte sind Tab. 3. 6 zu entnehmen. Eine Auflistung der Minimal- und Maximalwerte befindet sich im Anhang in Tab. 7. 6 und Tab. 7. 7.



**Abb. 3. 14: Quantitative Bestimmung verschiedener Isolate in Fermenterproben des Jahres 2014.** Dargestellt sind die Kopien pro g Fermenterprobe der Biogasanlagen Friedrich, Glahn und Neumann für die Hauptfermenter (F) und den Hydrolysefermenter der BGA Neumann (HF). Fehlerbalken geben den Minimal- und Maximalwert der drei oder vier PCR-Reaktionen an. Die Messwerte sind Tab. 3. 6 zu entnehmen. Eine Auflistung der Minimal- und Maximalwerte befindet sich im Anhang in Tab. 7. 8.

**Tab. 3. 5: Messwerte der qPCR zur Bestimmung der Kopien pro g Fermenterprobe für das Jahr 2013.** 1 = Bakterien, 2 = *Lactobacillus/Pediococcus*, 3 = *Lb. brevis* (F2a), 4 = *Lb. buchneri* (NB1), 5 = *Lb. mucosae* (NH2b), 6 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 7 = *Lb. rapi* (GeFf), 8 = *Lb. rossiae* (F4), 9 = *P. acidilactici* (G4), 10 = *P. parvulus* (NF10), 11 = *S. equinus*-Gr. (N91), 12 = *B. aerophilus* -Gr. (NH1.9), 13 = *B. coagulans* (N83), 14 = *B. licheniformis* (LiF4), 15 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 16 = *B. thermoamylovorans* (Gl2a), 17 = *C. aminovalericum* (LiF1), 18 = *Ps. alactolyticus*-verwandt (NF3), F = Hauptfermenter, NF = Nachfermenter, HF = Hydolysefermenter.

Organismen	BGA Friedrich F	BGA Gebel F	BGA Gebel NF	BGA Glahn F	BGA Glahn NF	BGA Lieser F	BGA Lieser NF	BGA Neumann HF	BGA Neumann F
1	2,20E+09	1,82E+09	1,33E+09	2,00E+09	9,23E+08	1,31E+09	1,50E+09	1,90E+09	2,68E+09
2	4,93E+06	1,04E+07	8,42E+06	5,41E+06	3,14E+06	4,29E+06	3,73E+06	1,08E+07	5,50E+06
3	2,38E+05	1,39E+05	5,45E+05	1,24E+05	2,92E+05	1,46E+05	1,14E+05	1,53E+05	7,37E+04
4	6,76E+05	2,15E+05	5,23E+05	1,81E+05	3,59E+05	2,03E+05	1,22E+05	2,94E+05	2,17E+05
5	4,98E+02	2,51E+02	1,64E+03	2,62E+02	4,92E+02	1,39E+03	2,94E+03	4,88E+03	1,65E+03
6	3,95E+05	7,82E+04	4,54E+05	5,63E+04	1,32E+05	9,70E+04	1,02E+05	2,20E+05	4,51E+04
7	3,63E+05	3,88E+05	3,48E+05	2,70E+05	4,69E+05	2,23E+05	1,57E+05	2,88E+05	1,82E+05
8	1,91E+02	1,38E+03	8,82E+02	1,74E+03	7,40E+02	2,13E+02	2,71E+01	2,30E+03	5,43E+02
9	8,09E+05	3,62E+05	6,67E+05	2,83E+05	4,24E+05	1,42E+05	8,05E+04	2,40E+05	2,35E+05
10	1,20E+05	9,69E+04	4,61E+05	2,71E+04	9,53E+04	3,32E+04	6,03E+04	1,31E+05	3,89E+04
11	9,60E+04	8,10E+05	3,07E+05	9,89E+05	7,79E+05	4,32E+04	2,00E+04	2,93E+06	1,04E+06
12	4,73E+03	4,71E+04	1,18E+04	6,03E+03	5,54E+03	2,09E+03	4,15E+03	5,04E+03	2,56E+03
13	2,43E+05	9,23E+04	1,55E+05	6,28E+04	1,05E+05	6,28E+04	4,63E+04	1,32E+05	6,41E+04
14	1,22E+05	1,00E+05	6,88E+04	1,26E+05	1,01E+05	4,88E+04	4,32E+04	8,72E+04	6,29E+04
15	1,39E+02	3,87E+02	2,90E+02	2,27E+00	5,52E+01	5,49E+01	1,20E+02	6,09E+01	4,74E+01
16	1,13E+04	1,53E+04	1,20E+04	1,53E+04	3,11E+03	4,72E+03	3,46E+03	2,56E+04	1,77E+04
17	9,61E+02	4,07E+02	2,38E+02	8,26E+01	3,46E+01	2,22E+02	1,71E+02	1,23E+03	5,80E+02
18	5,31E+03	4,19E+04	4,96E+03	6,94E+03	3,19E+03	5,21E+03	2,83E+03	2,10E+03	5,44E+03

**Tab. 3. 6: Messwerte der qPCR zur Bestimmung der Kopien pro g Fermenterprobe für das Jahr 2014.** 1 = Bakterien, 2 = *Lactobacillus/Pediococcus*, 3 = *Lb. brevis* (F2a), 4 = *Lb. buchneri* (NB1), 5 = *Lb. mucosae* (NH2b), 6 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 7 = *Lb. rapi* (GeFf), 8 = *Lb. rossiae* (F4), 9 = *P. acidilactici* (G4), 10 = *P. parvulus* (NF10), 11 = *S. equinus*-Gr. (N91), 12 = *B. aerophilus*-Gr. (NH1.9), 13 = *B. cereus*-Gr. (F2d) 14 = *B. coagulans* (N83), 15 = *B. licheniformis* (LiF4), 16 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 17 = *B. thermoamylovorans* (Gl2a), 18 = *C. aminovalericum* (LiF1), 19 = *Ps. alactolyticus*-verwandt (NF3), F = Hauptfermenter, NF = Nachfermenter, HF = Hydrolysefermenter.

Organismen	BGA Friedrich F	BGA Glahn F	BGA Neumann HF	BGA Neumann F
1	2,28E+09	2,74E+09	8,69E+07	4,09E+09
2	2,45E+06	2,56E+06	1,18E+06	4,12E+06
3	7,70E+04	3,20E+04	4,87E+04	4,01E+04
4	1,61E+05	5,03E+04	5,58E+04	4,24E+04
5	5,87E+02	2,62E+02	9,18E+01	5,11E+02
6	5,13E+04	3,12E+04	3,36E+04	2,00E+04
7	1,64E+05	1,38E+05	8,93E+04	7,16E+04
8	2,39E+03	1,05E+02	2,76E+02	7,07E+03
9	2,49E+05	6,02E+04	6,65E+04	5,26E+04
10	2,26E+04	2,14E+04	1,32E+04	9,27E+03
11	4,62E+05	1,27E+05	2,81E+03	1,84E+05
12	8,73E+03	2,40E+04	5,41E+03	7,48E+04
13	6,45E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	4,10E+04	1,44E+04	1,64E+04	1,01E+04
15	4,26E+03	3,50E+05	1,53E+04	1,08E+05
16	1,30E+02	2,52E+01	6,09E+01	2,64E+02
17	4,51E+03	1,28E+04	2,88E+03	1,70E+04
18	6,42E+03	2,90E+02	2,97E+02	1,00E+02
19	5,08E+03	5,64E+03	1,52E+03	7,44E+03

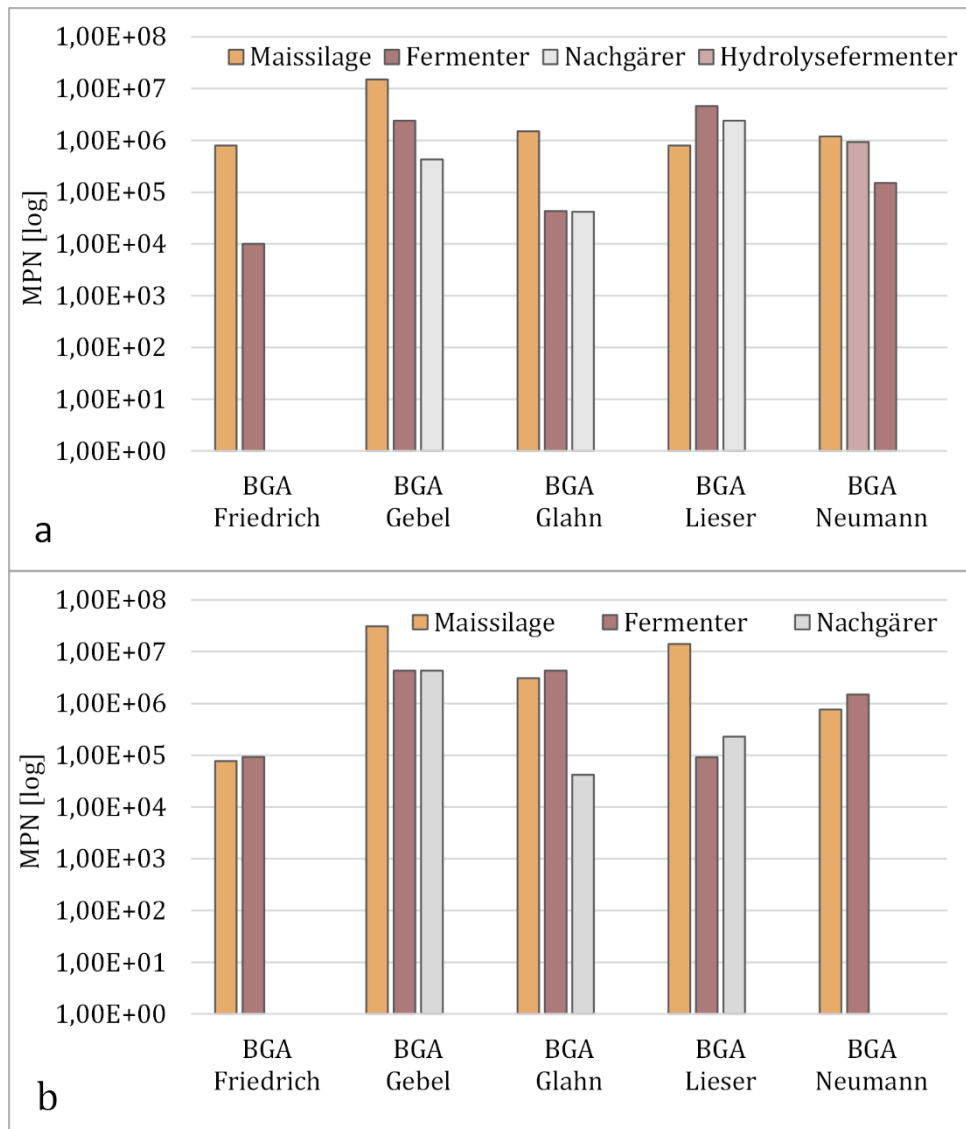
### 3.7 Lebendkeimzahlen der Isolate in Maissilage- und Fermenterproben

Die Bestimmung der Keimzahl lebender milchsäurebildender Bakterien wurde nach der MPN-Methode nach McCrady (1918) durchgeführt. Die bestimmten MPN-Werte sind im Anhang in Tab. 7. 4 aufgeführt.

Für das Jahr 2013 wurden in den untersuchten Maissilageproben meist MPN-Werte zwischen  $10^6$  –  $10^8$  Zellen pro ml ermittelt. Im Vergleich dazu wurden vornehmlich entweder in etwa gleichgroße oder etwas geringere MPN-Werte für die Fermenterproben bestimmt. Neben den Hauptfermentern wurden auch MPN-Werte für Hydrolyse- und Nachfermenter bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.6). In den Maissilageproben beliefen sich die MPN-Werte auf mindestens  $8,00 \times 10^5$  (BGA Friedrich oder Lieser) und maximal  $1,50 \times 10^7$  (BGA Gebel). Für den Hydrolysefermenter der BGA Neumann wurde ein MPN-Wert von  $9,30 \times 10^5$  bestimmt. Die Hauptfermenter der beprobten Biogasanlagen erreichten Werte zwischen  $1,0 \times 10^4$  (BGA Friedrich) und  $4,6 \times 10^6$  (BGA Lieser). Für die Nachfermenter wurden Werte von  $4,2 \times 10^4$  (BGA Glahn) und  $2,4 \times 10^6$  (BGA Lieser) bestimmt, die sich somit in der gleichen Größenordnung wie die Werte der Fermenter befanden. Die Fermenter der BGA Lieser zeigten in diesem Jahr die höchsten Werte an milchsäurebildenden Bakterien.

Im Jahr 2014 wurden lediglich die Hauptfermenter der BGA Friedrich, Glahn und Neumann sowie der Hydrolysefermenter der BGA Neumann beprobt. Die entsprechenden Messwerte sind in Tab. 3. 6 aufgelistet und wurden nicht graphisch dargestellt. Die MPN-Werte lagen zwischen  $1,5 \times 10^6$  (BGA Friedrich) und  $2,4 \times 10^7$  (BGA Neumann).

Die Proben des Jahres 2015 zeigten eine größere Spanne der MPN-Werte für die Maissilageproben zwischen  $10^5$  und  $10^8$  Zellen pro ml. Auch in diesem Jahr wurden in den Fermenterproben meist geringere oder Zellzahlen in nahezu der gleichen Größenordnung vorgefunden (zwischen  $10^5$  und  $10^7$  Zellen pro ml). Identisch zum Probenjahr 2013 erreichte auch 2015 die BGA Friedrich den geringsten MPN-Wert für milchsäurebildende Bakterien in der Maissilage mit  $7,7 \times 10^4$  und die BGA Gebel den höchsten mit  $3,1 \times 10^7$ . Die Spanne der bestimmten MPN-Werte für die Fermenter- und Nachfermenterproben zeigten gleichartige Werte zum Probenjahr 2013. Dabei erreichten die Fermenter MPN-Werte von  $9,2 \times 10^6$  (BGA Lieser) bis  $4,3 \times 10^6$  (BGA Glahn) und die Nachfermenter  $4,2 \times 10^4$  (BGA Glahn) und  $4,3 \times 10^6$  (BGA Gebel). Im Jahr 2015 konnte sowohl für die Maissilage als auch für die beiden Fermenter der BGA Gebel die höchsten Zellzahlen an Milchsäurebildnern ermittelt werden.



**Abb. 3. 15: Graphische Darstellung der MPN-Werte für milchsäurebildende Bakterien in Maissilage- und Fermenterproben.** Fünf verschiedene mesophile Biogasanlagen wurden untersucht: BGA Friedrich, BGA Gebel, BGA Glahn, BGA Lieser und BGA Neumann. (a) Probenjahr 2013 (b) Probenjahr 2015.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung von Milchsäure in Biogasanlagen näher zu untersuchen. Aus diesem Grund bestand ein Schwerpunkt in der Isolierung von milchsäurebildenden Bakterien. Insgesamt wurden 21 verschiedene Arten milchsäurebildender Bakterien aus Maissilage- und Fermenterproben isoliert. Da die Kultivierungsbedingungen stets 40 °C waren, sind offensichtlich alle isolierten Stämme dazu befähigt, bei dieser Temperatur zu wachsen und Milchsäure zu bilden.

### 4.1 Bewertung der Identifizierung der Isolate auf Art-Ebene

Die Identifizierung der Isolate auf Art-Ebene erfolgte vorwiegend durch den Vergleich der 16S rDNA-Sequenzen mit der Datenbank EzTaxon (Kim et al., 2012). Zahlreiche Isolate konnten jedoch auch durch den Vergleich der charakteristischen Bandenmuster der SAPD-PCR zugeordnet werden. Molekularbiologische Analysen haben gezeigt, dass es unwahrscheinlich ist, dass zwei bakterielle Organismen mit einer Ähnlichkeit unter 97 % der 16S rDNA-Sequenz zur selben Art gehören (Stackebrandt & Goebel, 1994). Bei einer Ähnlichkeit zweier Stämme über 97 % sind weitere Methoden notwendig, wie z. B. DNA-DNA-Hybridisierung, um die Entdeckung einer neuen Art trotz hoher Ähnlichkeit zu belegen (Tindall et al., 2010). Die Art-Identifizierung mancher Gattungen, wie z. B. *Bacillus* und *Lactobacillus*, anhand der 16S rDNA, erwies sich als schwierig aufgrund hoher Ähnlichkeiten (Ash et al., 1991; Fox et al., 1992; Bringel et al., 1996; Berthier et al., 1998). Stackebrandt & Ebers (2006) schlugen eine bakterielle Artgrenze bei 98,7 – 99,0 % 16S rDNA-Ähnlichkeit vor und neuere Studien von Kim et al. (2014) postulierten sogar eine mögliche Abgrenzung zweier Arten unter 98,65 %. Da die Ähnlichkeit unter den *Bacillus*- und *Lactobacillus*-Arten sehr hoch ist, wird bei folgenden Isolaten eine eindeutige Zuordnung aufgrund einer Ähnlichkeit zur nächstverwandten Art von über 98,65 % und einer Abgrenzung zur zweitverwandten Art unter 98,65% angenommen: *B. coagulans* N83, *B. thermoamylovorans* Gl2a, *Lb. brevis* F2a, *Lb. farraginis* GlS6e, *Lb. parafarraginis* GF8b, *Lb. rossiae* F4, *C. aminovalericum* LiF1 und *Lb. mucosae* NH2b. Beim letztgenannten Isolat ist auffällig, dass die Ähnlichkeit zum Nächstverwandten nur 98,66 % beträgt. Es ist möglich, dass dieses Isolat sogar als neue Art abgegrenzt werden könnte, da *Lactobacillus*-Arten, durchweg relativ geringe Basenunterschiede zeigen. Hierfür müsste jedoch eine nähere Charakterisierung und weitere molekularbiologische Analysen durchgeführt werden.

Für das Isolat G4 kamen zwei Arten in Frage, *P. acidilactici* und *P. lolii*, da andere Arten eine Ähnlichkeit der 16S rDNA-Sequenz unter 98,3 % aufwiesen. *P. lolii* kann von *P. acidilactici* durch einen Temperaturtest unterschieden werden (Doi et al., 2009). Da das Isolat G4 ein Wachstum bei 48 °C zeigte, konnte dieses eindeutig als *P. acidilactici*-Stamm identifiziert werden.

Die Nächstverwandten der folgenden Isolate konnten nicht eindeutig von den Zweitverwandten aufgrund der 16S rDNA-Sequenz abgegrenzt werden: *B. licheniformis* LiF4, *B. pumilus* GIN1.7, *Lb. buchneri* NB1, *Lb. kefiri* SNF22, *Lb. rapi* GeFf, und *P. parvulus* NF10. Die drei Letztgenannten weisen allerdings immerhin einen Basenunterschied von über 10 Basen zum Zweitverwandten auf (vgl. Abschnitt 7.7). Das von Petri et al. (2013) entwickelte speziesspezifische Primerpaar SCAR-LBU2-F/R für *Lb. buchneri* bestätigte die Zuordnung des Isolates NB1 zu dieser Art. Auch die Identifizierung des Isolates NF10 als *P. parvulus*-Stamm konnte durch ein speziesspezifisches Primerpaar (SCAR-PPA-F/R; Pfannebecker, 2008) abgesichert werden.

Einige Isolate wurden einer Gruppe zugeordnet, die sich aus mehreren Arten zusammensetzen: NH1.9 *B. aerophilus*-Gruppe, F2d *B. cereus*-Gruppe, LiF4a *B. subtilis*-Gruppe, N91 *S. equinus*-Gruppe und NF2b *C. botulinum*-Gruppe. Bei Isolat NH1.9 erwies sich selbst eine Gruppenzugehörigkeit als schwierig, da die Ähnlichkeit zu zwei Mitgliedern der *B. aerophilus*-Gruppe 100 % betrug und zu *B. pumilus* 99,44 %. Beim Vergleich des für dieses Isolat spezifisch entwickelten Primerpaares (SCAR-BPU-F/R) mit der Datenbank BLAST wurde ein PCR-Produkt für *B. pumilus* vorhergesagt. Interessanterweise wurde für das Primerpaar qSCAR-BPU-F/R, welches mit Hilfe des gleichen DNA-Abschnittes generiert wurde, keine Übereinstimmung mit einer in der Datenbank vorhandenen Sequenz gefunden. Folglich besitzt das Isolat NH1.9 hohe Ähnlichkeit zu *B. pumilus*, weist aber offenbar DNA-Abschnitte mit deutlichen Unterschieden in der Basenabfolge auf. Die Zugehörigkeit des Isolates F2d konnte durch Verwendung des Primerpaares rpoBF1/rpoBR1 auf die Arten *B. cereus* und *B. anthracis* eingeschränkt werden (Qi et al., 2001). Auch für das Isolat LiF4a konnte durch Vergleich des entwickelten isolatspezifischen Primerpaares SCAR-BSU-F/R mit der Datenbank BLAST eine hohe Verwandtschaft mit *B. subtilis* bestätigt werden. Für das von Lopes et al. (2014) entwickelte Primerpaar F-gyrB SIC/R-gyrB SIC wurde beim Vergleich mit dem Programm Primer-BLAST ein PCR-Produkt für alle Mitglieder der *S. equinus*-Gruppe vorhergesagt. Die Bindung des Primers an die DNA von Isolat N91 bestätigte somit die Gruppenzugehörigkeit. Das Isolat NF2b konnte auf Basis von 1282 bp der 16S rDNA der *C. botulinum*-Gruppe

(*C. sporogenes*, *C. botulinum*, *C. combesii*) zugeordnet werden. Dies ist durch eine relativ niedrige Ähnlichkeit zur nächstverwandten Gruppe mit 95,78 % abgesichert.

Bei dem Isolat NF3 handelt es sich offensichtlich um eine neue Art innerhalb der Gattung *Pseudoramibacter* oder *Eubacterium*. Die 16S rDNA hat eine Ähnlichkeit von 93,25 % mit *Pseudoramibacter alactolyticus* und 92,89 % mit *Eubacterium barkeri*. Die Gattung *Pseudoramibacter* wurde von Willems & Collins (1996) für *E. alactolyticus* erstellt, und wurde im Zuge dessen als *Ps. alactolyticus* reklassifiziert. Eine Eigenschaft, welche die Gattungen voneinander unterscheiden, ist unter anderem eine nachweisliche Milchsäurebildung bei den *Eubacterium sensu stricto* (hierzu zählen *E. barkeri*, *E. limosum* und *E. callanderi*) im Vergleich zu *Pseudoramibacter* (Stadtman et al., 1972). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass das Isolat NF3 eher eine neue Art innerhalb der Gattung *Eubacterium* sein könnte. Für eine genauere Zuordnung wären allerdings weitere Untersuchungen nötig.

Aufgrund der geringen Basenunterschiede der 16S rDNA-Sequenz der isolierten milchsäurebildenden Bakterien, wurden zur Entwicklung isolat- bzw. speziespezifischer Primer im Rahmen der SAPD-PCR genomische DNA-Bereiche verwendet.

#### 4.2 Beurteilung der entwickelten Nachweissysteme

Neben der Isolierung und Identifizierung der gewonnenen milchsäurebildenden Bakterien, konnten spezifische Primer zur Erstellung eines Nachweissystems entwickelt werden.

Die Primerentwicklung fand mit Hilfe des Programms Primer-BLAST statt. In der Datenbank BLAST sind bereits zahlreiche Sequenzen von diversen Mikroorganismen hinterlegt. Bei einigen entwickelten Primerpaaren wurde ein PCR-Produkt mit einer bekannten Sequenz vorhergesagt. Auf diese Weise war eine Identifizierung folgender Isolate möglich: *B. coagulans* N83, *B. licheniformis* LiF4, *B. subtilis* LiF4a, *Lb. brevis* F2a, *Lb. buchneri* NB1, *Lb. mucosae* NH2b, *S. equinus*-Gruppe N91. Für die übrigen Primer gab es keine Übereinstimmung mit einer bereits hinterlegten Sequenz, aufgrund von fehlenden Gesamtgenomsequenzen in der Datenbank oder durch Basenunterschiede des für die Primerentwicklung ausgewählten Genomabschnitts.

Die entwickelten Multiplex-Systeme ermöglichten eine qualitative Detektion einiger ausgewählter Isolate. Das Detektionslimit für die folgenden Primer wurde von Petri et al. (2013) getestet und lag zwischen  $10^4$  und  $10^5$  Zellen pro ml: SCAR-LBU-F/R (*Lb. buchneri*), SCAR-LBR-F/R (*Lb. brevis*) und SCAR-PPA-F/R (*P. parvulus*). Multiplex-System 1 zeigte

eine abnehmende Signalstärke der spezifischen Banden mit Zunahme der Basenpaarlänge der PCR-Produkte. Dies ist deutlich in Abb. 3. 6 der DNA-Mischung A zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigten Multiplex-System 2 und 3 keinen Zusammenhang zwischen Produktgröße und Signalstärke. Die Isolate LiF1, NH1.9 und NH2b schienen an ihrem Detektionslimit zu sein.

Um eine quantitative Aussage über die Gesamtkopienzahl der Bakterien allgemein und *Lactobacillus/Pediococcus*-Organismen zu erhalten, wurden Primerpaare aus der Literatur hinzugezogen (Tab. 3. 4). Zur Überprüfung der Genauigkeit dieser Primerpaare wurde jeweils ein weiteres Primerpaar getestet und die Ergebnisse für Primerpaar Lac1/2 für *Lactobacillus/Pediococcus* und Primerpaar HDA für Bakterien allgemein verglichen. Da diese Primerpaare Ergebnisse in einer ähnlichen Größenordnung ergaben, lässt dies auf eine Bindung der Primerpaare an die Ziel-DNA der gleichen Bakterienarten schließen.

Besonders der quantitative Nachweis der Isolate in Fermenterproben erlaubte eine Einschätzung der Rolle der Isolate in Biogasanlagen.

### **4.3 Relevanz der Lactobacillaceae durch Bildung von Milchsäure als Hauptprodukt**

Mehr als die Hälfte der 21 verschiedenen milchsäurebildenden Isolate konnten als *Lactobacillus*- und *Pediococcus*-Arten identifiziert werden (Tab. 3. 1). Beide Gattungen gehören zur Familie der Lactobacillaceae. Vertreter dieser Spezies bilden Milchsäure als Hauptprodukt. Hauptsächlich wurden obligat heterofermentative Milchsäurebakterien der Gattung *Lactobacillus* gefunden, dazu gehörten die folgenden Arten: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. farraginis*, *Lb. kefir*, *Lb. mucosae*, *Lb. parafarraginis*, *Lb. rafi* und *Lb. rossiae*. Neben dem zur Familie der Streptococcaceae zählendem Isolat N91, konnte auch ein weiteres obligat homofermentatives Milchsäurebakterium, *P. parvulus*, isoliert werden. Während Homofermentative fast ausschließlich Milchsäure bilden, werden beim heterofermentativen Stoffwechselweg zusätzlich Kohlenstoffdioxid, Essigsäure und Ethanol als Nebenprodukte gebildet.

Das Temperaturoptimum der Lactobacillaceae beträgt 30 – 40 °C und liegt somit im Bereich mesophiler Biogasanlagen. Die hohe Toleranz der Vertreter der Lactobacillaceae gegenüber sauren Bedingungen (pH < 5,0) bewirkt einen Vorteil in der Konkurrenz mit anderen Bakterien (Martinez et al., 2013). Dies ist bereits im Silierungsprozess ausschlaggebend für deren Anreicherung. Die Kultivierung in einem Medium mit pH 7,3

zeigte ein starkes Wachstum der Lactobacillaceae-Isolate auch bei hohen pH-Werten. Die Polymertests haben gezeigt, dass die isolierten *Lactobacillus* und *Pediococcus*-Isolate zwar nicht zum Abbau von Polymeren befähigt waren, allerdings waren sie in der Lage, eine Vielzahl an Oligo- und Monosacchariden in Säuren umzuwandeln (Tab. 3. 2). Den Ergebnissen zu Folge sind die isolierten Lactobacillaceae somit ausschließlich in der Acidogenese involviert. Allerdings stellen heterofermentative Milchsäurebakterien durch die Bildung von Essigsäure- und Kohlenstoffdioxid direkt verwertbare Substrate für die Methanogenese zur Verfügung.

Eine Sonderstellung nimmt das *P. acidilactici*-Isolat ein, da diese Spezies fakultativ heterofermentativ ist. Dies bedeutet, dass Hexosen über die Glykolyse und Pentosen über den Pentosephosphatweg abgebaut werden können, da die Schlüsselenzyme beider Stoffwechselwege gebildet werden können (Vos et al., 2009). Der homofermentative Stoffwechselweg von *P. acidilactici* ermöglicht eine schnelle und effiziente Produktion von Milchsäure und wird daher häufig für Silagezusätze eingesetzt (Driehuis et al., 1999). Vos et al. (2009) beschreibt ein breites pH- (4,2 – 8,0) und Temperaturspektrum (35 – 48 °C), welche darauf hinweisen, dass sich die Bedingungen einer mesophilen Biogasanlage und die Ansprüche dieser Bakterienart gleichen. Diese Vermutung wird durch die quantitative Bestimmung der Kopienanzahl zwischen  $8,05 \times 10^4$  und  $8,09 \times 10^5$  für dieses Isolat bestätigt. Die Kopienanzahl für *P. parvulus* zeigte etwas geringere Werte von  $2,71 \times 10^4$  bis  $1,31 \times 10^5$ . Da es sich um ein homofermentatives Milchsäurebakterium handelt, ist dieses nicht befähigt, Pentosen abzubauen (Tab. 3. 2). Für manche *P. parvulus*-Stämme wurde bereits eine pH-Toleranz bis zu 7,5 nachgewiesen (Vos et al., 2009).

Die Bestimmung der Kopienzahlen mittels qPCR ergab relativ geringe Werte für die Isolate *Lb. rossiae* ( $2,51 \times 10^2$  bis  $4,88 \times 10^3$ ) und *Lb. mucosae* ( $2,71 \times 10^1$  bis  $8,82 \times 10^3$ ). Nach aktuellem Kenntnisstand wurden diese beiden Arten noch nicht in Biogasanlagen nachgewiesen. *Lb. rossiae* wurde ursprünglich aus Weizensauerteig isoliert und als obligat heterofermentativ beschrieben (Corsetti et al., 2005). Allerdings konnte es bereits in Schweinekot nachgewiesen werden (De Angelis et al., 2006). Auch *Lb. mucosae* wurde bereits mehrmals aus Schweinekot oder -darm isoliert (Roos et al., 2000; De Angelis et al., 2006). Im Vergleich zu vielen anderen *Lactobacillus*-Arten, wie z. B. *Lb. rami* oder *Lb. rossiae*, kann diese Art auch noch bei 45 °C wachsen. Möglicherweise könnte sich diese Art eher bei Temperaturschwanken gegenüber Artverwandten durchsetzen.

*Lb. farraginis* und *Lb. parafarraginis* wurden von Endo & Okada (2007) erstmals beschrieben und von einer Shochu-Brennerei isoliert. *Lb. farraginis* ist dazu in der Lage bei einer Temperatur zwischen 15 und 45 °C und einem pH-Wert von 4,0 – 8,0 zu wachsen. Im Vergleich dazu zeigt *Lb. parafarraginis* ein engeres Temperaturspektrum und kann nicht bei 15 und 45 °C, wohl aber bei 37 °C wachsen. Das Isolat GF8b zeigte jedoch auch bei 40 °C ein starkes Wachstum. Mit einer Kopienzahl von  $4,51 \times 10^4$  bis  $4,54 \times 10^5$  wurde für *Lb. parafarraginis* mitunter die höchsten Werte im Rahmen der quantitativen Analyse bestimmt. Infolge eines relativ späten Isolierungszeitpunkts wurde für das *Lb. farraginis*-Isolat GIS6e kein Nachweissystem entwickelt.

*Lb. buchneri* erreichte mit  $1,22 \times 10^5$  bis  $6,76 \times 10^5$  eine der höchsten Kopienzahlen. Diese Art ist dafür bekannt, sich bereits im Silierungsprozess aufgrund seiner Stoffwechselaktivität bei sehr geringen pH-Werten gegenüber anderen Bakterien durchzusetzen (Driehuis et al., 1999). Bei geringen pH-Werten kann *Lb. buchneri* 1,2-Propandiol aus Milchsäure bilden (Elferink et al., 2000). 1,2 Propandiol kann wiederum von *Lb. rapi* in Propionsäure und Propanol umgewandelt werden (Johanningsmeier & McFeeters, 2013). Das Vorkommen der Art *Lb. rapi* wurde bislang noch nicht in Biogasanlagen nachgewiesen. *Lb. rapi* wurde erstmals aus einer nichtgesalzenen Lösung einer typisch japanischen Sauergurken-Spezialität isoliert und kann bei pH 4,0 und pH 8,5 wachsen. Auch die Beschreibung der Anteile bei der Bildung von L- (80 %) zu D-Milchsäure (20 %) aus Glucose stimmt mit den Ergebnissen für das Isolat GeFf überein (Abb. 3. 4). Aus Glucose wird kein Kohlenstoffdioxid gebildet (Watanabe et al., 2009). Die relativ hohen Werte der Kopien von  $1,57 \times 10^5$  bis  $4,69 \times 10^5$  unterstreichen die Vermutung, dass diese *Lactobacillus*-Art in Biogasfermentern stoffwechselaktiv ist. Für *Lb. brevis* wurden ebenfalls hohe Kopienzahlen bestimmt ( $7,37 \times 10^4$  bis  $5,45 \times 10^5$ ). *Lb. brevis* kann nicht bei 45 °C wachsen und wurde bereits aus menschlichen Fäkalien isoliert (Rogosa & Hansen, 1971).

Betrachtet man die Ergebnisse der quantitativen Analyse fällt auf, dass für die Anzahl an Kopien pro g Fermenterprobe für die Arten *Lb. buchneri*, *Lb. brevis* und *Lb. parafarraginis* ähnliche Werte bestimmt wurden. Auch *Lb. rapi* und *P. acidilactici* erreichten Kopienzahlen in ähnlicher Größenordnung, obwohl diese lediglich einmal unter anaeroben Bedingungen isoliert werden konnten. Dies lässt vermuten, dass die angewandten Isolierungsmethoden die Isolierung bestimmter Arten bevorzugen könnten. Unterschiede sind sowohl in den Komponenten der verwendeten Medien als auch in den Kultivierungsbedingungen vorhanden. Ein weiterer Grund könnte eine erhöhte Stoffwechselaktivität der häufig isolierten Arten sein, da die qPCR an DNA-Bereiche bindet, die unabhängig von

der Vitalität der Bakterien sind. Letzteres würde die auffällig häufige Isolierung der Art *Lb. buchneri* erklären, da dieses Milchsäurebakterium bereits in der Silage vermehrt vorkommt (Driehuis et al., 1999).

#### 4.4 Erhöhter Eintrag milchsäurebildender Bakterien durch Maissilage

Für die Stabilisierung des Silageprozesses werden häufig spezielle Silagezusätze eingesetzt. Da eine geringe Konzentration an Essigsäure benötigt wird, um das Wachstum von Hefen zu unterdrücken, werden meistens heterofermentative Milchsäurebakterien, besonders *Lb. buchneri*, hierfür verwendet (Driehuis et al., 1999). Filya et al. (2006) konnten nachweisen, dass bereits eine Zugabe von  $5 \times 10^5$  KBE/g Maissilage zu einer merklich geringeren Anzahl an Hefezellen führt. Hefen werden von Essigsäure und Propionsäure stärker inhibiert als von Milchsäure (Moon, 1983). Wenn Silagezusätze verwendet werden, gelangen besonders heterofermentative Milchsäurebakterien in erhöhter Zellzahl in den Fermenter von Biogasanlagen. Die Silagen der BGA Glahn und der BGA Friedrich wurden mit Silasil Energy.XD (Schaumann BioEnergy, Pinneberg) behandelt. Dieser Silagezusatz beinhaltet die heterofermentativen Arten *Lb. buchneri*, *Lb. diolivorans* und *Lb. rhamnosus*. Nach Angaben des Herstellers werden ca.  $2 \times 10^5$  KBE/g zu silierendem Material eingesetzt.

Die bestimmten MPN-Werte zeigten, dass relativ hohe Werte an milchsäurebildenden Bakterien bis zu  $10^6 - 10^7$  Zellen pro Silageprobe und bis zu  $10^5 - 10^6$  Zellen pro g Fermenterprobe auftraten. Dadurch wird gleichzeitig die Vitalität der milchsäurebildenden Mikroorganismen bestätigt. In den untersuchten Silage- und Fermenterproben gab es keinen nachweisbaren Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Silage in Bezug auf die erhaltenen MPN-Werte. Bakterien der Gattung Lactobacillales kommen überall dort vor, wo Kohlenhydrate vorhanden sind: In Pflanzen, insbesondere Mais und Gras, im Abwasser oder in Essensresten (Mundt & Hammer, 1968; Mundt et al., 1969, Felis & Dellaglio, 2007). Im Vergleich zu beschädigtem Pflanzenmaterial findet man auf intakten Pflanzenteilen nur sehr wenige Milchsäurebakterien, die sich erst im Verlauf des Erntevorgangs und durch die Silierungsmaßnahmen stärker vermehren (Stirling & Whittenbury, 1963). Die Zusammensetzung der milchsäurebildenden Bakterien in Silagen ist demnach abhängig vom eingesetztem Pflanzenmaterial und den Silierungsmaßnahmen.

Im Allgemeinen war *Lb. buchneri* die am häufigsten isolierte Art. Im Gegensatz dazu konnte weder *Lb. diolivorans* noch *Lb. rhamnosus* isoliert werden, obwohl diese Arten durch den Einsatz des Silierungsmittels, zumindest in zwei Biogasanlagen, in höheren Zellzahlen vorliegen müssten. Möglicherweise konnten sich diese beiden *Lactobacillus*-Arten unter den Bedingungen der Biogasfermentern nicht durchsetzen. Auffällig ist, dass die Häufigkeit mit der *Lb. buchneri* isoliert wurde, unabhängig von einer Behandlung der Silage mit dem genannten Silierungszusatz ist. So wurde *Lb. buchneri* bei allen untersuchten Biogasanlagen häufig isoliert, auch bei solchen, die keinen Silierungszusatz einsetzten. Studien belegen, dass *Lb. buchneri* die Besonderheit besitzt, Milchsäure unter anaeroben Bedingungen weiter zu Essigsäure und 1,2-Propandiol umzusetzen. Dabei wird der Milchsäureabbau allerdings nicht mehr bei einem pH-Wert von über 5,8 beobachtet. Offensichtlich dient der Abbau der Milchsäure auch dem Schutz der Zellen, da hierdurch der umgebende pH-Wert erhöht wird (Oude Elferink et al., 2000). Während andere säuretolerante Mikroorganismen niedrige pH-Werte in einem inaktiven Zustand überleben, ist *Lb. buchneri* in der Lage, sich auch bei einem pH-Wert von 3,8 noch stark zu vermehren. Dies wird durch die Nutzung von Milchsäure als Substrat ermöglicht. Aus den genannten Gründen wird *Lb. buchneri* in der Lagerungsphase der Silage zur dominanten Art (Driehuis et al., 1999). Da in allen untersuchten Biogasanlagen Maissilage als Hauptsubstrat eingesetzt wurde, ist eine vermehrte Isolierung von *Lb. buchneri* demnach wahrscheinlich. Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben *Lb. buchneri* ein weiteres Isolat eine besondere Rolle im Biogasprozess haben könnte.

### **4.5 Schlüsselrolle des Isolates aus der *Streptococcus equinus*-Gruppe?**

Das Isolat N91 konnte der *Streptococcus equinus*-Gruppe zugeordnet werden und wurde nur einmal mit dem Medium MD unter Sauerstoffausschluss isoliert. Bei der quantitativen Analyse erreichte dieses Isolat mit bis zu  $2,93 \times 10^6$  Kopien pro g Fermenterprobe die höchsten Werte. Für die Analyse wurde das Primerpaar F-gyrB SIC/R-gyrB SIC verwendet (Lopes et al., 2014). Interessanterweise wurde das Isolat N91 aus einer Verdünnungsreihe mit Stärke als Kohlenstoffquelle in einer Verdünnungsstufe von  $10^{-8}$  isoliert. In einem vorherigen Projekt konnte dieses Isolat ebenfalls im selben Medium und in einer Verdünnungsstufe von  $10^{-9}$  einer Fermenterprobe nachgewiesen werden (Dröge, 2011). Offensichtlich ist dieses Isolat in der Lage, größere Mengen Milchsäure aus Stärke als einzige Kohlenstoffquelle zu bilden. Möglicherweise ist dies auch der Grund für die relativ starke Abundanz dieser Art in Biogasanlagen. Mitglieder der *S. equinus*-Gruppe gehören

der Risikogruppe 2 an. Isolate dieser Gruppen stammen meist aus Fäkalien von Mensch oder Tier sowie von Nahrungsmitteln, wie z. B. gefrorenen Erbsen oder Milchprodukten (Schlegel et al., 2000). Dies deutet auf eine Rolle in zwei Stufen der anaeroben Abbaukette hin, der Hydrolyse und Acidogenese. Darüber hinaus indizieren die Ergebnisse der Polymer-tests die Beteiligung einer weiteren Bakteriengruppe an den ersten beiden Abbaustufen.

#### 4.6 Abbau zahlreicher Polymere durch Bacillaceae

Allgemein sind neben einigen Bacillales und Lactobacillales hauptsächlich Clostridiales mit dem Abbau von Poly- und Oligosacchariden assoziiert (Krause et al., 2008). In einer Vielzahl von Studien wurden Mikroorganismen der Klasse Bacilli und Clostridia als häufigste Vertreter in Biogas produzierenden Gemeinschaften beschrieben (Krause et al., 2008; Wirth et al., 2012; Li et al., 2013).

Die *Bacillus*-Isolate produzierten zwar keine hohen Mengen an Milchsäure, trotzdem trägt ihre Anwesenheit zur Gesamtmenge an Milchsäure bei. Das Temperaturspektrum aller isolierten *Bacillus*-Arten entspricht dem Bereich einer mesophilen Biogasanlage (Vos et al., 2009). Obwohl viele Bazillen zur Sporenbildung befähigt sind, ermöglichen das umfassende Substratspektrum und insbesondere die Abbaufähigkeit zahlreicher Polymere eine aktive Rolle dieser Isolate in Biogasanlagen. Auf diese Weise könnten *Bacillus*-Isolate an der Hydrolyse und Acidogenese in Biogasanlagen beteiligt sein.

Zahlreiche Gründe indizieren eine aktive Rolle der Spezies *B. thermoamylovorans* in Biogasanlagen. *B. thermoamylovorans* ist, im Gegensatz zu den übrigen *Bacillus*-Isolaten, nicht dazu befähigt, Sporen zu bilden (Combet-Blanc et al., 1995). Darüber hinaus konnte diese Spezies bereits öfter in Biogasanlagen identifiziert und ein Abbau zahlreicher Polymere, Oligosaccharide, Hexosen sowie Pentosen bereits mehrfach nachgewiesen werden (Koeck et al., 2014; Cibis et al., 2016). Obwohl *B. thermoamylovorans* ein Temperaturoptimum bei 50 °C besitzt, konnte dieses Bakterium nun auch aus einer mesophilen Biogasanlage isoliert und in einer Kopienzahl von  $3,11 \times 10^3$  bis  $2,56 \times 10^4$  nachgewiesen werden. Chou et al. (2011) konnten eine verstärkte Wasserstoffbildung in einer Co-Kultur von *C. butyricum*- und einem *B. thermoamylovorans*-Stamm unter mesophilen Bedingungen nachweisen. Dies könnte auch in einer Biogasanlage von Bedeutung sein. Einerseits wird der Stoffwechsel der milchsäurebildenden Bakterien und anderen säurebildenden Bakterien vom Wasserstoff in der Gasphase des Fermenters reguliert, indem dieser ausschlag-

gebend für das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem NAD ist (Costello et al., 1991). Andererseits kann durch die Anwesenheit von wasserstoffverwertenden und milchsäureverwertenden sulfatreduzierenden Bakterien, freier Schwefelwasserstoff in größeren Mengen entstehen und die Methanogenese beeinträchtigen (Parkin et al., 1990; Mizuno et al., 1998).

Die Bildung von L-Milchsäure durch *B. subtilis* wird in der Literatur bestätigt und die Eignung dieser Spezies zur industriellen Produktion von L-Milchsäure beschrieben (Ramos et al., 2000; Gao et al., 2012). Lange Zeit wurde diese Spezies als strikt aerobes Bakterium angesehen, allerdings konnten Nakano & Zuber (1998) auch in Abwesenheit von Sauerstoff ein Wachstum nachweisen. Dieses Isolat zeigte eine der niedrigsten Kopienzahlen im Vergleich zu anderen fakultativ anaeroben sporenbildenden Isolaten. Das Isolat GIN1.7 konnte *B. pumilus* zugeordnet werden. Auch für diese *Bacillus*-Art konnte ein anaerobes Wachstum nachgewiesen werden (From et al., 2007). Für GIN1.7 ist es nicht gelungen, einen spezifischen Primer zu generieren. Auch für das Isolat F2d konnte kein spezifischer Primer entwickelt werden. Durch Verwendung eines Primerpaares aus der Literatur, das spezifisch für *B. cereus* und *B. anthracis* ist, konnte die unzureichende Identifizierung von Isolat F2d auf zwei Arten der *B. cereus*-Gruppe begrenzt werden (rpoBF1/rpoBR1; Qi et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese *Bacillus*-Art nur in einer Probe detektiert werden, wobei sich die bestimmte Kopienzahl ( $< 10^3$  Kopien pro g Fermenterprobe) am Detektionslimit befand. Folglich ist es wahrscheinlich, dass dieses Isolat in Biogasanlagen lediglich als Sporen vertreten ist und keine pathogene Gefahr besteht. In anderen Studien wurde *B. cereus* bereits in Biogasfermentern nachgewiesen (Krause et al., 2008; Wirth et al., 2012). Die Anwesenheit von *B. coagulans* in Biogasanlagen konnte ebenfalls bereits durch Genomstudien belegt werden (Schlüter et al., 2008). Diese Bakterienspezies wurde bereits mehrfach in Verbindung mit industrieller Nutzbarkeit durch die Fähigkeit zur Produktion hoher Mengen an Milchsäure beschrieben (Payot et al., 1999; Michelson et al., 2006; Ou et al., 2011). Temperaturoptimum (40 – 57 °C) und pH-Bereich 4 – 11 (Optimum 7) stimmen mit den Bedingungen einer Biogasanlage überein. Das relativ häufige Vorkommen dieser Art wird mit  $4,63 \times 10^4$  bis  $2,43 \times 10^5$  Kopien belegt. Neben *B. coagulans* konnte noch eine weitere *Bacillus*-Art Stärke abbauen: *B. licheniformis*-Isolat LiF4. Für dieses Isolat wurden Kopien der gleichen Größenordnung bestimmt ( $4,32 \times 10^4$  bis  $1,22 \times 10^5$ ). Zudem beschreibt Vos et al. (2009) für die meisten getesteten Stämme dieser Art einen Propionsäureabbau. Im Rahmen einer Studie von Bagge et al. (2010) konnten sowohl *B. licheniformis*- als auch *B. cereus*-, *B. pumilus*- und

*B. subtilis*-Stämme in einer mesophilen Biogasanlage nachgewiesen werden. Weiterhin befasst sich diese Studie mit der Gefahren einschätzung für Mensch und Tier durch die sporenbildenden Bakterien mit der Schlussfolgerung, dass die meisten *Bacillus*-Arten recht harmlos sind. Bagge et al. (2010) bezogen zwar Clostridien mit pathogenem Potential in ihre Studie mit ein, konnten allerdings zeigen, dass diese nach der Digestion nicht mehr nachweisbar waren.

#### 4.7 Geringe Anzahl an isolierten milchsäurebildenden Clostridiaceae

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt nur zwei strikt anaerobe milchsäurebildende Isolate der Familie Clostridiaceae gewonnen werden. Die Anwesenheit von *C. sporogenes*/*C. botulinum* in Biogasanlagen wurden bereits in anderen Studien nachgewiesen, wobei diese beiden Arten nicht unterschieden werden konnten (Bagge et al., 2010; Neuhaus et al., 2015). Sowohl Temperaturbereich (25 – 45 °C) als auch pH-Spektrum (bis pH 8,5) schließen ein Wachstum in Biogasanlagen nicht aus (Vos et al., 2009). Für das Isolat NF2b ist es nicht gelungen, ein spezifisches Primerpaar zu finden, weshalb eine Quantifizierung durch die qPCR nicht erfolgen konnte. *C. botulinum* kann bei Tieren eine ernste Erkrankung hervorrufen. Da jedoch Bagge et al. (2010) zeigen konnten, dass nach der Digestion keine Zellen dieser Arten mehr vorhanden waren, besteht vermutlich keine Gefahr.

Das Isolat *C. aminovalericum* LiF1 zeigte bei Kultivierung in Medium M58 mit Glucose als Kohlenstoffquelle eine Bildung von Milchsäure, Essigsäure und Ethanol. Cibis et al. (2016) isolierten ebenfalls einen *C. aminovalericum*-Stamm aus einer mesophilen Biogasanlage, welcher aus Milchsäure Propionsäure und Essigsäure bildete. Der Typstamm *C. aminovalericum* DSM-1283, der aus Abwasserschlammschamm isoliert wurde, zeigte eine schnelle Verflüssigung von Gelatine, jedoch nur eine geringe Fermentation von Stärke (Hardman & Stadtman, 1960). Es scheint demnach, dass es *C. aminovalericum*-Stämme gibt, die sowohl Milchsäure bilden als auch abbauen können und somit bei der acidogenen und acetogenen Abbaustufe eine Rolle spielen. Die quantitative Bestimmung ergab allerdings ein eher geringes Vorkommen dieser Art mit  $3,46 \times 10^1$  bis  $1,23 \times 10^3$ . Hardman und Stadtman (1960) beschreiben zudem ein pH-Optimum von 7,4 – 7,7, wobei unterhalb von pH 7,0 kein Wachstum beobachtet werden konnte. Dies lässt vermuten, dass dieser Organismus bei einer zu starken Säurebildung des Fermenters schnell gehemmt werden würde und daher wahrscheinlich nicht maßgeblich zur Ansäuerung des Fermenters beiträgt.

### 4.8 Einschätzung der Bedeutung der gebildeten Produkte durch die Isolate

Die Stoffwechselreaktionen der milchsäurebildenden Bakterien, aber auch säurebildender Bakterien allgemein, werden maßgeblich von dem Wasserstoff-Partialdruck über die NAD-basierenden Redoxreaktionen beeinflusst (Costello et al., 1991). Durch oxidative Reaktionen beim Substratabbau werden vermehrt Elektronen auf NAD übertragen, sodass das vermehrt vorliegende NADH in reduktiven Reaktionen, wie z. B. der Reduktion von Pyruvat zu Milchsäure, wieder reoxidiert wird. Das Spektrum der dabei entstehenden Säuren setzt sich in Abhängigkeit der vorhandenen Mikroorganismen zusammen. Die Biozönose der Organismen im Fermenter hängt wiederum von zahlreichen Einflussfaktoren ab, welche insbesondere die Art der eingesetzten Substrate sowie chemischen Eigenschaften, wie z. B. pH-Wert oder Temperatur, betreffen.

Die Hauptprodukte der milchsäurebildenden Bakterien sind neben Milchsäure vor allem Essigsäure, Kohlenstoffdioxid und Ethanol. Während Essigsäure von acetoklastischen Methanbildnern genutzt wird, kann Kohlenstoffdioxid als Elektronenakzeptor beim hydrogenotrophen Stoffwechselweg für die Methanbildung genutzt werden. Einerseits kann eine erhöhte Essigsäurekonzentration durch den heterofermentativen Stoffwechsel die Methanbildung verstärken, andererseits steht dieser, im Vergleich zum homofermentativen Stoffwechsel, in Verbindung mit einem höheren Verlust an Trockensubstanz der Silage (McDonald et al., 1991; Vervaeren et al., 2010). Steigt die Essigsäurekonzentration jedoch zu stark an, nehmen die acetoklastischen Methanbildner ab und die hydrogenotrophen Methanbildner sind die dominanten Methanogenen (Castro et al., 2004; Lebhuhn et al., 2008). Im Gegensatz zu thermophil betriebenen Biogasanlagen, befinden sich in mesophilen Biogasfermentern deutlich mehr acetoklastische Methanogene vor, aufgrund einer längeren Verweilzeit und geringerer Raumbelastung (Bauer et al., 2008).

Im Gegensatz dazu muss die gebildete Milchsäure zunächst weiter abgebaut werden, um schließlich in Biogas überführt werden zu können. Cibis et al. (2016) isolierten Stämme aus Biogasanlagen, die aus Milchsäure Propionsäure und Essigsäure oder ausschließlich Essigsäure bildeten. Dabei können diese Säuren sowohl aus D- als auch aus L-Milchsäure gebildet werden (Gill et al., 1986). De Francisci et al. (2015) zeigten, dass Rindergülle bei einer Überfütterung mit Glucose zu einer mehr als 60-fachen Zunahme von *Lactobacillus* und 9-fachen Zunahme von Arten führt, die Milchsäure zu Propionsäure umwandeln. Interessanterweise nahm der Methanertrag dabei, nach einer zunächst leichten Stagnation, sogar leicht zu. Ähnlich wie die Milchsäure muss auch Ethanol, das im Zuge des

heterofermentativen Stoffwechsels gebildet werden kann, in Essigsäure und Wasserstoff abgebaut werden, um den methanogenen Archaeen zur Verfügung zu stehen. Pipyn & Verstraete (1981) wiesen darauf hin, dass beim Vergleich der energetischen Bilanzen der biochemischen Reaktionen, die für die Bildung von Methan aus Glucose in Frage kommen, Milchsäure und Ethanol als Zwischenprodukte zu einer höheren Biogasausbeute führen könnten.

Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit und unter Berücksichtigung themenverwandter Studien kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung von Milchsäure im Rahmen eines stabil ablaufenden Biogasprozesses die Biogasproduktion grundsätzlich nicht negativ beeinflusst. Vielmehr gibt es Studien, deren Ergebnisse eher auf eine Erhöhung der Methanproduktion hindeuten (Pipyn & Verstraete, 1981; De Francisci et al., 2015). Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass je mehr Milchsäure gebildet wird, desto größer auch das Risiko für die Akkumulation organischer Fettsäuren ist. Dies bedeutet, dass bei einer hohen Abundanz von milchsäurebildenden Bakterien sich auch die milchsäureabbauende Mikroorganismen stärker vermehren können und folglich Milchsäure in organische Fettsäuren, wie z. B. Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure, umwandeln (De Francisci et al., 2015). Ebenso kann durch eine zu starke Substratzufuhr die Akkumulation organischer Säuren verursacht werden. Infolgedessen wird der pH-Wert erniedrigt und der methanogene Stoffwechsel inhibiert. In solchen Fällen muss die Substratzufuhr unterbrochen werden, um einen möglichst schnellen Abbau der akkumulierten Säuren zu gewährleisten. Besonders die Bildung von Propionsäure ist aufgrund eines sehr langsamen mikrobiellen Abbaus problematisch (Nielsen et al., 2007). Dies wird durch den Vergleich der acetogenen Reaktionen der Säuren Propionsäure, Buttersäure, Ethanol und Milchsäure deutlich, da eine Abnahme der freien Energie von Propionsäure zu Milchsäure vorliegt (Thauer et al., 1977). Zudem inhibiert eine erhöhte Essigsäurekonzentration den Abbau von Propionsäure (Mawson et al., 1991). Ist die Übersäuerung des Fermenterinhaltens zu stark fortgeschritten, kann dies letztendlich den Zusammenbruch des gesamten Prozesses bedeuten.

#### **4.9. Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnten 199 milchsäurebildende Isolate aus fünf verschiedenen mesophilen Biogasanlagen isoliert werden. Die physiologischen Bedingungen, wie z. B. pH-Wert, Temperatur und Kohlenhydratstoffwechsel, deuten daraufhin, dass die milchsäurebildenden Isolate definitiv das Potential besitzen, eine aktive Rolle in Biogas-

anlagen zu spielen. Cibis et al. (2016) konnten einige Bakterien in Biogasanlagen identifizieren, die aus Milchsäure Essigsäure und Propionsäure bilden. In Anbetracht dessen ist es wahrscheinlich, dass je mehr Milchsäure gebildet wird, desto größer das Risiko für die Akkumulation organischer Säuren, insbesondere Propionsäure ist. Es wäre daher interessant, Biogasanlagen zu beproben, die Prozessstörungen aufgrund einer Versäuerung des Fermenterinhalt aufweisen. Durch eine quantitative Bestimmung der milchsäurebildenden Isolate mit dem in dieser Arbeit entwickelten Nachweissystem konnten neue Erkenntnisse in Hinblick auf deren Rolle in Biogasanlagen gewonnen werden. In weiterführenden Untersuchungen müsste das Ausmaß der beteiligten Stoffwechselreaktionen der isolierten Milchsäurebildner an dem anaeroben Fermentationsprozess einer Biogasanlage aufgeklärt werden. Zudem wären tiefere Einblicke in die stoffwechselphysiologischen Interaktionen zwischen den Milchsäurebildnern und den Milchsäureabbauern bzw. den biogasbildenden Mikroorganismen sinnvoll. Hierfür wären Laborfermenter mit definiertem Substratinhalt und definierten Zellzahlen von milchsäurebildenden Isolaten denkbar, um deren stoffwechselphysiologischen Leistungen in Biogasanlagen abschätzen zu können. Im Zuge dessen wären auch Versuche in Cokultur mit acetogenen und methanogenen Organismen interessant, um interspezifische Einflüsse studieren zu können. Im Allgemeinen dient ein tieferes Verständnis der biogasproduzierenden Mikroorganismen und des Biogasprozesses der stetigen Verbesserung der Umsetzung von Bio-Rohstoffen in Biogas.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Bildung von Milchsäure als Zwischenprodukt der anaeroben Abbaukette in Biogasanlagen näher betrachtet werden. Es wurden fünf verschiedene mesophile Biogasanlagen beprobt, die mit nachwachsenden Rohstoffen, vornehmlich Mais- und Grassilage, sowie flüssigen Inputstoffen wie Rinder- oder Schweinegülle gefüttert wurden. Für die Isolierung milchsäurebildender Bakterien aus Biogasanlagen wurden zahlreiche Medien und verschiedene Isolierungsstrategien angewandt, um möglichst viele verschiedene Arten zu gewinnen. Insgesamt konnte bei 199 Isolaten eine Milchsäurebildung nachgewiesen werden, die wiederum 21 verschiedenen Arten oder Gruppen, die mehrere Arten beinhalteten, zugeordnet werden konnten. Mit Hilfe einer 16S rDNA-Sequenzanalyse konnten die isolierten Milchsäurebildner identifiziert werden. Die Isolate gehörten den Ordnungen Lactobacillales, Bacillales und Clostridiales an. Mehr als die Hälfte der Isolate konnten als Milchsäurebakterien identifiziert werden, die sich durch die Bildung von Milchsäure als Hauptprodukt auszeichneten. Neben zahlreichen obligat heterofermentativen Milchsäurebakterien, die neben Milchsäure auch Essigsäure, Ethanol und Kohlenstoffdioxid bilden konnten (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. farraginis*, *Lb. kefir*, *Lb. mucosae*, *Lb. parafarraginis*, *Lb. rafi*, *Lb. rossiae*), wurden auch obligat homofermentative Arten (*P. parvulus*, *S. equinus*-Gr.-Isolat), sowie ein fakultativ heterofermentatives Milchsäurebakterium (*P. acidilactici*) identifiziert. Weiterhin wurden Arten der Gattung *Bacillus* (*B. aerophilus*-Gr.-Isolat, *B. cereus*-Gr., *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. thermoamylovorans*), *Clostridium* (*C. aminovalericum* und *C. botulinum*-Gr.-Isolat) und ein *Ps. alactolyticus*-verwandter Stamm isoliert. Da Milchsäurebakterien auch beim Silierungsprozess eine zentrale Rolle spielen, gelangen diese bereits durch den Einsatz von Silage als Hauptsubstrat für Biogasanlagen in höherer Zellzahl in den Fermenter. Dementsprechend wurde hauptsächlich die Art *Lb. buchneri* isoliert, die dafür bekannt ist, sich gegenüber anderen Mikroorganismen im Silierungsprozess durchzusetzen.

Auf Grundlage von Untersuchungen bezüglich der Abbaufähigkeit spezieller Kohlenhydratverbindungen konnte gezeigt werden, dass die *Lactobacillus*- und *Bacillus*-Isolate ein breites Spektrum an relevanten Kohlenhydratverbindungen zu Säuren abbauen können. Zudem wurde belegt, dass die *Bacillus*-Isolate eine Vielzahl an Polymeren abbauen können, die in einer Biogasanlage von Bedeutung sind. Es konnte somit bewiesen werden, dass die *Lactobacillus*- und *Bacillus*-Isolate an der Acidogenese und die *Bacillus*-Isolate zusätzlich an der ersten Abbaustufe, der Hydrolyse des Ausgangsmaterials, beteiligt sind.

Weiterhin ist es gelungen ein qualitatives Nachweissystem für 14 isolierte Arten zu entwickeln, wodurch eine schnelle Identifizierung mit Hilfe einer Multiplex-PCR auf Artebene möglich ist. Zudem konnte ein Nachweisverfahren zur Quantifizierung von insgesamt 17 Isolaten mit Hilfe der qPCR erfolgreich etabliert werden. Die Entwicklung spezies- oder isolatspezifischer Primer erlaubte hierbei die Detektion einzelner milchsäurebildender Isolate in einer Größenordnung von ca.  $10^3$  bis  $10^6$  Kopien eines spezifischen Genomabschnitts pro g Fermenterprobe. Besonders für das Isolat der *S. equinus*-Gr. konnten hohe Kopienzahlen bestimmt werden. Die zusätzliche Isolierung dieses homofermentativen Milchsäurebakteriums aus einem Medium mit Stärke als Kohlenstoffquelle könnte auf eine zentrale Rolle dieses Isolates hindeuten. Auch für die obligat oder fakultativ heterofermentativen Milchsäurebakterien *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. parafarraginis*, *Lb. rapi* und *P. acidilactici* wurden hohe Kopienzahlen bestimmt. Die Durchführung der Lebendkeimzahlbestimmung durch die MPN-Methode bewies darüber hinaus, dass die Milchsäurebildner in einer Größenordnung von  $10^5$  bis  $10^7$  Zellen pro g Fermenterprobe noch immer lebensfähig waren.

Durch diese Arbeit konnten neue Einblicke in die Acidogenese, insbesondere in die Milchsäurebildung, gewonnen werden. Besonders die Erkenntnisse über die an der Milchsäurebildung beteiligten Bakterien können zur Problembehebung bei Überschuss an Propionsäure oder mikrobiell verursachten Schwierigkeiten durch den Nachweis von einzelnen Species herangezogen werden.

### **Abstract**

In the present work lactic acid forming bacteria were isolated from five different mesophilic biogas plants. The fermenters were fed with renewable raw materials, mainly maize silage and manure from cattle or pig. For the isolation several media and isolation strategies were used to receive different species of lactic acid forming bacteria. Overall, for 199 of the obtained isolates lactic acid formation was proved. In total, the isolates could be clustered in 21 different species depending on their characteristic SAPD-PCR band patterns. According to 16S rRNA gene sequence analyses, the isolates belonged to the phyla Firmicutes and to the orders Lactobacillales, Bacillales and Clostridiales. More than half of the isolates belonged to the lactic acid bacteria and produced lactic acid as main product. Besides many heterofermentative lactic acid bacteria, which formed lactic acid, acetic acid or ethanol as well as carbon dioxide (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. farraginis*,

*Lb. kefiri*, *Lb. mucosae*, *Lb. parafarraginis*, *Lb. rapi*, *Lb. rossiae*), obligate homofermentative (*P. parvulus*, *S. equinus* group) and a facultative heterofermentative lactic acid bacterium were also isolated (*P. acidilactici*). In addition, several species of the genus *Bacillus* (*B. aerophilus* group, *B. cereus* group, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. thermoamylovorans*) and *Clostridium* (*C. aminovalericum*, *C. botulinum* group) as well as a *Ps. alactolyticus* related strain were received. The most often isolated bacterium was *Lb. buchneri*, which is well known to be the dominating *Lactobacillus* species in silage.

The investigations for degradability of some carbohydrates indicated that *Lactobacillus* and *Bacillus* isolates were able to use a wide range of mono- and oligosaccharides. Moreover, *Bacillus* isolates showed a degradability of many polymers. Based on these results *Lactobacillus* isolates are involved in the acidogenetic step of anaerobic fermentation in biogas plants and *Bacillus* isolates additionally in the hydrolytic step. For most of the isolates a qualitative multiplex system and a quantitative real time PCR detection could be realized by development of isolate-specific primer. Quantitative results revealed mainly  $10^3 - 10^6$  copies of a specific genome sequence per g fermenter sample. Especially for the isolates *S. equinus* group, *Lb. buchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. parafarraginis*, *Lb. rapi* and *P. acidilactici* a high copy value was determined. Furthermore, the isolation of the *S. equinus* group bacterium in a medium with starch as sole carbon source pointed out that this strain probably possess a role in the hydrolytic and acidogenetic step of anaerobic fermentation in biogas plants. Viable cell counts of  $10^5 - 10^7$  cells ml<sup>-1</sup> fermenter sample demonstrated that the lactic acid bacteria were still viable.

The results of the present study provide novel insights into acidogenesis of mesophilic biogas plants regarding lactic acid formation. Especially new findings about the diversity of lactic acid forming bacteria and the development of a fast detection could be helpful to solve problems based on propionic acid excess or other microbial caused disturbances in biogas plants.

## 6. Literatur

Ahlert, S., Zimmermann, R., Ebling, J., & König, H. (2016). Analysis of propionate degrading consortia from agricultural biogas plants. *The Open Microbiology Journal*. In press.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.

Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 343-346.

Azbar, N., Ursillo, P., & Speece, R. E. (2001). Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes. *Water Research*, 35, 817-829.

Bagge, E., Persson, M., & Johansson, K. E. (2010). Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1549-1565.

Bauer, C., Lebuhn, M., & Gronauer, A. (2009). Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. *LfL-Schriftenreihe*, 12, 2009.

Bayer. Landesamt für Umwelt (2007). *Biogashandbuch Bayer. Landesamt für Umweltn – Materialband*, Kapitel 1.1 – 1.5, Stand 2007. Verfügbar unter: <http://www.lfu.Bayer.Landesamt für Umweltn.de/energie/biogashandbuch/doc/kap1bis15.pdf> [15.06.2016].

BCCM. Belgian co-ordinated collections of micro-organsims. (2016). Medium 14. Verfügbar unter: <http://bccm.belspo.be/catalogues/lmg-media-details?CultureMediaID=14>. [28.06.2016].

Berthier, F., & Ehrlich, S. D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, 161, 97-106.

BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technik (2016a). Das Erneuerbare Energien Gesetz. Verfügbar unter [http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/Recht-Politik/Das\\_EEG/das\\_eeg.html](http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/Recht-Politik/Das_EEG/das_eeg.html) [15.06.2016].

BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technik (2016b). Entwurf eines Gesetzes zur Einführung von Ausschreibungen für Strom aus erneuerbaren Energien und zu weiteren Änderungen des Rechts der erneuerbaren Energien. Verfügbar unter <http://www.bmwi.de/BMWi/Redaktion/PDF/G/gesetzentwurf-ausschreibungen-erneuerbare-energien-aenderungen-eeg2016,property=pdf,bereich=bmwi2012,sprache=de,rwb=true.pdf> [28.06.2016].

BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technik (2016c). Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland. Verfügbar unter [http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/Service/Erneuerbare\\_Energien\\_in\\_Zahlen/erneuerbare-energien\\_in\\_zahlen.html](http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/Service/Erneuerbare_Energien_in_Zahlen/erneuerbare-energien_in_zahlen.html) [15.06.2016].

BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technik (2016d). Erneuerbare Energien in Zahlen 2014. Verfügbar unter <http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Redaktion/DE/Downloads/erneuerbare-energien-in-zahlen-2014.pdf> [15.06.2016].

BMWi. Bundesministerium für Wirtschaft und Technik (2016e). EEG: Daten und Fakten. Verfügbar unter [http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/Recht-Politik/Das\\_EEG/DatenFakten/daten-und-fakten.html](http://www.erneuerbare-energien.de/EE/Navigation/DE/Recht-Politik/Das_EEG/DatenFakten/daten-und-fakten.html) [15.06.2016].

Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J., Neuhaus, G., & Sonnenwald, U. (2008). *Strasburger – Lehrbuch der Botanik* (36. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Bringel, F., Curk, M. C., & Hubert, J. C. (1996). Characterization of lactobacilli by Southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE probe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 588-594.

Castro, H., Ogram, A., & Reddy, K. R. (2004). Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6559-6568.

Chou, C. H., Han, C. L., Chang, J. J., & Lay, J. J. (2011). Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 13972-13983.

Cibis, K. G., Gneipel, A., & König, H. (2016). Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *Journal of Biotechnology*, 220, 51-63.

Cirne, D. G., Lehtomäki, A., Björnsson, L., & Blackall, L. L. (2007). Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 516-527.

Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Streicher, C., Patel, B. K. C., Dwivedi, P. P., Pot, B., Prensier, G., & Garcia, J. L. (1995). *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *45*, 9-16.

Cord-Ruwisch, R., Seitz, H. J., & Conrad, R. (1988). The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology*, *149*, 350-357.

Corsetti, A., Settanni, L., Van Sinderen, D., Felis, G. E., Dellaglio, F., & Gobbetti, M. (2005). *Lactobacillus rossii* sp. nov., isolated from wheat sourdough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*, 35-40.

Costello, D. J., Greenfield, P. F., & Lee, P. L. (1991). Dynamic modelling of a single-stage high-rate anaerobic reactor—I. Model derivation. *Water Research*, *25*, 847-858.

De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., & Gobbetti, M. (2006). Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*, *157*, 792-801.

De Francisci, D., Kougias, P. G., Treu, L., Campanaro, S., & Angelidaki, I. (2015). Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition. *Bioresource Technology*, *176*, 56-64.

Doi, K., Nishizaki, Y., Fujino, Y., Ohshima, T., Ohmomo, S., & Ogata, S. (2009). *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*, 1007-1010.

Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H., & Spoelstra, S. F. (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, *87*, 583-594.

Dröge, S. (2011). FNR-Abschlussbericht zum Verbundvorhaben: Früherkennung und Behebung von Fehlgärungen zur Erhöhung der Prozeßsicherheit und Schadensverhütung in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Propionsäurebildung; Teilvorhaben 2 (22003008). Verfügbar unter <http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/berichte/22003008.pdf> [19.07.2016].

DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2007a). Medium 1. Verfügbar unter: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium1.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1.pdf) [19.03.2013].

- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2007b). Medium 11. Verfügbar unter: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium11.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium11.pdf) [19.03.2013].
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2007c). Medium 381. Verfügbar unter: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium381.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium381.pdf) [19.03.2013].
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2008). Medium 58. Verfügbar unter: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium58.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium58.pdf) [19.03.2013].
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2009). Medium 104. Verfügbar unter [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium104.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium104.pdf) [19.03.2013].
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2012). Medium 92. Verfügbar unter [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium92.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium92.pdf) [4.03.2013].
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2014a). Medium 141. Verfügbar unter: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium141.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf) [22.06.2016].
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2014b). Medium 318. Verfügbar unter: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium318.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium318.pdf) [22.06.2016].
- Eikmeyer, F. G., Köfinger, P., Poschenel, A., Jünemann, S., Zakrzewski, M., Heidl, S., Mayrhuber, E., Grabherr, R., Pühler, A., Schwab, H., & Schlüter, A. (2013). Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *Journal of Biotechnology*, 167, 334-343.
- Endo, A., & Okada, S. (2007). *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 708-712.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8, 44-61.

Filya, I., Sucu, E., & Karabulut, A. (2006). The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of Applied Microbiology*, *101*, 1216-1223.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., & Jurtshuk JR, P. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *42*, 166-170.

Fröhlich, J., & Pfannebecker, J. (2007). Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the NotI identification sequence. *Patent number: EP2027285 (A1)*.

From, C., Hormazabal, V., & Granum, P. E. (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*, *115*, 319-324.

Fuchs, G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie* (7. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

FvB. Fachverband Biogas e.V. (2015). Branchenzahlen 2014 und Prognose der Branchenentwicklung 2015. Verfügbar unter [http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE\\_Branchenzahlen/\\$file/15-11-19\\_Biogas%20Branchenzahlen-2014\\_Prognose-2015\\_final.pdf](http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen/$file/15-11-19_Biogas%20Branchenzahlen-2014_Prognose-2015_final.pdf) [15.06.2016].

Gao, T., Wong, Y., Ng, C., & Ho, K. (2012). L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, *121*, 105-110.

Gill, M., Siddons, R. C., Beever, D. E., & Rowe, J. B. (1986). Metabolism of lactic acid isomers in the rumen of silage-fed sheep. *British Journal of Nutrition*, *55*, 399-407.

Godornes, C., Leader, B. T., Molini, B. J., Centurion-Lara, A., & Lukehart, S. A. (2007). Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine*, *38*, 1-7.

Haarman, M., & Knol, J. (2006). Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 2359-2365.

Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Benndorf, D., Heyer, R., Rapp, E., Pühler, A., Reichl, U., & Klocke, M. (2013). Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*, 330-338.

Hardman, J. K., & Stadtman, T. C. (1960). Metabolism of  $\omega$ -amino acids: I. Fermentation of  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Clostridium aminobutyricum*. sp. 1. *Journal of Bacteriology*, *79*, 544-548.

- Heldt, H. W., & Piechulla, B. (2008). *Pflanzenbiochemie* (4. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jeoh, T., Wilson, D. B., & Walker, L. P. (2006). Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. *Biotechnology Progress*, *22*, 270-277.
- Johanningsmeier, S. D., & McFeeters, R. F. (2013). Metabolism of lactic acid in fermented cucumbers by *Lactobacillus buchneri* and related species, potential spoilage organisms in reduced salt fermentations. *Food Microbiology*, *35*, 129-135.
- Kaiser, F., Metzner, T., Effenberger, M., & Gronauer, A., (2008). Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In *Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Schriftenreihe*. Freising: Lerchl-Druck.
- 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: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*, 716-721.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 346-351.
- Koeck, D. E., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Albersmeier, A., Zverlov, V. V., Pühler, A., Schwarz, W.H., Liebl, W., & Schlüter, A. (2014). First draft genome sequence of the amylolytic *Bacillus thermoamylovorans* wild-type strain 1A1 isolated from a thermophilic biogas plant. *Journal of Biotechnology*, *192*, 154-155.
- König, H. & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (Eds.). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-29). Heidelberg: Springer Verlag.
- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. A., Gartemann, K. H., Krömeke, H., Neuweyer, H., Szczepanowski, R., Tauch, A., & Goesmann, A. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology*, *136*, 91-101.
- Lebhuhn, M., Bauer, C., & Gronauer, A. (2008). Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik. *VDLUFA-Schriftenreihe*, *64*, 118-125.
- Lebuhn, M., Munk, B., & Effenberger, M. (2014). Agricultural biogas production in Germany-from practice to microbiology basics. *Energy, Sustainability and Society*, *4*, 1-21.

Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., & Sparling, R. (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*, 1496-1503.

Li, A., Chu, Y. N., Wang, X., Ren, L., Yu, J., Liu, X., Yan, J., Zhang, L., Wu, S., & Li, S. (2013). A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnology for Biofuels*, *6*, 1-17.

Linke, B., & Vollmer, G. R. (2002). Kofermentation: Gemeinsame Vergärung von Gülle und pflanzlichen Biomassen in kontinuierlichen Laborversuchen. *Institut für Agrartechnik Bornim eV*, *32*, 35-41.

Lopes, P.G.M., Cantarelli, V.V., Agnes, G., Costabeber, A.M., & d'Azevedo, P.A. (2014). Novel real-time PCR assays using TaqMan minor groove binder probes for identification of fecal carriage of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex from rectal swab specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*, 974-976.

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *30*, 70-83.

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. *Journal of Biotechnology*, *168*, 734-736.

Mawson, A. J., Earle, R. L., & Larsen, V. F. (1991). Degradation of acetic and propionic acids in the methane fermentation. *Water Research*, *25*, 1549-1554.

May, T., Koch-Singenstreu, M., Ebling, J., Stantscheff, R., Müller, L., Jacobi, F., Polag, D., Keppler, F., & König, H. (2015). Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analysis of microbial communities in a biogas digester. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*, 6855-6863.

Mayhew, J. W., Onderdonk, A. B., & Gorbach, S. L. (1975). Effects of time and growth media on short-chain fatty acid production by *Bacteroides fragilis*. *Applied Microbiology*, *29*, 472-475.

McCrary, M. H. (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. *The Journal of Infectious Diseases*, *17*, 183-212.

McCrary, M. H. (1918). Tables for rapid interpretation of fermentation-tube results. *The Public Health Journal*, *9*, 201-220.

- McDonald, P., Henderson, A. R., & Heron, S. J. E. (1991). *The biochemistry of ensilage* (2. Edition). *Chalcombe Publication, Bucks, UK*.
- Merlin Christy, P., Gopinath, L. R., & Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *34*, 167-173.
- Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., & Nurk, A. (2006). L (+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*, 861-867.
- Mizuno, O., Li, Y. Y., & Noike, T. (1998). The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Water Research*, *32*, 1626-1634.
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, *55*, 453-460.
- Mukengele, M., & Oechsner, H. (2007). Einfluss der Silierung auf den spezifischen Methanertrag bei Mais. *Landtechnik–Agricultural Engineering*, *62*, 20-21.
- Mundt, J. O., & Hammer, J. L. (1968). Lactobacilli on plants. *Applied Microbiology*, *16*, 1326-1330.
- Mundt, J. O., Beattie, W. G., & Wieland, F. R. (1969). Pediococci residing on plants. *Journal of Bacteriology*, *98*, 938-942.
- Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Reviews in Microbiology*, *52*, 165-190.
- Neuhaus, J., Shehata, A. A., & Krüger, M. (2015). Detection of pathogenic clostridia in biogas plant wastes. *Folia Microbiologica*, *60*, 15-19.
- Nielsen, H. B., Uellendahl, H., & Ahring, B. K. (2007). Regulation and optimization of the biogas process: propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy*, *31*, 820-830.
- Noike, T., Endo, G., Chang, J. E., Yaguchi, J. I., & Matsumoto, J. I. (1985). Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, *27*, 1482-1489.
- Ou, M. S., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2011). L (+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *38*, 599-605.

Oude Elferink, S. J. W. H. , Driehuis, F., Gottschal, J. C., & Spoelstra, S. F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Papers*, 17-30.

Pankhania, I. P., Spormann, A. M., Hamilton, W. A., & Thauer, R. K. (1988). Lactate conversion to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in cell suspensions of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg): indications for the involvement of an energy driven reaction. *Archives of Microbiology*, 150, 26-31.

Parkin, G. F., Lynch, N. A., Kuo, W. C., Van Keuren, E. L., & Bhattacharya, S. K. (1990). Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 780-788.

Payot, T., Chemaly, Z., & Fick, M. (1999). Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 191-199.

Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J., & Gaudin, C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic, mesophilic: species from decayed grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34, 155-159.

Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J., & König, H. (2013). Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*, 33, 48-54.

Pfannebecker, J. (2008). Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art-und Stamm-Identifizierung pro-und eukaryotischer Organismen. *Doktorarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz*.

Pfannebecker, J., & Fröhlich J. (2008). Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 288-296

Pipyn, P., & Verstraete, W. (1981). Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1145-1154.

Qi, Y., Patra, G., Liang, X., Williams, L. E., Rose, S., Redkar, R. J., & DelVecchio, V. G. (2001). Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3720-3727.

Ramos, H. C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser P., & Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*, 182, 3072-3080.

Richter, H., Vlad, D., & Uden, G. (2001). Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. *Archives of Microbiology*, 175, 26-31.

- Rogosa, M., & Hansen, P. A. (1971). Nomenclatural considerations of certain species of *Lactobacillus* Beijerinck. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 21, 177-186.
- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., & Jonsson, H. (2000). *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 251-258.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Scheifinger, C. C., Linehan, B., & Wolin, M. J. (1975). H<sub>2</sub> production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methanogenic bacteria. *Applied Microbiology*, 29, 480-483.
- Schieder, D., Gronauer, A., Lebuhn, M., Bayer, K., Beck, J., Hiepp, G., & Binder, S. (2010). Prozessmodell Biogas. Biogas Forum Bayern. Verfügbar unter [https://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell\\_Biogas.pdf](https://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf) [15.06.2016].
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M. D., Regnault, B., Grimont, P. A., & Bouvet, A. (2000). *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1425-1434.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse O., Mussnug, J. H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte K. J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P., & Goesmann, A. (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology*, 136, 77-90.
- Schnürer, A., Schink, B., & Svensson, B. H. (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 1145-1152.
- Schwab, M., & Reinhold, G. (2006). Biogaserträge aus Energiepflanzen-Eine kritische Bewertung des Datenpotentials. Verfügbar unter [http://biogas-infoboard.de/pdf/4\\_SCHWAB\\_Biogasertraege.pdf](http://biogas-infoboard.de/pdf/4_SCHWAB_Biogasertraege.pdf) [20.07.2016].
- Seeliger, S., Janssen, P. H., & Schink, B. (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiology Letters*, 211, 65-70.
- Shallom, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 219-228.

Smith, S. M., Eng, R. H., & Buccini, F. (1986). Use of D-lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections. *Journal of Infectious Diseases*, *154*, 658-664.

Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, *33*, 152.

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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *44*, 846-849.

Stadtman, E. R., Stadtman, T. C., Pastan, I., & Smith, L. D. (1972). *Clostridium barkeri* sp. n. *Journal of Bacteriology*, *110*, 758.

Stantscheff, R., Kuever, J., Rabenstein, A., Seyfarth, K., Dröge, S., & König, H. (2014). Isolation and differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*, 5719-5735.

Stewart, B. J., & Leatherwood, J. M. (1976). Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *Journal of Bacteriology*, *128*, 609-615.

Stirling, A. C., & Whittenbury, R. (1963). Sources of the lactic acid bacteria occurring in silage. *Journal of Applied Bacteriology*, *26*, 86-90.

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*, 1621-1651.

Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 11030-11035.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 2725-2729.

Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, *41*, 100.

Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*, 249-266.

Vavilin, V. A., Rytov, S. V., & Lokshina, L. Y. (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*, *56*, 229-237.

- Vervaeren, H., Hostyn, K., Ghekiere, G., & Willems, B. (2010). Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production. *Renewable Energy*, *35*, 2089-2093.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.H., & Whitman, W. (Eds.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Wallrabenstein, C., Hauschild, E., & Schink, B. (1995). *Syntrophobacter pfennigii* sp. nov., new syntrophically propionate-oxidizing anaerobe growing in pure culture with propionate and sulfate. *Archives of Microbiology*, *164*, 346-352.
- Walter, J., Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D. M., Munro, K., & Alatosava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 297-303.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., & Hammes, W. P. (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 2578-2585.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Meng, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, *33*, 848-853.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Tomii, Y., Sasamoto, M., Makino, H., Kudo, Y., & Okada, S. (2009). *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*, 754-760.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*, 849-860.
- Weiler, E.W., & Nover, L. (2008). *Allgemeine und molekulare Botanik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Weinberg, Z. G., & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, *19*, 53-68.
- Willems, A., & Collins, M. D. (1996). Phylogenetic relationships of the renera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *46*, 1083-1087.

Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 1.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 1.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 670-679.

Zverlov, V. V., Hiegl, W., Köck, D. E., Kellermann, J., Köllmeier, T., & Schwarz, W. H. (2010). Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Engineering in Life Sciences*, 10, 528-536.

## 7. Anhang

### 7.1 Ausgewählte Genomabschnitte der Isolate für die Primerentwicklung

***B. coagulans*** N83 – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer G-Not, Größe: 1072 (Multiplex-PCR-Produkt: 716 bp, qPCR-Produkt: 174 bp)

AGCGGCCGCGGGGAACAGGAGCCGGCAACGCGTTCCAACATTTTTAGCATACGCTTTTGACGCATATAGGGGCTGCAGATCACATTCCGTAACCTTTAGCTCAGACGGGTACACCGGGCCGTTTTATATGGCCCGCAATCTTTAACGGAAAAGGGCTGATCAAAAATGGAATAAAAAAGGCATTGTTTGGGGAATTGGAAGGGCGTCCGGTCCATGCTATGAATTGAAAAATGACCGCGGCATATCTGTAACGGTGCTTGAATACGGTTGCATCATCAATAAGATCATCGTGCCGGACAAAAACGGCAAAGCGGAAAATATCGTGCTCGGGTATGACAACCTTGACGGCTACCTCCATGGTGTCCGTATTTTCGGCGCTATCATCGGCCGTATTGCCGGCAGGATCGCCGGAGCTTCTTTTGAAGTGGACGGCAAAA  
CATACAAGCTTTCTGCCAATGAAAACCGCAACCATCTCCATGGCGGCTTCAAAGGGTTTAAACGCCGTCATCTGG  
GACAGCACACCCATTGAACAAGACGGCGCAGTTGGTGTGAAATTTACGCATATAAGCCCGACGGCGAAGAAG  
GCTATCCCGGAAATCTCGATGCCACCGTGACCTATCTTTTAAACAAATGAACAAGAAGTGAAGCTGTCTTATCA  
GGCATAACGGATAAAAAACGATCGTCAACATGACCAATCATGCATACCTCAATTTAAGCGGCGATATGAAA  
CGCGATGTACGCGGGCACAAATTGCAAAATCCCGAGTAACCGTGTGCTTGAAGTGGCCAGGAAACGCTGCCGA  
CAGGAAAACCTTTTCGATGTCACCGGCACCGGCTTCGATTTTCGGAACGGGGCAAAAATCGAAGACGGCACGGT  
ATCAGATCATCCGCAAAACGTCCTTGCAGGAAACAGCTATGACCACGCGTTTTTATAGCCGGAAACGGAAAAA  
CCGATCCGCTTAAAGCCGACGAGAGCGGGCGGTGCTGCCGGTGCAAACCCACCAGCCATGCGTCGTCTTTA  
CACCTTGAATCCAATGGGCAATGACGAATATGAAATCCCGGGCCGCT

***B. licheniformis*** LiF4 – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 293 (Multiplex-PCR-Produkt/qPCR-Produkt: 104 bp)

AGCGGCCGCGGGCAAGCCCGATGAGGAAAAAGATAGCCGCAAGAATGACGGAAAGCCTGCAAAAACAGCGCCCA  
GCTGACGATTACGATGAAGGGGACATCACGAAATTAACAGTCTTGCAAAAACAGCTTAATGAAAACCGCTCAA  
TCCAGATACGATACGAAGCTGACGATCACTGATTTTGGCCAGGGCAGCTGTTTTTTCGCTTTTGATCATCC  
GGCCATGAACAGTGTTTTATCAAGACGGAAGGCTTGCGACCTTTGAGCATGTTTATTAGGAGTGGCGGCCGCT

***B. aerophilus*-Gruppe** NH1.9 – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer G-Not, Größe: 1644 (Multiplex-PCR-Produkt: 1217 bp, qPCR-Produkt: 72 bp)

AGCGGCCGCGGGCGTATCATACTGCGCGGTATGAGATGGAGCCTTCTTTAAAAACAAGAGCTTGTCTGATTG  
GCGGAGGAGATTACAGCAGTAGAAGAAGGGTGTTTACCTCACTCGCTTTGCGTCTAAAGTCACTATTGTCCATAG  
ACGCGACAAACTTCGTGCCCAAAGCATCTTACAAGCACGTGCATTTGATAATGAAAAAATCGACTTTATGTGG  
AACAAAACCGTCAAAGAAATCAATGAAGAGAACGGGAAAAGTCCGGCAGTGTGACATTAATTGATACCGTGACA  
GGTGAGGAAGAAGACTTCAAAAACAGATGGCGTCTTTATCTACATCGGTATGCTGCCGCTGTCTAAACCATTTG  
AAAATCTAGGGATTACAAATGCAGAGGGCTACATTGAGACGAACGAAAGAATGGAACAACAAAGTTGAAGGAA  
TCTTCGACGCTGGTGACATTCGTGAGAAAACCTTCGTCAAATCGTCACAGCAACAGGTGATGGAAGTATTGC  
AGCACAGAGTGACACAGCATTATGTAGAAGAGCTTGCTGAAAAGCTAAAAGCAATGAAAAATAACAGCTGTCTG  
AAATCCTTAATATGCGTCACGGGCTTTTAACTGGAATGTAACACGGTGAACAATATCCGTTATGATAAACT  
AGTAATTGACCCCTTTTATAAGGAATACATGTTTGGCACGGATGTGAATCCGTGTCCTTTTTTTGCTTTAAAA  
TCAGAAATTCACGAGATGTTACAAAATGACGCATGGAGAACCCTTAGATGTTGAAAAATAAAGAATAGAGA  
AACTGCCCGTCACCCATATTCATACGAAAACCTGTCTGTTTTAGTGAAGAACGGGCATGTTTATTGTTGGGAG  
TCATGATGAACCTGTATAATAAGAAAAAGACATAAAAAGAGTAGGTGACAGCTGATGCAACGAGTAACCAATT  
GTGTGCTGCATCACGAAGATCAAGTCTCTTGCTGCAAAAAGCCAAAGACGAGGCTGGTGGGTAGCACCTGGCGG  
CAAAAATGGAGAGCGGAGAATCGGTCAAGGATTCAGTCTGCGAGAATTTAGAGAAGAAACAGGCATTTATAT  
TTTAAATCCGCAGCTAAAAGGGCTGTTTACCTTTATCATAAAAAGAAGGGCATCAAATCGTTCAAGAGTGGATG  
ATGTTACCTTTATGGCAGATTCCTTTACAGGAAAAACGATCAGAGTCGGAGGAAGGCATTTTAAAAATGGC  
GAAAGGACTACTCCACGGCACTTTTACGTATACACCAGATTTTGAGCTGATTGCTTATCGATTAGATCCTCAA  
GGAGACTAATAAATGAACCGTTTTTATAAAAAGAGGAGAGGGAGCAGGCATGAATACGCACAAAACAAGATGAT  
ATTCAGCTTGTGATTATTACAGGGATGTCAGGTGCGGGGAAAACCGTTGCCATCAAAGCTTTGAAGACTTAG

GTTACTTTTGTGTGGATAACTTACCGCCATCACTTTTACCGAAGTTTCTAGAGCTCATGAAGGAATCCAATTC  
AAAGATGAGCAAGGTGGCCCTTGTGATGGATTTGCGGGCCGCT

**B. thermoamylovorans** Gl2a – PCR-Produkt mit dem nSAPD-Primer G-Not-G, Größe: 599  
bp (Multiplex-PCR-Produkt: 499 bp, qPCR-Produkt: 161 bp)

AGCGGCCGCGGAGGGATACTTCATTTTGGGACTCAGTAACTGCTCTTTTCTCCACCTCTTGTACTGGTGTGAA  
AGTGCTTTTCTATACCATCAATAAAGATAATGGTTTCTCCTGATAATAATTTTCCAAATAAATCGTTCCAGT  
CATATACGGAAGTGACATTCGTAATAGGAAGTAATTTTTTTTCAAGATAATCGAAGCTTTTTTCGATAGAAAC  
AGCTTCTGTAAACGAATATTCAGTCAGTAATGTATGAATAATCGTTTCATTAACGGTTTTTGTCAATCAAT  
CCGTCAACCATAACCAAGGCAGCTTTAATTGGTGGTTCATCCGCTAAGTCAATTTGCCTAATAATAATATCTG  
CACTATTTCCGGTTGTATTAAGGATGGTTTGTAAAGTTTTACTTAAATCGTTATTTAAAAATCGTCTAGAAAT  
ATCGTTTGTCTGTCCACTTGTATCTTTTTTAGCTGGTTGATTCTTTTTCTTCTTTTTTTGGGTTTTGAAATA  
ATTTTGAGACGAACCCATCACAAGTTACCTCTAGATGACAGGACGTTTTATGATTGCGTTTATCCAGTAAC  
AGCCGCGGCCGCT

**B. subtilis-Gruppe** LiF4a – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer A-Not, Größe: 654 bp  
(Multiplex-/qPCR-Produkt: 191 bp)

AGCGGCCGCAAAAGCACTGGCTGTGCATTCGCGACCATCATAAACGGTTAATGAAATTGAAGCTGAACTGAAA  
AAATGGCAGATGCATATCGACAGGCTGGACAAGCTGCAAGCTGTGTTTAAAGGCAATACCTTCGTGCAATTTT  
TAGCTGAGGAGCAGCTTCAAAGCGTTGCGAGGGACGCTCAGCAAGACTCAGTATGCTGACAAGACAGCGCTA  
TGCCATCGAAGTAGATTCTGAGGGCGGCTTCGTGATGCGGGATGACGCGAATGGAGGCGTACGACGCCGGTT  
TCCAGTTTGTCTGGAGGAGAGACCTTCCTCACCTCGCTTCACTTGTCTTTCGCTGTCTGCGCAGATTCAGCT  
TCGGGGGAATACCCGCTGCAGTCTTTTTCTTAGATGAAGGCTTCGGCACACTGGATCAAGATCTGCTTGAT  
ACGGTTGTAACCGCCTTGAAAAACTTCAGTCAGACAACCTGGCTGTGCGTGTGCATCAGCCATGTGCAGGAAC  
TGCGTGCACGGCTTCCGAAAAAGCTGATCGTCCATCCGGCTGAACCGAGCGGCCGCGGTACCGGGTATCACTT  
GAGTTGATGTAAGGGAGGAGCGGATATGGCAAAGCAGATTGCCGAATATGTGAGCTGTGCGGCCGCT

**C. aminovalericum** LiF1 – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer A-Not, Größe: 800 bp  
(Multiplex-PCR-Produkt: 727 bp, qPCR-Produkt: 178 bp)

AGCGGCCGCACAATAGGGCAAGCAGAAGAACAACACTATCCATTTTATTACCTTTAGACAACACATACGATGTAA  
CTGTAGATACGCAATAACGATACAATAGAAAAATGTGCTGATAAAAATTATAGAGCTATTAGATTGTCATAATA  
ATTATACGGCATTCAAAATCCTTTGGAAGCAACGTAACAAATAAGCATTCTGGAGAAAGTACTGAAAAATAG  
TATACGCCTTGATAATCAGATTTAAGGACAGTCAAATTTAAGTAAAATTAAGCTATTATAACTTTGGGTATAA  
TGGCTTTTTGTATTTGACCATTGGTTTTTTGACTAGCTTTGTTTCATGACTTCCAGTTTCTACTGTTCCGTGTTT  
GGATTATAAATATATCTAAGTGTAGTCTTTTTATCCACTTGTCTTCCGGTCCAAATCTTTTGTCTTTCTGC  
AAGACTCTGTTCTTTCTTTTTGGGTGACTCTGATTGCTGATATATTATATTTATTTTACTTGATGTG  
ATAGTATAGTATTTGAAATCGACAAACAGAAATTTGTAGTGTAGTTTATTTATATTAGGAGGTATTAGCGTT  
ATGGATGATGAATTAATAAATCAAAATGACTCATTTACTGTGGACTGCAAAGAACCGCATGAATTAGCAAAT  
TTTATGGGGCGTTGCTCAAGTGGGAAATAATGATTATCGATGAAGATTACGTATGTGTATACGCTCCAGGAAC  
CAATCAGGGAACATATCCTTGTATATTGTTTCAACGGAATCCGGAGTACAACCGCCTTTGCGGCCGCT

**Lb. brevis** F2a – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 1552 bp (Multiplex-  
PCR-Produkt: 1361 bp, qPCR-Produkt: 104 bp)

AGCGGCCGCTTCCAAGAAACCTTAGATAAGCTGGGCTTAGACTATTTGGATCTGTACCTCATTCACTGGCCAG  
CCCCAGGTTATTTAGACAGCTGGCGGGCGATGGAAGACCTGTATAAGGCCGGGAAGATCAAGAATATCGGTGT  
GTCGAACTTTAACCAGACGCAGATGGCTGATATCTTGGCTCACGGCACGGTCAAGCCGGTTGTGATCAAAT  
GAAACGCATCCTTATTTCCAACAAAACGACATGCACGCTTACTTGGAAAGCCAAGGGATTTTGCATGAAGCGT  
GGAGTCCACTAGGCGGGGAAACAACAACGATTCACCGATTCCGTGATTAATGAATTGGCCGCTGCTCATGA  
CGTGAGTGGCGCCAGATTATCTTACGGTGGCATGTTCAACGTGAAGAAGTTGTGATTCTTAAGTCAATTCAC  
GAAGCTCGTATCCAACAAAATCGAGACATTTTTGCTTTTGGCCTGGATGAAGATGAAATGAAGGGGATTAGTG  
ACCTCGATACGGCAAACGAGTGGGTCCAGACCCAGACGATACCGCCTGGTTAAAGAAGTACACAGACCTATTC  
TGCTCGCAAGTAAGTTACCGAAAGGGTGAATCCCTTGAGCCTTGGCTTTTGGCTCTAATTGCTCAGTTAGGG  
CATTTAGAACTGAAAAGGGAACCTTAGCGAAGGGACTCAGAAATCCGGGATGATCTGGATCGGGGACATCCTG

ATTAGCTTTTAATTTAGGAATTAATGGGACTAGGTCTTCTTTGTGGAGACCTAGTTTTTTGGCGTAGTAGACG  
 GTCTCACGGTAAGTAAAGTTTTTGAATAGAAAGTAAAAACAACCACCGCTGCGGTAAAGTACCAGAAGATGG  
 TCCACTCTAGACCAATCTTAGCAGGGTCCAAAAAGTTCAGCCAGATGGCAGCGATGACAAAAAGGACATAGAG  
 TACCACTGAAACGCCAGCCAGCGCTGTTTTTGTGTCAAATAACGGCCTCATCTCCATAATAGTATTGTATCC  
 AGTGTACGGGTAAACGGGTGAGAATCAAGCGATTTTATAAAATCATTGCCGATCATTTTCGTTATTGCTTAA  
 CAGACGTGTATAATAACACAGTATTGTTACCAATCGCTTTAAGAAATGAGAGGTAGACGACGTGAGTTTAAAGT  
 TTCGAGACCATCCAACCACTGATTACCAGCAGGTAGACCAATGGTGCAAGCAGCCTTTGAACCCGTAGAAG  
 ATAGTCAAGGTAATGAGGTTGACCTGATTCATCAATTACGTAAGACTTATGATTATCAAGCTAGTTTGGAAAGT  
 TGTGGCCAAGCCGTCCATTGACACAATAGTGGGCCATGGGCTATTAAGTCCGGTGATGATTCGTGGGAATCGG  
 CATAACAAGCAATTGTGGCGCTGGCCCATAGCGGTGGCCCTGATTGGCAAGGCCAAGGTGTGGGGAGTG  
 AATTGCTCAGTGAATTAGAGACGGGGCTAGAATGGCCGGCTTTGCCGCGATGAGCGTCGTGGGTGATATGAC  
 CTATTATGGCGCCGCT

***Lb. buchneri*** NB1 – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 1077 bp  
 (Multiplex-PCR-Produkt: 418 bp, qPCR-Produkt: 102 bp)

AGCGGCCGCCAAACGTGGGAAAATCGACTATCTTTAACCGCATTGCCGGTGATCGAATTTCAATCGTTGAAG  
 ATACCCCGGGTGTACCCGGGACCGTATTTATTCTCATGGTGAATGGCTGGCAACTAAATTTGCAATGATCGA  
 TACTGGTGGAATTCAAATCAGTGATGCACCATTTGCAACCCAGATTAAGAGTCAGGCCGAAATTTGCCATCGAC  
 GAAGCGGACGTGATTGTCTTATCGTCAGCGGTAAGGAAGGGTTACCCGAGAAGATGAACAAGTCGCCAAAA  
 TTCTTTATCGAAGTGACAAACCGGTTGTTTTAGCGGTTAAACAAGTCGATAATCCTGAGAGCCGTGAAGATAT  
 CTATGAGTTTTATTACTGGGATTTGGCGATCCAATGCCGATTTCCGGAGTGCATGGTCTGGGATTTGGGAGAT  
 CTAATCGACAAGGTTGTTGAAAAATCCCAAAGACCGATGAAAAGACGGATAACGATGATATTCGGTTTCAGTA  
 TTATTGGCCGCCCAATGTGGGCAAGTCGTCACTGGTTAACGCCATTTTGGGTGAAGACCGGGTCATTGTTTC  
 AGATATTGCCGGAACCACTCGAGACGCAATCGATACCCGCTTTGAGCGGATGGTATCAAGTTTCAGGATGGTC  
 GATACGGCTGGAGCCAGAAAACGCGGGAAGGTTTACGAAAAACTGAACGATATAGTGTGATGCGGGCGACGA  
 AAGCCATTGACCAAAGTGATGTGATCTTATTTCGTCATGAACGCCGAAGAAGGCATTTCGTGAGCAGGATAAGAA  
 AGTTGCCGGATACGCTCATGAAGCTGGAAAAGCAATCATCACGGTGGTGAATAAGTGGGATACGCTCAAAAAAG  
 ACCAACACACGCAACAGGACTTTGAAAACCTGATCAGAAATGAATTCAGTACATGTCATATTCGCCATCA  
 TTTTCGTTTCAGCCGTTACTAAGCAAAGAATCGAAAAACTACCGGCATTAATCAAAACAGGTTTATGACAATCA  
 TGAGAAACGGTGTTCATCTCAGCAC

***Lb. mucosae*** NH2b – PCR-Produkt mit dem nSAPD-Primer G-Not-G, Größe: 1281 bp  
 (Multiplex-PCR-Produkt: 620 bp, qPCR-Produkt: 143)

AGCGGCCCGGGTGCATAAGATTGCCAAGGTTGGGGCCGTGGGCGGAACCTTCGTCATGATCTTAAAGCGGTG  
 TCTTTATTGTCGCCAGTCTAATCATTGGATCTGCAATCATGGCGGATGATGCAGCCGATTCATGGCCTGCAC  
 CCGTTTGTGCTTCGCCTAATCCACAGTTCCAATCTGGCGTCGCCGTCGTTTCGTTTCATGGTCTATGCCGCTT  
 TGCCTATGGTGGCATGGAGTCAATGGGGGCGTCATGGATTTCGTTGAAAAACCAGAAAAGACGTTCCCAAGA  
 GCATTGATGATCGGCATGATCGTAATTACGTTCTGTATGCGTTGATGATCTTATGTGGGGGATGTCAACCA  
 ACTGGGAGCGGTTTTAGGTAAAGAAAACGTCAACCTTGGCAACATCTCCTACGCCCTGATGAACAACGTGG  
 GCTGGTCTTGGGACGTTCTTTGGGGCTGTGCGATGCCACGGCGGTGCTGCTGGGCAATCTCCTCACGGGTTTA  
 CCGGTCTGGCAATGTGGCTGGCTTACATTGGCTCATTCTTCGTGATGGTCTATTCACCGATCAAGTCTTTATC  
 ATGGGCTCTGATCCAAGACTTTGGCCAGCTAAGATGACTAAGCTCAACAAGCATGATATGCCAGCTTTTGCCA  
 TGTGGATGCAGGCAATCGTCATCTGCGTGATCATCTTGGCGTCAGCTTTGGTGGCGCGGCCGCTCAACAGTTC  
 TAACTGATTTTGACGGATATGTCCAACGTCCGCAACCTCGGCACCATACCTGTTTTTGTAGTGGGGCCTTCCATT  
 CTTAAGAAGATCAAGGACCTGGATCGGCCATTTGTGTTCTTTAAGACGACGCGGGCGGCAACTGGGTTTCA  
 GCGATCGTTTGGCTGGTTCGTAGCGATCGGCATTATCTTTACCTGTCTGCAGCCAATCTGGGATCATGACTATCA  
 AACCGCATTTTGGACGGTATTTGGACCAATCTTCTTTGGCTGGTTGCTGGGCTTTTATGCAAAATGCACAAA  
 AGCATGTTTCAAGGCAGAAAAACAGCAAACTAAGAAAAACAGCAAAGGACTCCTCGTATCAAACGAGCGAG  
 TCCTTTTACTTTGCGGCGGCTGGGTTAAGATGGTAATGAATCATAATTGAGGGGATATTTGTTGATGGGAAA  
 AATCAAAGCCGATCTGGCCGAATATACTGGTCATTGGCTGAGCTATGGCGGCTTTTATTGATAATCGTGCTG  
 ATTGATCAGGCAATCGTCGGGCCGCGGCT

**Lb. parafarraginis** GF8b – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer A-Not, Größe: 685 bp (Multiplex-PCR-Produkt: 545 bp, qPCR-Produkt: 118 bp; Primer-Überlappung in dunkelgrau dargestellt)

AGCGGCCGCACCAAGTGGTACGTGTGGACATCATTTCGCGGTGAACCGCCGAACCCGTTTCAAGTCGTCAGCGGCCTTAATTGCCGCTCGCCGGTGACCCGTTGTTCTGGACAACACTACAACCGGCCGCCAGCCGTAAGTGGTTGGCAACACGGCGACCCGGCGAGTTCGGGAAAGCCGTTGTAAGCGGTGCTCCCTCGTTGGTTCGTTCCGTTCCGTAATTCCGCCAGAAAAATTCCTGGTCAGTTTGTAAATACCCGTTGCCGCGTCTTCCAGTCGAATATGAATGGCGCCGATAACGAGACGTTCTCGGGCTTCTTTGCATGTTGCTGATGACGCGTCTTGGATTTGACGCGAGGTTCTTCTTTGCATCCACTGGTTTATCTGCCATGGTTAACATTCTCCGTATCGATGATTATTTCGTAACCTAAACTTTGAATTGGATCTAGCTTAGCGGCGTCCCTGCCGGGCAAGCGCTGCTAACAAATGAAATCACAATTGAGATGATTAGTCCAACAGCACGTTGCCAGTCGTGATCTGCATAATTTGATAATGAATCCCCGACTGAGCAATGTGGTTGGCGATTAACGCAGCCCCCGGACAACCCAATTGCCAGGATTGACGAGAACAGCCCGATGAAGAAGGCTTCCGAGAAGAACAGATTACGAATGCGGCCGCT

**Lb. rapi** GeFf – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer A-Not, Größe: 1294 bp (Multiplex-PCR-Produkt: 1145 bp, qPCR-Produkt: 100 bp)

AGCGGCCGCACGATTGACGGCAAGGACATGATTGGGCGCGCACAACTGGGCGGATTGTGACCATTATCGGTTACACCAGGAAAAAGGCAATGCTGAAAAGTTAGCTCAAACGCCAATGCATTAGTTCATGAAAGTACTTTTGGCAAGGTGAGAATAAGCTTGCCAAAAGCTATTATCATTCCACCAATACCCAGGCCGCCAAATTGCTAAGCAGGCGAATGCTAAGATGCTATTATTGAATCACATCTCAGCCCGTTATACTGGAAAGATGGCCCATGAACTAGAGAAACAAGCCCAAACGATCTTCCCAAATACCAAAGTTGTCAAAGATTTTGTGTTGGTGGATATTCCGTTTATCAAAGATTAACAATGTGAATGGGGGAGTTGCAATGAAAAACAATCACAACAATTGTGAGCATCATTTTAATTA TCATAATTGCTCTTTTTGCGTTAATTAATTTTGAATCGGTTGATGTGAACCTTGGTTTTGCATCCGTTCCGGTACCGTTAGTGTATTGATTTTAATTTTCAAGTTTGTAGTGGGCGCGTTAATTATCTTCTTGTGCTTCGATTTTGAATGTCCGTAAGAATCGAGCTTATCGAGAATTGGAGAGCCAGAGCCAGCAAAAACAAGACGAGCTGACAGATCAAATCAAAGCGCTGCAAGCGAACTTGAAGCCTTAGAAACGCGGCTAAAGAATTCCTATGTTAAACAGGAACTTGGGGCCAAAGATCAGCAAATTACAAACTTAGAAGATGAAATTCGAAGTTGTGAGACAAATTGTCACAAAA GTAAGGTAGCGTGTTTGAATGATTGAATCGAAGTATAATTGGCAAATGAATCAGATAGACGATCCCCAAGCTGTTGGAAACTAGCAAAGGAAGCAAATGTTGATGAGACAATTGCCAAATTACTATTACAGCGTGGGATTGATCCCGGATCAGGCAACCAATTTTTTGAACCATCGACTGCCAGTTTTACGATCCTTATTTGATGCATGATATGAAAAAGGGGTTGCCAGAATTCAGCAGGCCGTTGAGAACGGAGAACAGATTACCGTCTACGGTATTACGATGCCGATGAAATTACCAGTACCAGATTATGTATGAAGTGTAACTGATTTGGGCGCAACCGTTGATTATTATATCCCAACCGTTTTTTCAGAAAGGCTATGGGCCAAACGTTGAAGCTTATCGACAGATATTGCCAAGGGAACCAGTTAATTATCACTGTTGATAATGGGGTGGCTGGCAATGATGCGATTGCGGCCGCT

**Lb. rossiae** F4 – PCR-Produkt mit dem nSAPD-Primer G-Not-G, Größe: 530 bp (Multiplex-/qPCR-Produkt: 221 bp)

AGCGGCCGCGGTGCTTGGAGATTCGCTTAACTTTGAAATCGGTGAACACTTCGGGCTGCGCCTCGCGCACAGGCCAAGCTCAGCCGCTTCATCAAACCCGCCTACCTCGAACGTTGCGAGCGCTTCTTCGACAAGCATGGGAAAGCCGCGATTTTCTTGGCCGCTTCATGCCGATCATCCGCACCTTCATCCCCTTACCCTGCGGTGAGCCAGATGCCCTACCAGACTTTGCCGCTACAACGTAATTGGCGGGATCACCTGGATGGCGGTAGCCCTCGGCGCCGTTACCTGTTCCGGCAACATTGCTGTCTGTTAAACCCATTTGAACTGATCATGCTGGCCATCGTTGTCATTTCTTAGCCCTGCCGCTTCATGGCGCTGCGCCATCGCGGAGGTGCCGACGATGCCGACTAAAACCAAACATTGCTAGGCGGCTGAGCCTGATTGTCTTTGCCGCTTAGCCCTCGCGCTTATCAGCATGCCGCTGGCTTGGCAATTGGATGCCGCGCCGCT

**P. acidilactici** G4 – PCR-Produkt mit dem nSAPD-Primer G-Not-T, Größe: 914 bp (Multiplex-PCR-Produkt: 776 bp, qPCR-Produkt: 75 bp)

AGCGGCCGCGTATGATGGACAGACTCCCTGGGACCGGACGGCATTGCAACGAGCTAAGAAGAAAGGTCGACCGTTTATACTTGGTGATTGCCATAATGACCAGTTGATGGGCTTTATTGGGGCTTCATTTAACGACCGGGCGAAGAATGCCACATTACCAACGTGGCCATTTCCCGAATACCAAATCAAGGGATTGGTTGTTTTAATTGAAGCAATTGTGCGGAAGGCCAGTTTTATTGAGTATAAGAAGTTACCTTAGAGGTGCGGAAGAGTAATATTAAT

GCCAGGCGTTATATTTGAAGATTGGTTTTGAAAACGTGCGTTTTGAAAAGGGCTATTACTTTGGTGACCATG  
 AGGACGCCATCGATATGCAACTAGATTTATCGAAATGGCGGGGAGGATATCGTGGAACAAGATAGTTAATAT  
 TAGCAATCGAATCCAGCTGCGATGAAACTAGCGTAGCGTTATTAATAAATGGTGACACTATTTTATCAAACAT  
 CATTGCCACCCAAATTGACAGTCACCAACGGTTTTGGCGGGTGGTTCCAGAAGTGGCTAGCAGACACCACATT  
 GAACAAATCACCTGTGCATTGACCAAGCAATGAAACAAGCACAAGTCCAGCCAACGGACCTAAGTGCAGTGG  
 CGGTTACTTACGGACCTGGACTAGTGGGTGCCCTCTTAGTAGGGTTTTCTGCGGCGAAGGCCTTTGCGTTTGCA  
 AATCATTTGCCATTGATTCCGGTTAACCATATGATGGGACATATCTACGCAGCTCGGTTTCGTCAAACCAATTA  
 AATTCCTGCTTTAGCGTTGCTAGTTTCCGGAGGACATACCGAACTAGTATATATGGCAGCGGAAAATGAATT  
 TAAGATTATTGGCGAAACACGTGACGACGCGGCGCT

***P. parvulus*** NF10 – PCR-Produkt mit dem SAPD-Primer G-Not-T, Größe: 394 bp  
 (Multiplex/QRT-PCR-Produkt: 331 bp)

AGCGGCCGCGTCGCATGAATCACTTTTCGCTCAAATGCGGGCGTGGGATCCAAGAAAAGTGGTTCACCAGTTGC  
 CACAACCTCACGAGCTGATTTTCGGCCAAGTGTGCAACGTTTCTGTCCGTCGTTACCGGTAATTTTCAACAT  
 TCAATTTTACATTGGCATGTGAAATGCCGCGATGTAGCAAAAATACTTGAGCTAAAGTTTGTAGTGCCTAAT  
 TGTTTCGACCATGCTTCCCAATTAGCATGCCCTCTGTCTAGTTCTGAGCTCTATTGAAACGTACAGATGATGAA  
 ATTTACTTGTGAAGTAGCTTCAATTCCAAAGTGGGTGACAATCTTTGCCAAAATATTCCTGCATTTGAGAAAAC  
 AATTTCTTCAATCAAACGCGGCCGCT

***Ps. alactolyticus***-verwandt NF3 – PCR-Produkt mit Eubak3 und Eubak5, Größe: 1409 bp  
 (qPCR-Produkt: 100 bp)

TTACTGGCCCCACCTTCGGCAGCTGACTCCTTACGGTTGTCTCACTGACTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGT  
 GTGACGGGGCGTGTGTACAAGACCCGGGAACGCATTACCCGCGGATTCTGATCCGCGATTACTAGCAACTCCA  
 TCTTCATGCAGGCGGGTTCAGCCTGCAATCCGAAGTGGGATTTGTTTTATGAGATTCGCTCCGCCCTCGCGGTT  
 TCGCTTCCCTTTGTTCAAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGCT  
 CCCACCTTCTCCGTATTGTCTACGGCAGTCTGCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACACAGGG  
 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCTC  
 TGTTCGGAAGGAAAAATTCTATCTCTAGAACGGTCAGAGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC  
 TTCGAATTAACCACATGCTCCGTGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTCAACCTTTCGCGTCTG  
 ACTCCCAGGCGGAATACTTAATGTGTTAACTTCGGCACTGGCTTTCGCGCAACACCTAGTATTCATCGTTTACG  
 GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCTGTCCAGCA  
 AGCCGCTTCGCGCGGGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCCGCTACACTAGGAATTCACCTTGCCTCT  
 CCAGTACTCAAGTCTTACAGTTCAAATGCACGTACCCGTTGAGCCGGTACCTTTCACATCTGACTTATAAAA  
 CCGCTACGCGCCCTTACGCCAGTATTCCGGACAACGCTCGTCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC  
 GTAGTTAGCCGGGACTTCTCATTTGGGTACCGTCACTTCTTCTTCCCAATAACAGAGCTTTACGACCCGAAAG  
 CCTTCTTCGCTACGCGGTATTGCTGCGTCAGGGTTGCCCCATTGCGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTA  
 GGAGTTTGGACCGTGTCTCAGTTCCAATGTGGCCGTTTCGCCCTCTCAGACCGGCTACCTATCGTCCGCTTGGTA  
 GGCCTTACCCTGCCAACTAGCTAATAGGACGCGGGCCATCTCACGGCACCGGAGTTTTGATTGCACGACCAT  
 GCGGCCCTGCAATGTCATAAGGCTTACTCCCGTTTTCCCGAGGCTATTCCTTTCCGTGAGGTAGGTTGCCAC  
 GCGTACTACCCGTTCCGCACTTTCCGATTTCTTAATCACCCGAAGGTTCTTAAAAAATTTCTCGTTCCACT  
 GCA

## 7.2 Spezifitätsüberprüfung der entwickelten Primer

**Tab. 7. 1: Spezifitätsüberprüfung der entwickelten Multiplex-Primer mit DNA ausgewählter Mikroorganismen.** 1 = *P. acidilactici* (G4), 2 = *P. parvulus* (NF10), 3 = *S. equinus*-Gr. (N91), 4= *C. aminovalericum* (LiF1), 5 = *C. botulinum*-Gr. (NF2b), 6 = *B. licheniformis* (LiF4), 7 = *B. cereus*-Gr. (F2d), 8 = *B. coagulans* (N83), 9 = *B. pumilus* (Gln1.7), 10 = *B. thermoamylovorans* (Gl2a), 11 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 12 = *B. aerophilus*-Gr. (NH1.9), 13 = *Lb. brevis* (F2a), 14 = *Lb. buchneri* (NB1), 15 = *Lb. kefir* (SNF22), 16= *Lb. mucosae* (NH2b), 17 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 18 = *Lb. rapi* (GeFf), 19 = *Lb. rossiae* (F4), 20 = *Ps. alactolyticus* verwandt (NF3), 21 = entsprechender Typstamm (vgl. Tab. 2. 1). In Klammern sind die Stammbezeichnungen angegeben, da einige Primerpaare isolatspezifisch sind.

Multiplex-Primer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21 <sup>2</sup>
SCAR-LBR-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-LBU-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-PAC-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-LPA2-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-LBU2-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-PPA-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-CAM4-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SCAR-LMU-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SCAR-BPU-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-BCO-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCAR-BTH-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Überprüfung erfolgt, - = Überprüfung nicht erfolgt

<sup>2</sup> Entsprechende Typstämme (vgl. Tab. 2. 1).

**Tab. 7. 2: Spezifitätsüberprüfung der entwickelten qPCR-Primer mit DNA ausgewählter Mikroorganismen.** 1 = *P. acidilactici* (G4), 2 = *P. parvulus* (NF10), 3 = *S. equinus*-Gr. (N91), 4 = *C. aminovalericum* (LiF1), 5 = *C. botulinum*-Gr. (NF2b), 6 = *B. licheniformis* (LiF4), 7 = *B. cereus*-Gr. (F2d), 8 = *B. coagulans* (N83), 9 = *B. pumilus* (G1N1.7), 10 = *B. thermoamylovorans* (G12a), 11 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 12 = *B. aerophilus*-Gr. (NH1.9), 13 = *Lb. brevis* (F2a), 14 = *Lb. buchneri* (NB1), 15 = *Lb. kefir*i (SNF22), 16 = *Lb. mucosae* (NH2b), 17 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 18 = *Lb. rapi* (GeFf), 19 = *Lb. rossiae* (F4), 20 = *Ps. alactolyticus* verwandt (NF3), 21 = entsprechender Typstamm (vgl. Tab. 2. 1). In Klammern sind die Stammbezeichnungen angegeben, da einige Primerpaare isolatspezifisch sind.

qPCR-Primer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21 <sup>2</sup>
SCARq-BLI-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-BCO-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-BPU-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-BSU-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SCARq-BTH2-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SCARq-CAM5-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16q-NF3-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-LBR-F/R <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-LBU2-F/R <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-LMU4-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SCARq-LPA2-F/R <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-LRA-F/R <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SCARq-LRO4-F/R	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SCARq-PAC2-F/R <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

+ = Überprüfung erfolgt, - = Überprüfung nicht erfolgt

<sup>1</sup> Diese Primer wurden zusätzlich gegen folgende Mikroorganismen getestet und zeigten keine Amplifikatbildung: *Lysinibacillus* sp. (GeF4b), *Methanobacterium formicum* DSM-1535, *Desulfomaculum ruminis* (DSM-2154), *Tepidanaerobacter acetatoxidans* (DSM-21804), *Methanoculleus bourgensis* (DSM-3045), *Butyrivibacterium methylotrophicum* (DSM-3468), *Streptococcus bovis* (DSM-20480), *Defluviitoga tunisiensis* (DSM-29926), *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (DSM-21804), *Methanosarcina mazei* (DSM-3647).

<sup>2</sup> Entsprechende Typstämme (vgl. Tab. 2. 1).

### 7.3 Prozentuale Verteilung der gebildeten D- und L-Milchsäure durch die Isolate

Tab. 7. 3: Werte der gemessenen D- und L-Milchsäureanteile.

Isolate	D-Milchsäure [%]	L-Milchsäure [%]	D-Milchsäure [g/l]	L-Milchsäure [g/l]
<i>B. cereus</i> -Gr. (F2d)	0	100	0	1,52
<i>B. coagulans</i> (N83)	0	100	0	2,65
<i>B. licheniformis</i> (LiF4)	0	100	0	2,29
<i>Lb. brevis</i> (F2a)	51	49	3,2	3,13
<i>Lb. buchneri</i> (NB1)	49	51	4,36	4,49
<i>Lb. kefir</i> (SNF22)	62	38	4,87	2,94
<i>Lb. mucosae</i> (NH2b)	42	58	0,51	0,7
<i>Lb. parafarraginis</i> (GF8b)	52	48	3,84	3,55
<i>Lb. rari</i> (GeFf)	20	80	1,63	6,52
<i>Lb. rossiae</i> (F4)	35	65	0,67	1,23
<i>P. acidilactici</i> (G4)	49	51	5,1	5,27
<i>P. parvulus</i> (NF10)	43	57	0,38	0,5
<i>C. aminovalericum</i> (LiF1)	100	0	0,3	0
<i>C. botulinum</i> -Gr. (NF2b)	100	0	0,18	0

### 7.4 MPN-Werte der Lebendkeimzahlbestimmung

Tab. 7. 4: MPN-Werte der Maissilage- und Fermenterproben nach McCrady (1915).

Jahr	Probe	BGA Friedrich	BGA Gebel	BGA Glahn	BGA Lieser	BGA Neumann
2013	MS <sup>1</sup>	8,00E+05	1,50E+07	1,50E+06	8,00E+05	≥ 1,20E+06
	HF <sup>1</sup>	-	-	-	-	9,30E+05
	F <sup>1</sup>	1,00E+04	2,40E+06	4,30E+04	4,60E+06	1,50E+05
	NF <sup>1</sup>	-	4,30E+05	4,20E+04	2,40E+06	-
2014	MS <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>
	HF <sup>1</sup>	-	-	-	-	1,50E+06
	F <sup>1</sup>	1,50E+06	n.b. <sup>1</sup>	4,30E+06	n.b. <sup>1</sup>	2,40E+07
	NF <sup>1</sup>	-	n.b. <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>	n.b. <sup>1</sup>	-
2015	MS <sup>1</sup>	7,70E+04	3,10E+07	3,10E+06	1,40E+07	7,70E+05
	F <sup>1</sup>	9,30E+04	4,30E+06	4,30E+06	9,20E+04	1,50E+06
	NF <sup>1</sup>	-	4,30E+06	4,20E+04	2,30E+05	-

<sup>1</sup> n.b. = nicht bestimmt, MS = Maissilage, HF = Hydrolysefermenter, F = Fermenter (vgl. Abschnitt 1.5.2)

## 7.5 Messdaten zur Quantifizierung der Isolate mittels qPCR

**Tab. 7. 5: Regressionsanalytische Daten der qPCR-Messungen.** Aufgeführt sind die Geradengleichungen des Standards, die sich aus den  $C_T$ -Werten der PCR-Reaktionen mit den dekadischen Verdünnungsstufen des Standards ergaben. Aus den Geradengleichungen leiteten sich Bestimmtheitsmaß und Effizienz der durchgeführten Messungen ab.

Primerpaar	Gleichung	Regressionskoeffizient	Effizienz
BAC338F/805R	$y = -3,781x + 49,67$	0,982	0,84
F/R_allact_IS	$y = -3,393x + 42,41$	0,998	0,97
F/R-gyrB SIC	$y = -3,133x + 39,25$	0,998	1,09
rpo_BF1/rpo_BR1	$y = -3,292x + 40,25$	0,998	1,01
SCAR-LRO4-F/R	$y = -3,245x + 39,68$	0,999	1,03
SCAR-PPA-F/R	$y = -3,557x + 43,92$	0,998	0,91
SCARq-BCO-F/R	$y = -3,330x + 40,60$	0,996	1,00
SCARq-BLI-F/R	$y = -3,563x + 43,62$	0,996	0,91
SCARq-BPU-F/R	$y = -3,525x + 43,21$	0,991	0,92
SCARq-BSU-F/R	$y = -3,217x + 39,84$	0,999	1,05
SCARq-BTH2-F/R	$y = -3,223x + 39,86$	0,998	1,04
SCARq-CAM5-F/R	$y = -3,223x + 39,82$	0,998	1,04
SCARq-LBR-F/R	$y = -3,510x + 43,09$	0,997	0,93
SCARq-LBU2-F/R	$y = -3,197x + 43,33$	0,998	0,93
SCARq-LMU4-F/R	$y = -3,214x + 40,15$	0,999	1,05
SCARq-LPA2-F/R	$y = -3,442x + 42,41$	0,996	0,95
SCARq-LRA-F/R	$y = -3,521x + 43,23$	0,999	0,92
SCARq-PAC-F/R	$y = -3,482x + 43,00$	0,999	0,94
16q-NF3-F/R	$y = -3,660x + 45,07$	0,991	0,88

**Tab. 7. 6: Minimale und Maximale Werte der Kopien pro g Fermenterprobe der BGA Friedrich, Gebel und Glahn im Jahr 2013.** 1 = Bakterien, 2 = *Lactobacillus/Pediococcus*, 3 = *Lb. brevis* (F2a), 4 = *Lb. buchneri* (NB1), 5 = *Lb. mucosae* (NH2b), 6 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 7 = *Lb. rari* (GeFf), 8 = *Lb. rossiae* (F4), 9 = *P. acidilactici* (G4), 10 = *P. parvulus* (NF10), 11 = *S. equinus*-Gr. (N91), 12 = *B. aerophilus*-Gr. (NH1.9), 13 = *B. coagulans* (N83), 14 = *B. licheniformis* (LiF4), 15 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 16 = *B. thermoamylovorans* (Gl2a), 17 = *C. aminovalericum* (LiF1), 18 = *Ps. alactolyticus*-verwandt (NF3), F = Hauptfermenter, NF = Nachfermenter, HF = Hydrolysefermenter.

Organismus	BGA Friedrich F		BGA Gebel F		BGA Gebel NF		BGA Glahn F		BGA Glahn NF	
	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal
1	1,74E+08	2,69E+08	4,81E+08	7,36E+08	1,29E+08	1,23E+08	7,51E+08	8,89E+08	2,07E+08	1,62E+08
2	1,41E+05	3,04E+05	6,01E+05	1,29E+06	5,94E+05	6,70E+05	6,17E+05	5,52E+05	4,17E+05	2,98E+05
3	2,24E+04	3,27E+04	3,95E+03	6,50E+03	3,74E+04	3,43E+04	9,89E+03	1,21E+04	2,65E+04	3,01E+04
4	3,58E+04	5,45E+04	3,86E+04	2,24E+04	1,36E+04	1,05E+04	3,41E+04	2,09E+04	4,43E+04	3,73E+04
5	1,68E+02	2,70E+02	1,64E+02	1,55E+02	8,46E+02	1,13E+03	9,56E+01	1,05E+02	3,47E+02	6,14E+02
6	1,85E+05	4,68E+05	1,21E+04	1,45E+04	3,26E+04	4,18E+04	4,00E+03	2,96E+03	4,26E+04	2,32E+05
7	2,60E+04	2,41E+04	1,75E+04	2,92E+04	7,99E+04	3,26E+05	5,61E+04	4,79E+04	1,89E+04	3,11E+04
8	4,61E+01	6,51E+01	1,94E+02	3,78E+02	2,63E+02	1,70E+02	4,14E+02	2,39E+02	5,95E+02	2,90E+02
9	1,50E+05	1,48E+05	3,06E+04	2,95E+04	9,56E+04	1,14E+05	2,95E+04	1,85E+04	2,60E+04	2,77E+04
10	3,37E+04	2,06E+04	1,66E+04	1,72E+04	1,52E+05	7,33E+05	5,00E+03	9,19E+03	2,37E+04	2,48E+04
11	9,65E+03	1,01E+04	3,96E+04	5,03E+04	5,31E+04	3,13E+04	1,18E+05	1,13E+05	8,92E+04	9,36E+04
12	2,07E+03	3,65E+03	1,86E+04	7,93E+04	7,14E+03	1,15E+04	2,96E+03	4,66E+03	4,49E+03	6,41E+03
13	2,89E+04	2,24E+04	2,88E+04	7,69E+04	5,95E+04	9,14E+04	4,63E+03	6,92E+03	1,57E+04	4,77E+04
14	3,16E+04	4,06E+04	3,17E+04	8,60E+04	1,53E+04	3,47E+04	3,56E+04	7,25E+04	2,43E+04	5,65E+04
15	8,26E+01	7,05E+01	1,20E+02	1,64E+02	9,17E+01	1,79E+02	2,27E+00	2,38E+01	2,04E+01	3,87E+01
16	1,22E+03	1,83E+03	6,76E+03	3,74E+03	2,21E+03	2,10E+03	9,86E+03	9,09E+03	5,59E+02	4,68E+02
17	4,22E+02	7,26E+02	2,51E+02	3,50E+02	1,09E+02	5,47E+01	7,69E+01	1,17E+02	2,29E+01	3,02E+01
18	2,13E+03	2,84E+03	6,71E+03	9,91E+03	1,80E+03	4,76E+03	2,70E+03	2,33E+03	1,70E+03	2,55E+03

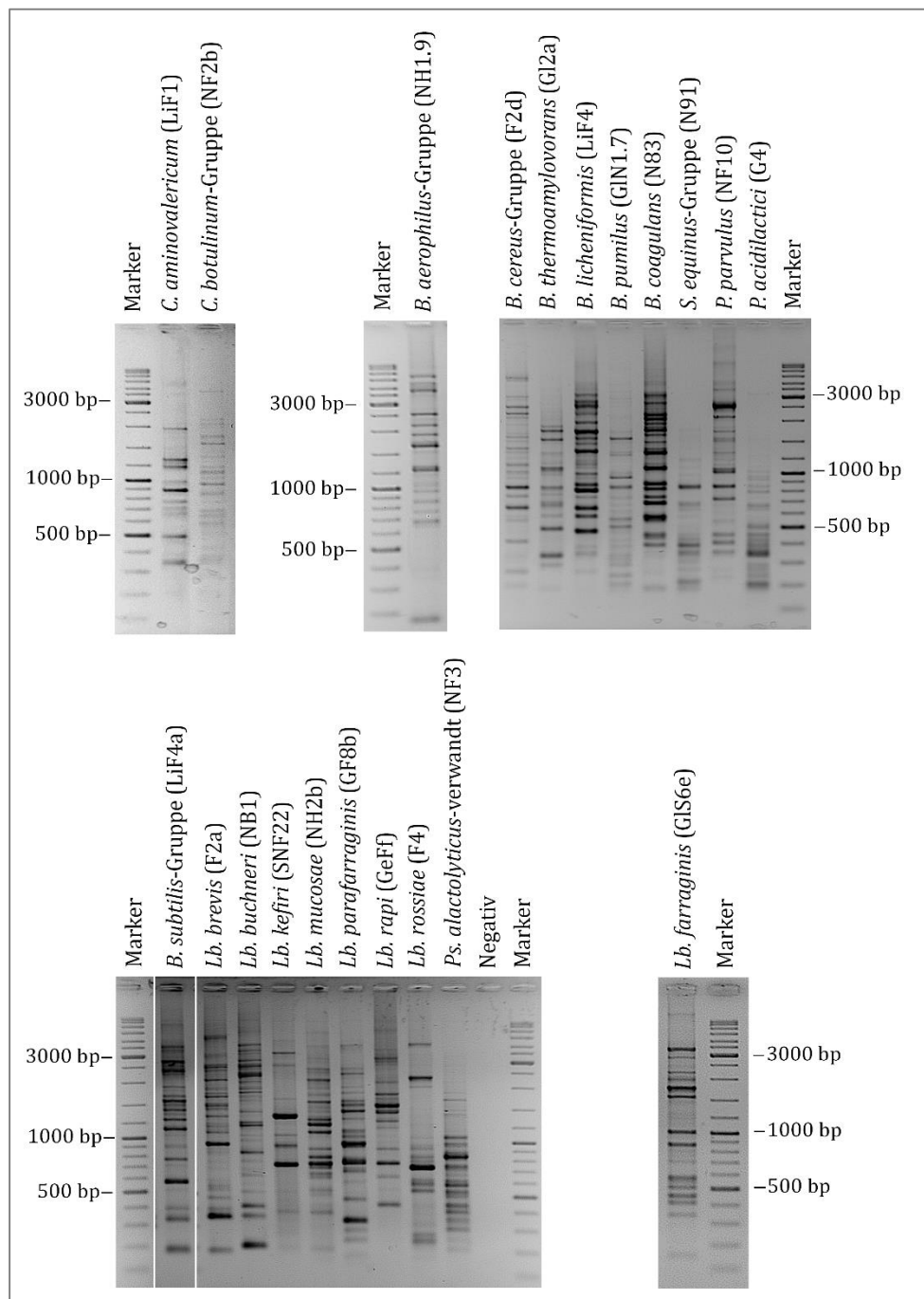
**Tab. 7. 7: Minimale und Maximale Werte der Kopien pro g Fermenterprobe der BGA Lieser und Neumann im Jahr 2013.** 1 = Bakterien, 2 = *Lactobacillus/Pediococcus*, 3 = *Lb. brevis* (F2a), 4 = *Lb. buchneri* (NB1), 5 = *Lb. mucosae* (NH2b), 6 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 7 = *Lb. rapi* (GeFf), 8 = *Lb. rossiae* (F4), 9 = *P. acidilactici* (G4), 10 = *P. parvulus* (NF10), 11 = *S. equinus*-Gr. (N91), 12 = *B. aerophilus*-Gr. (NH1.9), 13 = *B. coagulans* (N83), 14 = *B. licheniformis* (LiF4), 15 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 16 = *B. thermoamylovorans* (Gl2a), 17 = *C. aminovalericum* (LiF1), 18 = *Ps. alactolyticus*-verwandt (NF3), F = Hauptfermenter, NF = Nachfermenter, HF = Hydrolysefermenter.

Organismus	BGA Lieser F		BGA Lieser NF		BGA Neumann HF		BGA Neumann F	
	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal
1	1,03E+08	1,12E+08	1,63E+08	3,33E+08	2,07E+08	1,77E+08	9,54E+07	1,36E+08
2	5,35E+05	4,46E+05	3,81E+05	4,67E+05	3,80E+05	6,63E+05	4,59E+05	6,03E+05
3	1,02E+04	1,69E+04	2,58E+04	1,44E+04	4,07E+03	6,32E+03	1,20E+04	1,60E+04
4	1,33E+04	6,48E+03	5,35E+03	9,46E+03	1,74E+04	2,37E+04	3,99E+04	9,34E+04
5	6,65E+02	7,43E+02	9,68E+02	8,13E+02	8,44E+02	7,84E+02	9,74E+02	4,15E+01
6	1,23E+04	2,98E+04	1,69E+04	1,34E+04	3,63E+04	3,19E+04	3,78E+04	3,17E+04
7	1,91E+04	4,80E+04	2,67E+04	7,37E+04	4,47E+04	6,89E+04	1,17E+04	2,45E+04
8	6,85E+01	1,03E+02	7,70E+00	2,04E+01	7,04E+02	7,94E+02	2,83E+02	1,49E+02
9	1,26E+04	3,10E+04	4,75E+03	7,12E+03	5,46E+04	5,83E+04	4,29E+04	2,83E+04
10	7,49E+03	7,36E+03	1,63E+04	2,97E+04	3,62E+04	3,60E+04	1,36E+04	2,41E+04
11	4,08E+03	2,12E+03	2,02E+03	3,44E+03	1,23E+05	1,14E+05	1,12E+05	1,07E+05
12	2,01E+03	1,12E+04	3,09E+03	4,31E+03	4,04E+03	8,64E+03	7,43E+02	1,34E+03
13	6,35E+03	1,78E+04	1,40E+04	1,66E+04	4,44E+04	2,55E+05	2,56E+04	6,47E+04
14	1,66E+04	1,26E+04	1,47E+04	6,52E+04	1,73E+04	2,66E+04	1,07E+04	2,16E+04
15	3,40E+01	5,95E+01	6,49E+01	7,88E+01	4,98E+01	7,65E+01	3,11E+01	7,50E+01
16	1,31E+03	1,93E+03	2,75E+03	1,59E+03	5,04E+03	8,10E+03	1,33E+03	1,33E+03
17	1,64E+02	3,85E+02	1,19E+02	8,36E+01	9,46E+02	2,43E+03	3,80E+02	4,14E+02
18	1,79E+03	2,65E+03	1,13E+03	2,28E+03	9,68E+02	1,66E+03	1,43E+03	1,35E+03

**Tab. 7. 8: Minimale und Maximale Werte der Kopien pro g Fermenterprobe der BGA Friedrich, Glahn und Neumann im Jahr 2014.** 1 = Bakterien, 2 = *Lactobacillus/Pediococcus*, 3 = *Lb. brevis* (F2a), 4 = *Lb. buchneri* (NB1), 5 = *Lb. mucosae* (NH2b), 6 = *Lb. parafarraginis* (GF8b), 7 = *Lb. rafi* (GeFf), 8 = *Lb. rossiae* (F4), 9 = *P. acidilactici* (G4), 10 = *P. parvulus* (NF10), 11 = *S. equinus*-Gr. (N91), 12 = *B. aerophilus*-Gr. (NH1.9), 13 = *B. cereus*-Gr. (F2d) 14 = *B. coagulans* (N83), 15 = *B. licheniformis* (LiF4), 16 = *B. subtilis*-Gr. (LiF4a), 17 = *B. thermoamylovorans* (Gl2a), 18 = *C. aminovalericum* (LiF1), 19 = *Ps. alactolyticus* verwandt (NF3), F = Hauptfermenter, NF = Nachfermenter, HF = Hydrolysefermenter.

Organismus	BGA Friedrich F		BGA Glahn F		BGA Neumann HF		BGA Neumann F	
	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal	Minimal	Maximal
1	1,00E+09	1,27E+09	4,65E+08	5,71E+08	4,95E+07	4,24E+07	4,63E+08	1,12E+09
2	2,48E+05	2,94E+05	3,25E+05	4,23E+05	1,19E+05	1,64E+05	2,19E+05	1,14E+05
3	9,55E+03	6,67E+03	8,94E+03	1,40E+04	3,55E+03	2,69E+03	1,11E+04	8,24E+03
4	1,01E+04	1,59E+04	1,89E+03	4,27E+03	1,28E+04	2,15E+04	1,35E+04	1,83E+04
5	3,08E+02	2,09E+02	2,44E+01	2,72E+01	5,40E+01	9,11E+01	1,69E+02	2,01E+02
6	7,13E+03	6,19E+03	8,72E+03	3,35E+04	5,09E+03	4,76E+03	4,88E+03	7,77E+03
7	3,04E+04	2,11E+04	6,09E+04	2,35E+05	2,80E+04	9,63E+04	8,50E+03	9,59E+03
8	1,22E+02	1,15E+02	9,19E+01	7,33E+01	1,20E+02	2,02E+02	9,93E+02	6,68E+02
9	4,51E+04	8,14E+04	1,20E+04	1,58E+04	4,65E+02	9,38E+02	8,30E+02	1,03E+03
10	1,03E+04	1,68E+04	3,05E+03	2,73E+03	2,48E+03	2,92E+03	4,49E+03	5,32E+03
11	4,62E+04	5,64E+04	1,77E+04	1,03E+04	4,71E+02	2,32E+02	1,39E+04	3,92E+04
12	4,16E+03	4,05E+03	9,93E+03	2,10E+04	2,87E+03	8,22E+03	5,31E+04	3,20E+04
13	4,13E+01	1,19E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
14	6,43E+03	1,02E+04	1,96E+03	3,43E+03	1,55E+03	4,11E+03	1,46E+03	3,00E+03
15	5,21E+02	8,27E+02	6,08E+04	1,01E+05	5,64E+03	9,21E+03	1,01E+04	2,41E+04
16	1,00E+02	1,73E+02	2,13E+01	5,26E+01	2,93E+01	1,47E+01	2,27E+02	4,00E+02
17	1,00E+03	1,46E+03	1,23E+03	1,04E+03	1,52E+03	3,96E+03	3,17E+03	4,53E+03
18	1,05E+03	1,72E+03	1,38E+02	1,05E+02	1,71E+02	1,58E+02	5,44E+01	3,21E+01
19	3,49E+03	1,14E+04	2,69E+03	7,37E+03	1,37E+03	3,21E+03	2,12E+03	4,69E+03

## 7.6 Gruppierung der Isolate auf Basis der Fingerprintmuster durch die SAPD-PCR



**Abb. 7. 1: SAPD-PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung.** Auf Grundlage des artspezifischen Bandenmusters konnten 199 isolierte milchsäurebildende Bakterienstämme in 21 Gruppen unterteilt werden (Tab. 7. 9 und Tab. 7. 10). Gezeigt sind die Bandenmuster eines stellvertretenen Isolates je Gruppe und dessen Artzuweisung (vgl. Abschnitt 3.1). In Klammern ist der jeweilige Stamm angegeben.

**Tab. 7. 9: Übersicht der verschiedenen Gruppen der Bacillales- und Clostridiales-Isolate auf Basis des SAPD-Fingerprintmusters.** Eine SAPD-PCR mit dem Primer G-Not erlaubte den Vergleich und die Einordnung der spezifischen Bandenmuster der Isolate. Die Medien zur Anzucht der isolierten Stämme sind in Klammern angegeben.

Nächster Verwandter oder verwandte Gr. <sup>1</sup>	Isolierte Stämme <sup>2</sup>							
<i>B. cereus</i> -Gr.	F1a (D1)	F2d (LB)	F2h (LB)	F3a (D1)	F5 (LB)	GeNF6 (D1)		
<i>B. coagulans</i>	F4 (MRS)	F5a (LB)	F5b (MRS)	F62a (TS)	GI81k (TS)	GI91 (TS)	GI91g (TS)	GINF5a (LB)
	GINF5b (MRS)	LiF2a (LB)	LiF6a (LB)	LiF6b2 (LB)	LiNF4b (LB)	LNF5h (MRS)	LNF5w (MRS)	N83 (MD)
	NF1.6 (LB)	NF1.7 (LB)	NF2b (M58)	NF4 (MRS)	NF-5 (MRS)	NF-7 (MRS)	NF72k (TS)	
<i>B. licheniformis</i>	GeF3 (LB)	GeF6 (LB)	GeF62 (LB)	GeF62a (MRS)	GINF1.6 (LB)	GINF5 (LB)	LiF3 (D1)	LiF4 (LB)
	LiF4r (MRS)	LiF4s (LB)	LiF5r (MRS)	LiF6 (D1)	LiNF1a (LB)	LiNF5a (LB)	LiNF6 (LB)	LiS4k (MRS)
	NF-6 (LB)	NF72g (TS)	NH1.1 (LB)	SG1.3 (LB)	SG1.3II (LB)	SN5a (MRS)	SN5b1g (MRS)	
<i>B. pumilus</i>	GeFn (M58)	GIN1.2 (LB)	GIN1.3a (LB)	GIN1.3bi (LB)	GIN1.4 (LB)	GIN1.7 (D1)	GIN1.7 (LB)	GSG5 (M58)
	NH1.1b (LB)	NH1.3 (LB)						
<i>B. thermoamylovorans</i>	GI2a (M104)	GI2 (M104)	GeF1 (M104)	GeF3 (M104)				
<i>B. subtilis</i> -Gr.	GeF6a (D1)	GeNF3 (D1)	GeS7v (LB)	LiF4a (D1)	LiF4b (D1)	LiNF4 (D1)		
<i>B. aerophilus</i> -Gr.	GeF3 (LB)	NH1.9 (LB)						
<i>C. aminovalericum</i>	LiF1 (M58)							
<i>C. botulinum</i> -Gr.	NF2b (M104)							
<i>Ps. alactolyticus</i> -verwandt	NF3 (M58)							

<sup>1</sup> auf Basis der 16S rDNA-Sequenz im Vergleich mit der Datenbank EzTaxon.

<sup>2</sup> Stammbezeichnungen: F = BGA Friedrich, Ge = BGA Gebel, G = BGA Glahn, Li = BGA Lieser, N = BGA Neumann

**Tab. 7. 10: Übersicht der verschiedenen Gruppen der isolierten Milchsäurebakterien auf Basis des SAPD-Fingerprintmusters.** Eine SAPD-PCR mit dem Primer G-Not erlaubte den Vergleich und die Einordnung der spezifischen Bandenmuster der Isolate. Die Medien zur Anzucht der isolierten Stämme sind in Klammern angegeben.

Nächster Verwandter <sup>1</sup>	Isolierte Stämme <sup>2</sup>							
<i>Lb. brevis</i>	F2 (TS)	F1 (TS)	F2a (MRS)	F3 (MRS)	F5 (TS)	F5 Kn (TS)	N1a (TS)	
<i>Lb. buchneri</i>	F5 (M58)	F7pl (TS)	FA Kn (TS)	FA2 Kn (TS)	FC1 Kn (TS)	FC12 Kn (TS)	FC2 Kn (TS)	FF1pl (TS)
	FF2 Kn (TS)	FF2pl (TS)	GeF1b Kn (TS)	GeF33 Kn (TS)	GeF34 Kn (TS)	GeF36 Kn (TS)	GeF41 Kn (TS)	GeF43 Kn (TS)
	GeF45 (TS)	GeF46 Kn (TS)	GeFn (M58)	GeS7a2 (MRS)	GFH1 (TS)	GFH2 (TS)	GlD2 (TS)	GIE (TS)
	GIF Ka (TS)	GIF2 (TS)	LiF1 (TS)	LiS-7b (MRS)	NB1 (TS)	NB2 (TS)	NC Kn (TS)	ND1 Kn (TS)
	ND1b (TS)	ND2 (TS)	NF Kn (TS)	NF31a Kn (TS)	NF4 Kn (TS)	NF4b (MRS)	NFA Kn (TS)	NFD1 Kn (TS)
	NFF Kn (TS)	NFFa Kn (TS)	NFFb Kn (TS)	NFG Kn (TS)	NFH Kn(TS)	NH2 (M58)	NH2pl (MRS)	NH3 (M58)
	NH32 (M58)	NH6 Kn (TS)	NH8b (MRS)	NHB Ka (TS)	NHC (TS)	NHD Kn (TS)	NHE Kn (TS)	NHF11 Kn (TS)
	NHF12 Kn (TS)	NHF2a Kn (TS)	NHF2b Kn (TS)	NHG Kn (TS)	NHH Kn (TS)	NHJ Kn (TS)	NRZ6 (MD)	SGA1a (TS)
	SGC1a Ka (TS)	SGC21 Ka (TS)	SGC2a Ka (TS)	SGD3a Kn (TS)	SGE11 (TS)	SGE111 pl (TS)	SGE112 (TS)	SNC Ka (MRS)
	SND (TS)	SNE1 Kn (TS)	SNE11 (TS)	SNE1 pl (TS)	SNE2 (TS)	SNE2 Kn (TS)		
<i>Lb. farraginis</i>	F51 (MRS)	GINF4 (MRS)	GIS-5 (MRS)	GIS6e (MRS)	GIS6g (MRS)	NF-6 (MRS)	SF42a (MRS)	SF4a (MRS)
<i>Lb. kefir</i>	FD Kn (TS)	FD2 Kn (TS)	NHB2 Kn (TS)	SNF21 (TS)	SNF22 (TS)			
<i>Lb. mucosae</i>	NH2b (M104)							
<i>Lb. parafarraginis</i>	FH (TS)	FH1 Kn (TS)	FH2 Kn (TS)	GF8apl (TS)	GF8bpl (TS)	NF5b (MRS)	NHA Kn (TS)	SNA2 (TS)
	SNF11 Kn (TS)	SNF22 Kn (TS)	SNH2 (TS)					
<i>Lb. rapi</i>	GeFf (M58)							
<i>Lb. rossiae</i>	F1 (MRS)	F2b (MRS)	F4 (MRS)	F5 (MRS)				
<i>P. acidilactici</i>	G4 (M58)							
<i>P. parvulus</i>	NF10pl (TS)							
<i>S. equinus-Gr.</i>	N91 (MD)							

<sup>1</sup> auf Basis der 16S rDNA-Sequenz im Vergleich mit der Datenbank EzTaxon.

<sup>2</sup> Stammbezeichnungen: F = BGA Friedrich, Ge = BGA Gebel, G = BGA Glahn, Li = BGA Lieser, N = BGA Neumann

## 7.7 Daten zur 16S rDNA-Sequenzanalyse der Isolate

**Tab. 7. 11: Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenzanalyse der Isolate.** Aufgelistet sind die zur Identifizierung der Isolate herangezogenen verwandten Arten und deren sequenzanalytische Daten.

Stamm <sup>1</sup>	Organismus	Basenunter- schiebe/ Fragment- länge [%] <sup>2</sup>	Ähnlichkeit [%] <sup>3</sup>
NH1.9 (LB)	<i>B. aerophilus</i> 25K <sup>T</sup>	0/1245	100,00
	<i>B. stratosphericus</i> 41KF2a <sup>T</sup>	0/1245	100,00
	<i>B. pumilus</i> ATCC-7061 <sup>T</sup>	7/1245	99,44
F2d (LB)	<i>B. anthracis</i> ATCC-14578 <sup>T</sup>	0/1075	100,00
	<i>B. cereus</i> ATCC-14579 <sup>T</sup>	1/1076	99,91
N83 (MD)	<i>B. coagulans</i> IAM-12463 <sup>T</sup>	7/1434	99,51
	<i>B. acidiproducens</i> SL213 <sup>T</sup>	41/1413	97,10
LiF4 (LB)	<i>B. licheniformis</i> ATCC-14580 <sup>T</sup>	7/1436	99,51
	<i>B. aerius</i> 24K <sup>T</sup>	8/1434	99,44
	<i>B. sonorensis</i> NBRC-101234 <sup>T</sup>	10/1436	99,30
GIN1.7 (LB)	<i>B. pumilus</i> ATCC-7061 <sup>T</sup>	1/1293	99,92
	<i>B. aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>	6/1293	99,54
	<i>B. stratosphericus</i> 41KF2a <sup>T</sup>	6/1293	99,54
LiF4a (D1)	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC-13429 <sup>T</sup>	1/1451	99,93
	<i>B. tequilensis</i> KCTC-13622 <sup>T</sup>	1/1451	99,93
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB-3610 <sup>T</sup>	2/1451	99,86
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL B-23049 <sup>T</sup>	3/1451	99,79
	<i>Brevibacterium halotolerans</i> DSM-8802 <sup>T</sup>	5/1451	99,66
	<i>B. mojavensis</i> RO-H-1 <sup>T</sup>	6/1451	99,59
	<i>B. vallismortis</i> DV1-F-3 <sup>T</sup>	6/1451	99,59
	<i>B. siamensis</i> KCTC-13613 <sup>T</sup>	8/1451	99,45
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 <sup>T</sup>	9/1451	99,38
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i> DSM-7 <sup>T</sup>	10/1451	99,31
GI2a (M104)	<i>B. thermoamylovorans</i> CNCM I-1378 <sup>T</sup>	14/1387	98,99
	<i>B. kokeshiiformis</i> MO-04 <sup>T</sup>	75/1389	94,60
F2a (MRS)	<i>Lb. brevis</i> ATCC-14869 <sup>T</sup>	2/1458	100,00
	<i>Lb. hammesii</i> TMW-1.1236 <sup>T</sup>	25/1458	100,00
NB1 (TS)	<i>Lb. buchneri</i> JCM-1115 <sup>T</sup>	0/1436	100,00
	<i>Lb. sunkii</i> YIT-11161 <sup>T</sup>	8/1436	99,44
GIS6e (MRS)	<i>Lb. farraginis</i> JCM-14108 <sup>T</sup>	18/1347	98,66
	<i>Lb. hilgardii</i> ATCC-8290 <sup>T</sup>	21/1347	98,44
SNF22 (MRS)	<i>Lb. kefir</i> LMG-9480 <sup>T</sup>	2/1448	99,86
	<i>Lb. parabuchneri</i> LMG-11457 <sup>T</sup>	13/1452	99,10
NH2b (M104)	<i>Lb. mucosae</i> S32 <sup>T</sup>	2/1409	99,86
	<i>Lb. equigenerosi</i> NRIC-0697 <sup>T</sup>	56/1406	96,02
GF8b (TS)	<i>Lb. parafarraginis</i> NRIC-0677 <sup>T</sup>	0/1441	100,00
	<i>Lb. rapi</i> YIT-11204 <sup>T</sup>	24/1441	98,33
GeFf (M58)	<i>Lb. rapi</i> YIT-11204 <sup>T</sup>	0/1465	100,00
	<i>Lb. parabuchneri</i> LMG-11457 <sup>T</sup>	19/1463	98,70
F4 (MRS)	<i>Lb. rossiae</i> DSM-15715 <sup>T</sup>	1/1460	99,93
	<i>Lb. siliginis</i> M1-212 <sup>T</sup>	24/1306	98,16

Fortsetzung Tab. 7. 11.

Stamm <sup>1</sup>	Organismus	Basenunterschiede/ Fragmentlänge [%] <sup>2</sup>	Ähnlichkeit [%] <sup>3</sup>
G4 (M58)	<i>P.lolii</i> NGRI-0510Q <sup>T</sup>	3/1260	99,76
	<i>P. acidilactici</i> DSM-20284 <sup>T</sup>	4/1260	99,68
NF10 (MRS)	<i>P. parvulus</i> JCM-5889 <sup>T</sup>	0/1381	100,00
	<i>P. inopinatus</i> DSM-20285 <sup>T</sup>	15/1382	98,91
N91 (MD)	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>coli</i> HDP90246 <sup>T</sup>	1/1438	99,93
	<i>S. lutetiensis</i> CIP-106849 <sup>T</sup>	2/1439	99,86
	<i>S. equinus</i> ATCC-9812 <sup>T</sup>	3/1439	99,79
	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> ATCC-BAA-102 <sup>T</sup>	4/1439	99,72
LiF1 (M104)	<i>C. aminovalericum</i> DSM-1283 <sup>T</sup>	9/1436	98,60
	<i>C. jejuense</i> HY-35-12 <sup>T</sup>	72/1421	97,90
NF2b (M104)	<i>C. sporogenes</i> DSM-795 <sup>T</sup>	15/1398	98,93
	<i>C. botulinum</i> ATCC-25763 <sup>T</sup>	16/1397	98,85
	<i>Eubacterium combesii</i> ATCC-25545 <sup>T</sup>	17/1397	98,78
NF3 (M58)	<i>Ps. alactolyticus</i> ATCC-23263 <sup>T</sup>	95/1408	93,25
	<i>Eubacterium barkeri</i> ATCC-25849 <sup>T</sup>	100/1406	92,89

<sup>1</sup> In Klammern ist jeweils das zur Isolation verwendete Medium angegeben.<sup>2</sup> Anzahl der in der Datenbank EzTaxon verglichenen Nukleotide der 16S rDNA.<sup>3</sup> Ähnlichkeit des Isolates zum jeweiligen Organismus.

### **8. Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Jelena Bohn

Mainz, August 2016

## 9. Danksagungen

## **10. Lebenslauf**

